



**HAL**  
open science

## Biomateriaux collagène / gélatine : des phases cristal-liquides aux matériaux hybrides

François Portier

► **To cite this version:**

François Portier. Biomateriaux collagène / gélatine : des phases cristal-liquides aux matériaux hybrides. Matériaux. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066655 . tel-01585249

**HAL Id: tel-01585249**

**<https://theses.hal.science/tel-01585249v1>**

Submitted on 11 Sep 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*

## **Biomatériaux collagène/gélatine**

*Des phases cristal-liquides aux matériaux hybrides*

Par François PORTIER

Thèse de doctorat de Physique et Chimie des Matériaux

Dirigée par Gervaise MOSSER

Présentée et soutenue publiquement le 18 Octobre 2016

Devant un jury composé de :

Véronique LARRETA-GARDE	Professeure, Université de Cergy-Pontoise	Rapporteur
Jöns HILBORN	Professeur, Uppsala Universitet	Rapporteur
Marie-Claire SCHANNE-KLEIN	D. de Recherche, Ecole Polytechnique	Examineur
Dominique HOURDET	Professeur, UPMC	Président
Gervaise MOSSER	C. de Recherche, UPMC	D. de thèse
Frédéric GOBEAUX	C. de Recherche, CEA	Expert invité
Benjamin HERBAGE	D. scientifique, Symathèse	Expert invité



## Table des matières

Introduction générale.....	9
<b>Partie A : Le collagène - Etat de l'art et techniques employées.....</b>	<b>13</b>
<b>Chapitre 1 – Pourquoi encore étudier le collagène.....</b>	<b>14</b>
I. Le rôle du collagène <i>in vivo</i> .....	14
II. La superfamille des collagènes.....	15
III. La structure du collagène de type I.....	16
IV. Propriétés physico-chimiques du collagène de type I.....	17
V. Synthèse du collagène de type I.....	19
1. Synthèse « naturelle » du collagène.....	19
2. Vers la production d'un collagène recombinant.....	21
a. Expression du collagène par des hôtes procaryotes.....	21
b. Expression du collagène par des hôtes eucaryotes.....	22
c. Production du collagène par des animaux transgéniques.....	23
d. Production du collagène par des plantes transgéniques.....	23
VI. Production du collagène de type I au laboratoire.....	24
1. Protocole d'extraction du collagène.....	25
2. Dosage des solutions de collagène.....	26
3. Caractérisation de la pureté : électrophorèse en condition dénaturante.....	26
Bibliographie.....	28
<b>Chapitre 2 – Les techniques d'observations.....</b>	<b>33</b>
I. Microscopie électronique à transmission (MET).....	33
1. Principe du MET.....	33
2. Contraintes associées à l'utilisation d'un faisceau d'électron.....	33
3. Préparation des matériaux denses pour l'observation MET.....	34
4. La cryo-microscopie électronique : principe.....	35
II. Microscopie multiphoton.....	37
1. Microscopie de fluorescence à deux photons (2-PEF).....	37
2. Microscopie SHG résolue en polarisation (P-SHG).....	40
a. Origine moléculaire du signal SHG : l'harmonophore.....	40
b. De la molécule à l'ensemble d'harmonophores.....	41
c. Le collagène, un harmonophore endogène.....	43
d. Effet de l'orientation du collagène sur l'intensité du signal SHG.....	43

e. Microscopie SHG résolue en polarisation.....	44
f. Description du microscope.....	46
III. Imagerie par Résonance Magnétique.....	47
1. Origine du signal de résonance magnétique nucléaire (RMN)....	47
2. Relaxation longitudinale et relaxation transversale.....	52
Bibliographie.....	54

## **Partie B : Phases denses collagène/gélatine.....57**

### **Introduction : Pourquoi la gélatine ?.....58**

#### **Chapitre 1 – Du collagène à la gélatine.....60**

I. La gélatine : un nom pour plusieurs espèces.....	60
II. D’où provient la gélatine commerciale ? Procédé d’extraction industrielle de la gélatine.....	61
1. Déminéralisation de l’os en vue de l’extraction de gélatine.....	61
2. Prétraitement des tissus densément réticulés : procédé alcalin....	61
3. Prétraitement des tissus peu réticulés : procédé acide.....	63
4. Extraction de la gélatine : la cuisson.....	63
5. Du bouillon à la gélatine en poudre.....	63
III. Quelles différences entre le collagène et la gélatine ?.....	65
1. La composition chimique.....	65
2. Auto-association et assemblage hiérarchisé.....	67
Bibliographie.....	69

#### **Chapitre 2 – Le collagène, un mésogène.....72**

I. Les cristaux liquides : un compromis entre ordre et fluidité.....	72
1. Comment reconnaître un solide d’un liquide ?.....	73
2. Quelques généralités sur les mésophases.....	73
3. Des cristaux liquides aux structures variées.....	74
a. Phase nématique, cholestérique et contre-plaqué.....	74
b. Phase smectique.....	77
c. Les phases de mésogènes amphiphiles.....	78
II. Cristaux liquides et biologie.....	80
1. Mésophases <i>in vivo</i> .....	80
2. Des mésophases biologiques aux matériaux organisés.....	85
3. Mésophases biologiques <i>in vitro</i> et morphogenèse.....	90
III. Etude structurale des phases denses de gélatine et de collagène/gélatine.....	92

1. Description du dispositif d'étude : la microcellule.....	92
2. Etude des phases denses de gélatine pure de type A.....	93
a. Observations des microcellules en microscopie à lumière polarisée (MOP).....	93
b. Etude des mésophases de gélatine à $T > T_{\text{dénaturation}}$ .....	98
c. Discussion.....	100
d. Conclusions et perspectives.....	102
3. Etude des phases denses de mélange collagène/gélatine.....	102
a. Observations des microcellules au MOP et au P-SHG.....	102
b. Détermination de la concentration de mise en forme.....	106
c. Discussion.....	109
d. Conclusions et perspectives.....	111
Bibliographie.....	112

### **Chapitre 3 – Des phases cristallines-liquides aux matériaux organisés....118**

I. Le collagène de type I, une protéine fibrillaire.....	118
1. Structure des fibrilles de collagène.....	118
2. Quelques généralités sur la fibrillogenèse.....	121
II. Fibrillation de mélanges concentrées collagène/gélatine.....	122
1. Préparation des mélanges concentrées collagène/gélatine.....	122
2. Fibrillogenèse sous vapeur d'ammoniac.....	123
III. Etude structurale de matrices denses et organisées collagène/gélatine.....	123
1. Conditions étudiées.....	124
2. Aspect des matrices.....	124
3. Caractérisation des matrices par DSC.....	124
a. Protocole expérimental.....	124
b. Résultats.....	125
4. Observation des matrices au MET, en SHG et par IRM.....	128
a. Matrice <b>m0%</b> .....	128
b. Matrice <b>m25%</b> .....	130
c. Matrice <b>m50%</b> .....	132
d. Matrice <b>m75%</b> .....	136
e. Matrice <b>m100%</b> .....	139
5. Discussion.....	140
6. Conclusions et perspectives.....	144
Bibliographie.....	145

### **Conclusions et perspectives.....148**

**Partie C : Gel rifamycine/collagène – De la conjugaison d'un antibiotique aux gels sensibles au pH.....151**

**Introduction.....152**

**Chapitre 1 : Les matériaux adaptés au traitement des plaies cutanées chroniques.....154**

I.	Les plaies cutanées chroniques : un phénomène complexe et un enjeu sociétal.....	154
1.	Généralités sur les plaies chroniques.....	154
2.	La cicatrisation, un processus physiologique complexe.....	155
a.	Phase inflammatoire.....	155
b.	Phase de formation du nouveau tissu.....	157
c.	Phase de remodelage.....	157
3.	Quand l'inflammation perdure... : description de la plaie chronique.....	157
II.	Les matériaux adaptés au traitement des plaies chroniques.....	158
1.	Les différentes classes de pansements.....	158
2.	Définition du matériau idéal : vers la synthèse d'un matériau « bioactif ».....	159
3.	Les matériaux qui réduisent l'inflammation.....	160
4.	Concept de notre projet.....	161
	Bibliographie.....	161

**Chapitre 2 - Etude des gels de collagène conjugué rifamycine.....165**

I.	Préparation des gels de collagène conjugué rifamycine.....	165
1.	Description des deux protocoles de préparation.....	165
2.	Liste des conditions étudiées.....	165
3.	Aspect visuel des gels.....	166
II.	Caractérisation des gels collagène conjugués rifamycine.....	167
1.	Comportement des gels en fonction du pH.....	167
2.	Caractérisation des propriétés rhéologiques des gels.....	169
a.	Protocole expérimental.....	169
b.	Résultats.....	169
3.	Caractérisation des gels par DSC.....	172
a.	Protocole expérimental.....	172
b.	Résultats.....	173
4.	Propriétés antibactériennes des gels.....	175
a.	Protocole expérimental.....	175
b.	Résultats.....	176

III.	Expériences en cours.....	177
1.	Détermination de la quantité de rifamycine conjuguée.....	177
2.	Caractérisation de la liaison collagène-rifamycine.....	178
IV.	Discussion.....	180
V.	Conclusions et perspectives.....	182
	Bibliographie.....	182

### **Chapitre 3 - Impact de la conjugaison de la rifamycine sur la structure des fibrilles de collagène - Etude d'un système dilué.....185**

I.	Présentation du système dilué : les particules de collagène conjugué rifamycine.....	185
1.	Présentation du système dilué.....	185
2.	Préparation des échantillons.....	185
II.	Observation des particules de collagène conjugué rifamycine en cryo-MET.....	186
1.	Particules témoins (sans rifamycine).....	186
2.	Particules p( <b>FeC</b> ).....	187
3.	Particules p( <b>FpC</b> ).....	189
III.	Observation des particules de collagène conjugué rifamycine par AFMIR.....	
1.	Particules témoins (sans rifamycine).....	190
2.	Particules p( <b>FeC</b> ).....	191
3.	Particules p( <b>FpC</b> ).....	193
IV.	Discussion.....	194
V.	Comparaison des gels et des particules de collagène conjugué rifamycine.....	196
VI.	Conclusions et perspectives.....	197

### **Conclusions et perspectives.....199**

### **Conclusions générales et perspectives.....202**

### **Annexes.....206**

### **Bibliographie générale.....235**

### **Table des figures.....251**

### **Liste des abréviations.....266**

### **Liste des communications scientifiques.....268**

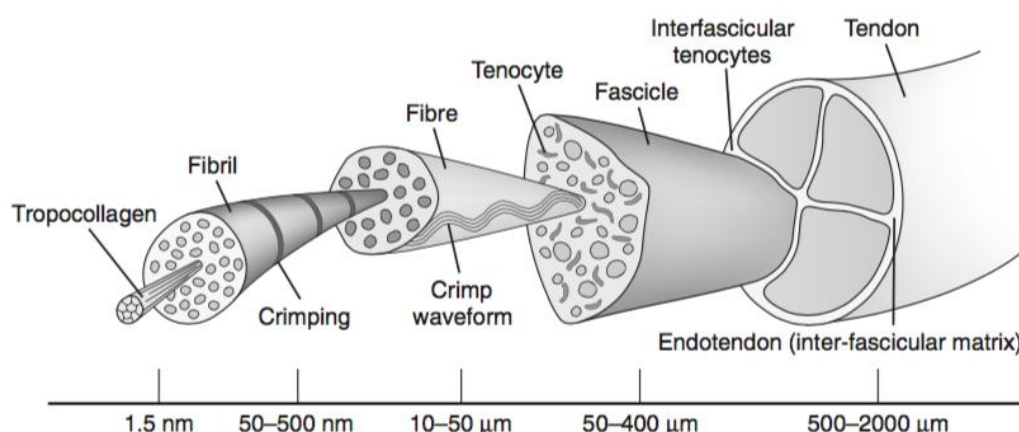




## Introduction

Chez les mammifères, une protéine se trouve être à la base de la majorité des tissus conjonctifs : le collagène. Tel un « Lego<sup>®</sup> », cette véritable brique moléculaire peut-être associée de multiples manières pour former des matériaux aux propriétés macroscopiques parfois diamétralement opposées (ex : cornée et tendon).

Notre « Lego<sup>®</sup> » protéique est toutefois un peu plus complexe que son homologue en plastique puisqu'il se structure à plusieurs échelles, plusieurs niveaux. Si on reprend notre exemple du tendon, ce dernier est un assemblage dense de faisceaux de fibres tertiaires. Des faisceaux de fibres qui sont constitués de fascicules ; fascicules qui résultent eux-mêmes de l'association de sous-fascicules. Ces sous-fascicules correspondent à un assemblage de fibres de collagène. Quant aux fibres, elles peuvent être divisées en fibrilles puis en microfibrilles, un « cluster » de cinq molécules de collagène. Le collagène lui-même est issu de l'association de trois chaînes polypeptidiques (voir figure 1). Outre une énumération un peu longue, on illustre ici clairement le concept de structure hiérarchisée.



**Figure 1:** La structure hiérarchique du tendon (d'après [1])

C'est d'ailleurs cette structuration multi-échelle qui confère au tendon ses propriétés mécaniques exceptionnelles. Il convient donc, pour celui qui souhaite reconstruire un tissu ou un organe, de s'inspirer de leur structure et de mimer leur organisation.

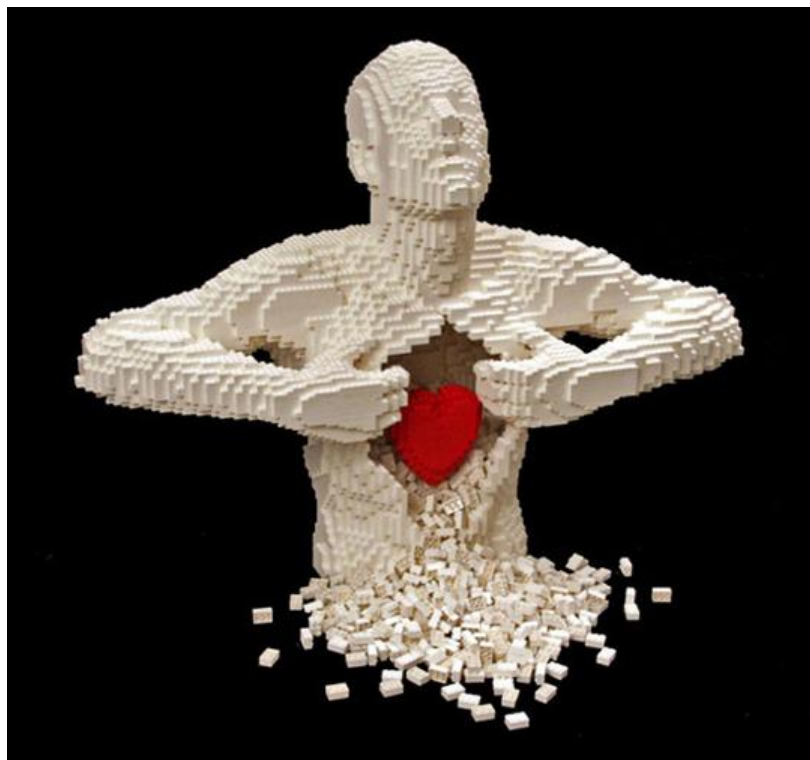
Partant de là, nous pourrions bâtir des édifices moléculaires complexes, reproduisant l'organisation d'un tissu d'intérêt, à partir d'objets synthétiques pensés, modélisés et optimisés à l'atome près pour s'ajuster parfaitement. Ou bien, nous pouvons travailler à partir de notre brique biologique qui contient déjà en elle tout l'information désirée. Au cours de ces dernières décennies, notre équipe a décidé d'étudier et d'exploiter le collagène de type I afin de mieux contrôler les architectures générées *in vitro*. Elle est parvenue à identifier différentes mésophases de collagène, ainsi qu'à contrôler la taille ou encore le

diamètre de ses fibrilles rien qu'en modifiant quelques paramètres physico-chimiques (pH, type d'acide).

Plus récemment, s'inspirant à nouveau de la Nature, nous essayons de moduler l'organisation de nos assemblages de collagène en ajoutant de nouveaux composés. Cette stratégie de « co-assemblage » ou copolymérisation est observée *in vivo* dans tous les tissus et, en particulier, dans la cornée dont les fibrilles sont composées majoritairement de deux types de collagène (I et V). Le collagène V, permet de contrôler le diamètre des fibrilles si bien qu'elles ne diffusent plus la lumière visible et que la cornée est un matériau transparent [2]. Pour notre part, nous avons décidé d'étudier l'impact de l'ajout de la gélatine, un collagène dénaturé, sur les assemblages de collagène. Cette thématique fait l'objet de la seconde partie (Partie B) de cette thèse.

Contrairement aux habitudes de l'équipe, nous avons également chimiquement modifié un collagène et l'avons lié à la rifamycine (un antibiotique). Comme nous le montrons dans la troisième partie (Partie C), l'addition de cette petite molécule peut bouleverser totalement la forme et la structure des agrégats de collagène.

Ce manuscrit a donc pour fil rouge **le collagène et ses assemblages**, qu'il soit sous sa forme native ou modifié. Par conséquent, je débiterai en présentant plus intimement notre brique biologique, le collagène, ainsi que les techniques qui nous ont permis de l'épier au cours de ces trois belles dernières années.



*Figure 2 : Le collagène est la brique moléculaire à l'origine de la majorité des tissus humains [3].*

## **Bibliographie :**

- [1] – Tendon anatomy. In : *Physiopédia* (en ligne). Consulté le 11/09/16. Disponible à l'adresse : [http://www.physio-pedia.com/Tendon\\_Anatomy](http://www.physio-pedia.com/Tendon_Anatomy)
- [2] – HULMES D.J.S. Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In : FRATZL P. (dir.). *Collagen – Structure and Mechanics*. New York : Springer US, 2008, chapitre 2, p. 15-47. ISBN : 978-0-387-73905-2.
- [3] – Sculpture de Nathan Sawaya. Exposition « the Art of the brick ».



## **Partie A :**

Le collagène – Etat de l’art  
et techniques employées

## Partie I – Chapitre 1 : Pourquoi encore étudier le collagène ?

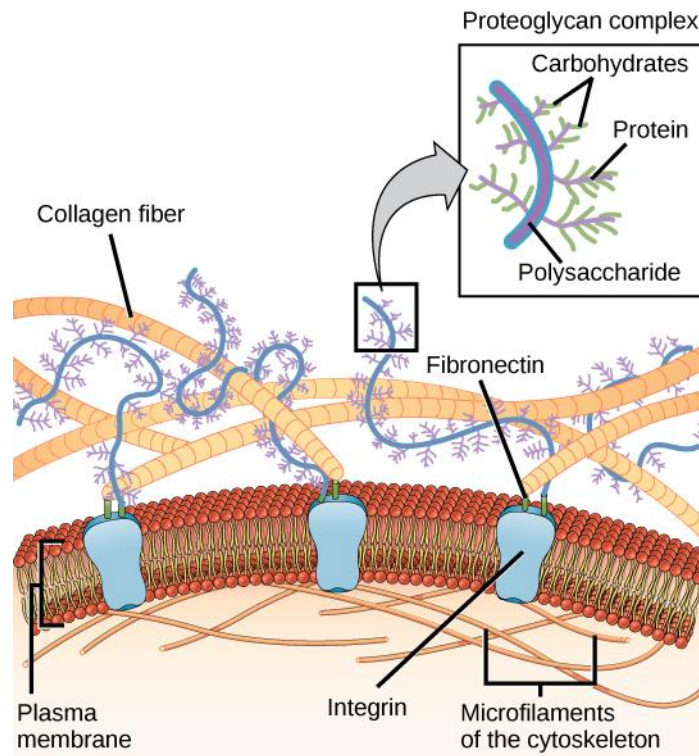
### I – Le rôle du collagène *in vivo*.

Le collagène est la protéine structurale par excellence chez les vertébrés. Chez les mammifères, il s'agit même de la protéine la plus abondante [1, 2] puisqu'on la retrouve dans toutes les matrices extracellulaires. Le collagène, par ses propriétés d'auto-association, forme la trame de la plupart des tissus conjonctifs. Il est ainsi à l'origine de la forme, de la structure microscopique et de la résistance mécanique de la cornée, du tendon, de la peau, du poumon, de la paroi du vaisseau sanguin ou même encore du cartilage [1]. Cette ubiquité du collagène provient de sa capacité à former divers assemblages hiérarchisés à partir d'une seule et même molécule.

Au cours des dernières décennies, notre équipe a tenté de reproduire, *in vitro*, ces structures à partir du collagène de type I purifié. Cette approche, de type bottom-up, a permis l'obtention de matériaux dont l'organisation est similaire à celle de l'os [3] ou encore de la cornée [4]. Elle a également contribué à mieux caractériser les phases cristallines liquides du collagène. Ces aspects d'auto-organisation des phases denses du collagène sont l'objet de la seconde partie de ce manuscrit. On y aborde également l'effet de l'ajout de gélatine, la forme dénaturée du collagène, sur la structure de ces phases denses.

Le collagène de type I est également un constituant majoritaire du derme. Il y forme un réseau de fibrilles sur lequel se fixe diverses protéines (ex : fibronectine) et polysaccharides (ex : acide hyaluronique). Ce réseau sert également de support pour les fibroblastes, les cellules du derme (voir figure 1). Le collagène garde ici son rôle structural mais il joue également un rôle dans la communication intercellulaire [5]. Les fibrilles permettent de relier physiquement les cellules entre elles et de transmettre des stimuli mécaniques. Ce réseau est à la base des phénomènes de mécano-transduction [6, 7]. La matrice de collagène assure aussi la rétention/diffusion de messagers cellulaires tels que des facteurs de croissance. Dans une approche biomimétique, le collagène semble donc un candidat intéressant pour reconstituer le derme [8, 9]. Il a été beaucoup utilisé afin de réaliser des pansements pour les plaies cutanées chroniques [10]. Notre équipe a d'ailleurs réalisé des matériaux hybrides, collagène/silice, permettant la libération contrôlée d'antibiotiques sur plusieurs semaines [11]. Dans cette optique, nous avons récemment mis au point un procédé de conjugaison du collagène par un antibiotique, la rifamycine. La protéine, ainsi modifiée, a ensuite été utilisée pour réaliser des hydrogels aux propriétés originales. L'étude de ces gels et de la conjugaison du collagène constitue le sujet de la troisième partie de cette thèse.

Toutefois, avant de rentrer dans le vif du sujet, nous allons refaire un point sur le collagène. Qu'appelle-t-on collagène ? Quels sont les différents types de collagène ? Quelle est sa structure ? Comment est-il synthétisé ? Comment est-il extrait ? etc. Dans un second temps, je présenterai quelques unes des techniques de caractérisation utilisées au cours de ma thèse.



**Figure 1 :** Représentation schématique des interactions entre le fibroblaste et les constituants de la matrice extracellulaire (d'après [44]).

## II - La superfamille des collagènes.

Sub-family	Members
Fibrillar collagens	Types I, II, III, V, XI, XXIV and XXVII
Fibril associated and related collagens	Types IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI and XXII
Beaded filament forming collagen	Type VI
Basement membrane and associated collagens	Type IV, VII, XV and XVIII
Short chain collagens and related proteins	Types VIII and X; C1q; hibernation-related proteins HP-20, HP-25 and HP-27; emilins 1 and 2; adiponectin; CTRPs 1-7: inner ear (saccular) collagen
Transmembrane collagens and collagen-like proteins	Types XIII, XVII, XXIII and XXV/CLAC-P; ectodysplasins; macrophage scavenger receptors I-III; MARCO; SRCL; gliomedin; CL-P1
Collectins and ficolins	Mannan binding protein; surfactant proteins A and D; conglutinin; CL-43; CL-46; CL-L1; CL-P1; L-, M- and H-ficolins
Other collagens and collagen-like proteins	Emu1; collagen XXVI/Emu2; collagen XXVIII; acetylcholinesterase tail subunit

**Tableau 1 :** Répartition des collagènes en sous-famille (d'après [12]).

La superfamille des collagènes est constituée des protéines présentant une séquence peptidique caractéristique. Il s'agit de la répétition d'un triplet « Gly-X-Y » (X et Y étant des acides aminés aléatoires) capable de s'associer avec deux autres chaînes pour former une triple hélice. Au sein de cette superfamille, on compte 56 protéines. Parmi elles, seulement 28 portent le nom de collagène. En effet, on attribue le nom de collagène aux protéines comportant la séquence caractéristique (Gly-X-Y)<sub>n</sub> et dont la fonction principale est structurale [12]. Les



autres protéines de la superfamille ont été nommées en fonction de leur rôle biologique (voir tableau 1).

On distingue deux types de collagène : les collagènes fibrillaires et les collagènes non-fibrillaires. Comme leur nom l'indique, les collagènes fibrillaires sont capables de s'associer sous forme de fibrilles dans les conditions physiologiques (cf Partie B – Chapitre 3). Ces fibrilles forment alors le réseau à l'origine des propriétés mécaniques et morphologiques des tissus. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à une variété de collagène fibrillaire, le collagène de type I. Chez l'Homme, le collagène de type I est omniprésent. On le retrouve dans la peau, le tendon, la cornée, l'os, le poumon ou encore dans les parois vasculaires. Ainsi, cette protéine se trouve être à l'origine de matériaux aux propriétés et structures extrêmement variées mais c'est également le collagène le plus abondant. En effet, le collagène de type I représente, en quantité, 90% des collagènes [13].

### III – La structure du collagène de type I.

Comme pour tous les collagènes, le collagène de type I est constitué de trois chaînes polypeptidiques appelées chaînes  $\alpha$ . Les collagènes possédant des chaînes  $\alpha$  identiques sont dits homotrimériques. Le collagène de type I est hétérotrimérique : il est composé de deux chaînes différentes,  $\alpha 1(I)$  et  $\alpha 2(I)$ , en stoechiométrie 2 pour 1. Cette spécificité du collagène de type I est, entre autre, à l'origine de la complexité de sa synthèse par recombinaison génétique (cf V-2- Vers la production de collagène recombinant).

Structure	Chiralité	Pas de l'hélice	Nombre de résidus par tour
Hélice $\alpha$	Droite	5,4 Å	3,6
Hélice « PPII » des chaînes $\alpha$	Gauche	9,4 Å	3,3

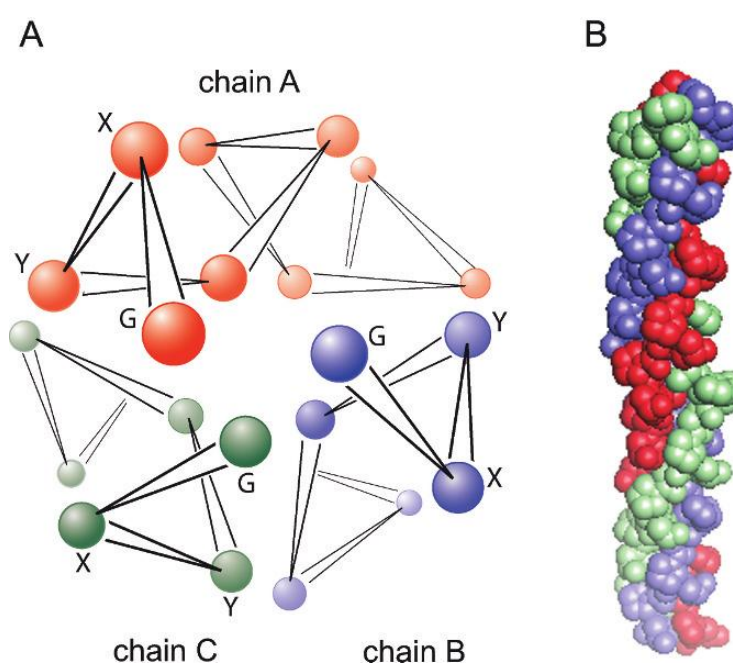
**Tableau 2 : Paramètres décrivant l'hélice  $\alpha$  et l'hélice PPII.**

Les chaînes  $\alpha 1(I)$  et  $\alpha 2(I)$  ont des séquences primaires semblables. Ce sont des polypeptides d'environ un millier d'acides aminés comportant une très grande séquence  $(Gly-X-Y)_n$  centrale. Dans le cas du collagène de type I, X et Y correspondent souvent à la proline et à l'hydroxyproline. En effet, ces acides iminés représentent environ 30% des résidus d'une chaîne  $\alpha$ . Les acides iminés sont des molécules cycliques qui entraînent donc une gêne stérique et augmentent la raideur de la chaîne en diminuant le nombre de conformations stables [45, 46]. Pour minimiser les contraintes liées à la présence de ces acides iminés, le domaine  $(Gly-X-Y)_n$  adopte une structure en hélice *gauche*. Cette hélice gauche porte le nom d'hélice « PPII » car elle a une structure similaire à l'hélice de polyproline. Contrairement aux hélices  $\alpha$  *droites* « classiques », l'hélice « PPII » de la chaîne  $\alpha$  est plus étirée (voir tableau 2) et n'est pas stabilisée par des liaisons hydrogènes intracaténaïres [13, 14].

La répétition régulière de la glycine permet la trimérisation des chaînes  $\alpha$  hélicoïdales sous forme d'une super hélice *droite*. Cette triple hélice *droite* est stabilisée par de nombreuses liaisons hydrogènes intercaténares (voir figure 2). De plus, tous les résidus glycine sont situés à l'intérieur de l'hélice, exposant en surface les autres résidus et favorisant ainsi leur interaction avec le solvant ou d'autres molécules, dont le collagène [12, 13, 14].

Enfin, aux extrémités N et C de la chaîne  $\alpha$ , on trouve deux petits domaines d'une vingtaine d'acides aminés appelés les télopeptides. Ces domaines ne s'associent pas sous forme de triple hélice mais ont un rôle important dans la formation des fibrilles (cf Partie B – Chapitre 3) [15].

Il est important de rappeler que la structure exacte du collagène n'a jamais été résolue. L'hypothèse de la triple hélice provient de l'équipe de Ramachandran qui travailla sur des clichés de diffraction aux rayons X d'un tendon de queue de Kangourou [14]. Il s'agit donc de la structure d'une molécule de collagène comprise au sein d'une fibrille.



**Figure 2:** structure en triple hélice du collagène. En A, vue axiale de l'hélice indiquant la conformation des carbones  $\alpha$  de chaque chaîne. On observe que les résidus glycines sont enfouis au centre de la triple hélice. En B, vue de côté du modèle compact de la triple hélice droite de collagène (d'après [12]).

#### IV – Propriétés physico-chimiques du collagène de type I.

Le collagène est également composé d'environ 15% d'acides aminés ionisables (voir figure 3). On compte à peu près autant de résidus basiques (lysine, arginine, etc.) que de résidus acides (glutamate, aspartate). D'un point de vue physico-chimique, le collagène est donc un polyélectrolyte amphotère : il peut à la fois jouer le rôle d'un acide ou d'une base. Le calcul de la charge nette du collagène est par conséquent assez complexe. Elle dépend de la force ionique, de la concentration en collagène, du pH, etc.

proposed in the literature at that time, and that the problem was wide open. Even more than that, he indicated that there were some specimens of shark fin ray collagen (elastoidin) in the Department of Biochemistry of Madras itself.

*First contacts with collagen via CLRI*

This helped us in starting our studies. But this material was not the one best suited for X-ray diffraction purposes. We wanted kangaroo

**Figure 3 : Diagramme illustrant la composition en acide aminé du collagène de type I (d'après [14]).**

Comme pour tous les polyélectrolytes, la conformation du collagène dépend de sa charge nette. Une caractérisation par dichroïsme circulaire a montré que les chaînes  $\alpha$  du collagène présentent, en milieu acide (pH = 2,5), une conformation en hélice gauche de type PPII [16, 17]. Cette même étude a également permis d'établir que la conformation en PPII est stabilisée par l'association des chaînes  $\alpha$ . Il est admis qu'en milieu acide, les chaînes  $\alpha$  sont également associées sous forme de triple hélice. Toutefois, notre équipe a démontré récemment qu'en augmentant le pH d'une solution acide de collagène concentré, on observe une modification de la conformation d'un grand nombre de résidus du collagène. En particulier, un quart des résidus proline et 40% des résidus hydroxyprolines changent de conformation lorsque l'on passe d'un pH 2,5 à un pH 8,5 [18]. Il s'agit essentiellement d'une modification du plissement de cycle (ou puckering) de ces acides iminés. Pourtant, ce sont ces acides iminés qui sont à la base de la structure type PPII des chaînes  $\alpha$  et donc de l'association sous forme de triple hélice [19]. Ces résultats semblent indiquer que les chaînes  $\alpha$  adoptent une structure plus stable que l'hélice PPII ou plus favorable à l'association sous forme de fibrilles.

En effet, la fibrillogenèse (ou association du collagène sous forme de fibrilles) s'opère généralement entre pH = 6 et pH = 10 [20]. Elle coïncide avec la plage de pH pour laquelle la charge nette du collagène est faible (PI entre 6,5 et 8,5 selon le tampon utilisé). Le mécanisme de la fibrillogenèse et la structure de fibrilles seront abordés ultérieurement, dans la partie II.

En conclusion, le comportement du collagène en tant que polyélectrolyte a été assez peu étudié [21, 22]. On est parti du postulat que la conformation en triple hélice, observé en condition physiologique, est conservée dans des conditions de pH et de force ionique dramatiquement différentes. La plupart des études récentes utilisent des polypeptides, mime de collagène « collagen-like », sans résidus ionisables afin de rendre compte de la structure du collagène [19]. D'un autre côté, la fibrillogenèse complique l'étude de la conformation du collagène en solution puisqu'elle ne peut être dissociée de la variation de la charge nette de cette protéine.

## V – Synthèse du collagène de type I.

### 1 – Synthèse « naturelle » du collagène.

Comme pour toutes les protéines, la synthèse *in vivo* du collagène débute par la transcription d'un gène. Les gènes codant pour les chaînes  $\alpha 1(I)$  et  $\alpha 2(I)$  sont transcrits et les ARNm résultants sont exportés dans le cytoplasme, au niveau du réticulum endoplasmique granuleux. L'ARNm est alors traduit par des ribosomes en surface du réticulum et la nouvelle protéine est transloquée, de manière concomitante dans le lumen du réticulum. Afin d'éviter une fibrillation prématurée du collagène dans la cellule, les chaînes  $\alpha 1(I)$  et  $\alpha 2(I)$  nouvellement synthétisées comportent un propeptide à chaque extrémité. Ces propeptides jouent également un rôle important dans la trimérisation des chaînes  $\alpha$  et la formation de la triple hélice (voir ci-dessous).

Dans le réticulum, les chaînes  $\alpha$  subissent une première série de modifications post-traductionnelles. Une partie des prolines et des lysines sont tout d'abord hydroxylées en hydroxyproline et hydroxylysine. Ces réactions sont effectuées par des hydroxylases qui utilisent l'acide ascorbique (vitamine C) comme cofacteur. En cas de carence en vitamine C, ou scorbut, la synthèse du collagène est donc rendue impossible ce qui explique le déchaussement des dents observé chez les patients. L'hydroxylation de la proline, essentiellement en position Y du triple Gly-X-Y, permet de stabiliser la conformation en hélice gauche de la chaîne  $\alpha$ . En effet, sans hydroxylation des prolines, la température de dénaturation du collagène chute de 30°C [12, 23, 24]. Cette stabilisation a deux origines. La présence d'un groupement hydroxyle permet l'établissement de liaisons hydrogènes supplémentaires à travers la couche de solvation [14]. De plus, en position Y, l'effet inductif attracteur de l'oxygène favorise le plissement de cycle *exo*, conformation nécessaire afin de permettre l'établissement de la triple hélice [19, 23, 25]. L'hydroxylation des lysines est l'origine de futures modifications post-traductionnelles. C'est au niveau des hydroxylysines que les lysyl-oxydases agissent afin de réticuler chimiquement les molécules de collagène préalablement fibrillées (cf Partie II – Chapitre 1). Les hydroxylysines peuvent également être O-glycosylées sur leur fonction hydroxyle, modifiant ainsi la surface du collagène et donc les interactions avec son environnement. Cette étape de O-glycosylation est spécifique de la superfamille des collagènes et elle s'effectue juste après les hydroxylations.

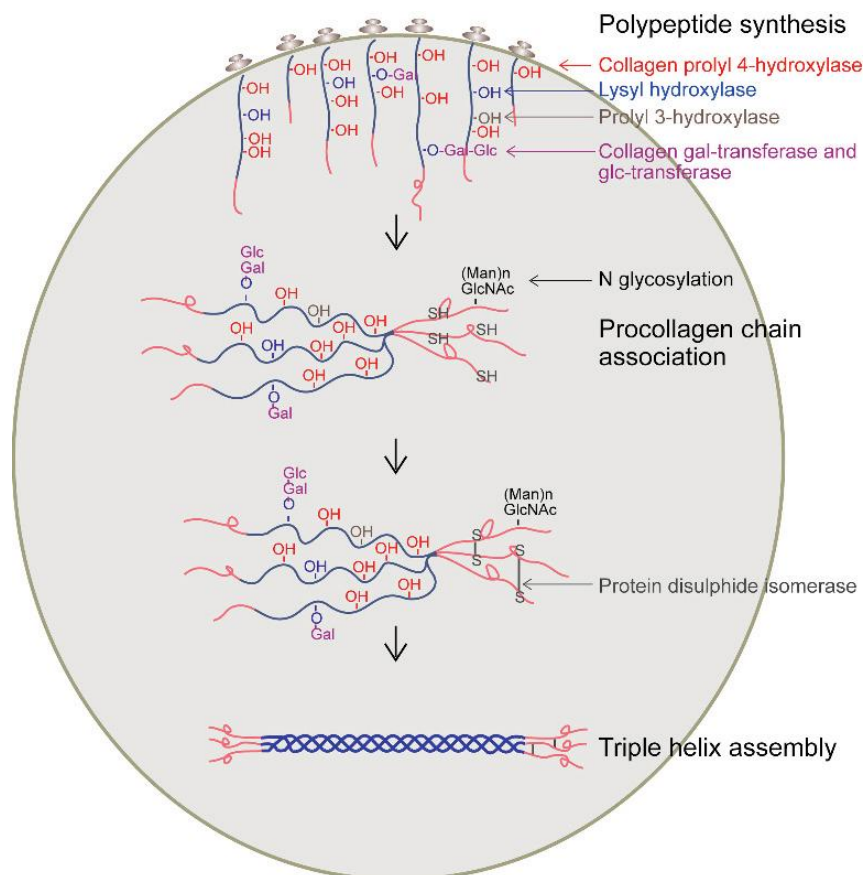
Les chaînes  $\alpha$  hydroxylées et glycosylées s'associent ensuite par trois. Cette trimérisation passe d'abord par une étape de reconnaissance moléculaire afin d'assurer une bonne stoechiométrie. Cette étape est d'autant plus importante dans le cas d'un collagène hétérotrimérique comme le collagène de type I. Cette reconnaissance est permise par une petite séquence située au niveau du propeptide C-terminal. C'est également au niveau de ce propeptide que les chaînes vont tout d'abord se lier. Le propeptide C comporte quatre domaines en hélice  $\alpha$  (à ne pas confondre avec les chaînes  $\alpha$ ). Ces hélices présentent une face hydrophile (acides aminés chargés) et une face hydrophobe (acides aminés apolaires). Dans le réticulum, les hélices  $\alpha$  s'associent par trois sous forme de superhélices, permettant ainsi de limiter l'interaction entre l'eau et les faces hydrophobes. La trimérisation des chaînes  $\alpha$  est aussi assurée par l'établissement de pont disulfures intra et intercaténaux au niveau des

propeptides N et C. La formation de ces liaisons est facilitée par l'action d'une enzyme, la PDI (Protein Disulfide Isomerase). A partir de ces zones de fixation, les chaînes  $\alpha$  peuvent alors s'associer en triple hélice.

L'adoption de cette conformation en triple hélice est une étape assez lente. Les liaisons peptidiques des chaînes  $\alpha$  doivent toutes avoir une conformation *trans* afin de permettre la formation de l'hélice. Or, une partie importante des prolines sont synthétisées en conformation *cis*. L'élongation de la triple hélice nécessite donc l'action d'une nouvelle enzyme : la prolyl *cis/trans* isomérase. On obtient alors le procollagène, un collagène comportant encore des propeptides à ses extrémités.

Avant de quitter le réticulum endoplasmique pour l'appareil de Golgi, le procollagène est à nouveau glycosylé (N-glycosylation). Au cours de son transport à travers le Golgi, le procollagène, ainsi que des métalloprotéases, sont encapsulés dans des vésicules. Ces métalloprotéases ont pour fonction de cliver les propeptides du collagène. Le clivage débute au cours du transport vers la membrane plasmique et se termine dans l'espace extracellulaire. Le collagène ainsi formé peut alors s'associer sous forme de fibrilles

Outre les enzymes responsables des modifications post-traductionnelles, la bonne maturation du collagène nécessite un grand nombre de protéines chaperonnes (ex : HSP47). Ces dernières facilitent le repliement des chaînes  $\alpha$ , stabilisent la triple hélice avant la fibrillogenèse et empêchent la formation prématurée de fibrilles.



**Figure 4:** Modification post-traductionnelle des chaînes  $\alpha$  dans le réticulum endoplasmique et association sous forme de procollagène (d'après [12]).

En conclusion, la synthèse du collagène nécessite de nombreuses étapes de modifications post-traductionnelles. Ce sont ces modifications qui rendent complexe la production de collagène recombinant. Toutefois, l'intérêt majeur que représente le collagène a poussé de nombreuses équipes à se pencher sur ce délicat problème.

## 2 – Vers la production d'un collagène recombinant.

Les collagènes sont utilisés pour de nombreuses applications : applications médicales [26], pharmaceutiques [27], cosmétiques [28] et même agroalimentaires [29]. Malheureusement, il n'existe pas de sources permettant d'obtenir rapidement et en grande quantité un collagène de mammifères de qualité (séquence entière, sans dénaturation). Actuellement, le collagène utilisé est extrait et purifié à partir de tissus biologiques. On utilise essentiellement des peaux et tendons de bœufs ou de porcs.

Toutefois, ces dernières années, une nouvelle difficulté s'est ajoutée avec l'émergence des maladies à prions. Les produits d'origine animale sont désormais considérés avec beaucoup plus de précautions par les autorités sanitaires. De plus, la réticulation enzymatique du collagène dépend de l'âge de l'animal : plus un animal vieillit et plus son collagène est réticulé [30]. Les propriétés physico-chimiques des solutions de collagène varient donc en fonction de la bête...

Afin de remédier à ces différents problèmes et en vue d'obtenir une source pérenne de collagène, de nombreuses équipes ont tenté ces trente dernières années de synthétiser du collagène humain par voie recombinante. De manière simple, la synthèse de protéines recombinantes consiste :

- à introduire, dans un organisme hôte, un vecteur contenant un acide nucléique codant pour la protéine exogène d'intérêt.
- à introduire, dans l'organisme hôte, un vecteur contenant des acides nucléiques codant pour les protéines nécessaires aux modifications post-traductionnelles de la protéine exogène d'intérêt.
- à faire exprimer cette protéine exogène par l'organisme hôte grâce à sa propre machinerie transcriptionnelle et traductionnelle.
- à récupérer et purifier la protéine d'intérêt.

Dans le cas du collagène de type I, tous les types d'organismes ont été envisagés, des bactéries aux souris en passant par le ver à soie et les plants de tabac [31].

### a – Expression du collagène par des hôtes procaryotes.

Les bactéries sont les hôtes les plus utilisées afin de produire des protéines recombinantes. En particulier *E. coli* car son génome est extrêmement bien connu et sa transfection est relativement facile. De plus, son rendement en protéines produites est élevé pour de faibles coûts de culture. Les procaryotes présentent cependant de nombreux désavantages :

- Ils ne possèdent pas de système de modification post-traductionnelle. Il est donc nécessaire de coexprimer des enzymes afin d'obtenir un collagène avec une structure en triple hélice. Le bon repliement de la

protéine coexprimée peut alors représenter une nouvelle difficulté. C'est le cas de la prolyl hydroxylase, une protéine tétramérique coexprimée par Neubauer et al. [32] chez *E. Coli*.

- La production, en grande quantité, de protéines de haut poids moléculaire, comme le collagène de type I, induit la formation de corps d'inclusion. Il s'agit d'agrégats de protéines mal-conformées qui sont difficiles à solubiliser et à renaturer.

Malgré de nombreuses tentatives pour optimiser la synthèse de collagène de type I par *E. Coli*, on aboutit toujours à l'obtention de corps d'inclusion dans lesquels les protéines semblent être sous forme de gélatine.

#### b – Expression du collagène par des hôtes eucaryotes.

Pour outrepasser les difficultés liées aux modifications post-traductionnelles, de nombreuses équipes se sont naturellement tournées vers des cellules eucaryotes produisant intrinsèquement du collagène. Ils ont donc utilisé des cellules de mammifères qui ont produit un collagène bien replié et glycosylé. Cependant, leur rendement est extrêmement faible et leur culture nécessite l'utilisation de milieux et sérum coûteux. Enfin, les cellules de mammifères sont plus sensibles aux conditions environnementales que les bactéries et leur utilisation implique une surveillance accrue donc un coût humain plus important. Par conséquent, la synthèse de collagène recombinant par des cellules de mammifères concerne essentiellement des collagènes rares et ne permet pas une production à haut débit.

Proche des cellules de mammifères, quelques tentatives ont eu lieu avec les cellules d'insectes. Ces cellules peuvent être assez facilement transfectées et présente l'avantage d'exprimer, faiblement, la prolyl hydroxylase. Mais là encore, le rendement est beaucoup trop faible pour permettre une utilisation commerciale et les travaux n'ont pas été poursuivis.

Le système d'expression le plus efficace pour la production du collagène de type I reste la levure *Pichia Pastoris*. Son efficacité provient des nombreuses améliorations qui ont été apportés à ce système ces vingt dernières années. Cette levure n'a pas de système réalisant les modifications post-traductionnelles. La prolyl hydroxylase a donc été coexprimée avec les gènes codant pour le collagène de type I. De plus, les codons pour le collagène ont été optimisés pour *P. Pastoris*. On a également modifié la séquence des chaînes  $\alpha 1(I)$  et  $\alpha 2(I)$  du collagène :

- Le propeptide N a été supprimé car il n'est pas utile pour permettre un bon repliement de la chaîne. Cette délétion permet une réplication plus rapide du gène.
- Le propeptide C a été remplacé par une séquence plus courte permettant également une trimérisation de chaînes  $\alpha$ .

Enfin, des travaux sur les températures de fermentation et la concentration en oxygène ont permis d'obtenir un taux acceptable d'hydroxylation des prolines. De plus, pour cette levure, la purification du collagène se fait facilement par une série de précipitations dans des tampons de salinité croissante. On évite donc l'emploi de techniques complexes de chromatographie. En contrepartie, les molécules de collagène produites par *P. Pastoris* ne comportent pas d'hydroxylysine (impliqué dans la réticulation enzymatique du collagène) et ne

sont pas glycosylés. De plus, cette levure produit essentiellement des homotrimères  $[\alpha 1(I)]_3$ , au lieu du collagène de type I hétérotrimérique  $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ . Ce phénomène est d'ailleurs commun à tous les systèmes d'expression hétérologue, y compris les cellules de mammifères.

Les collagènes recombinants de type I et III produits par *P. Pastoris* sont commercialisés par la firme Fibrogen [33] depuis 2001. Depuis, ces collagènes ont été utilisés par plusieurs équipes afin de réaliser des biomatériaux. En particulier, l'équipe de May Griffith a publié six articles sur des cornées à base de collagène recombinant (collagène de type III surtout) et l'implantation de ces matrices sur des cochons nains a montré une bonne intégration de cette protéine recombinante.

#### c – Production du collagène par des animaux transgéniques.

Un organisme transgénique comporte une modification intentionnelle de son génome commune à l'ensemble de ces cellules, tel que l'insertion d'un gène codant pour une protéine exogène. La méthode la plus simple pour obtenir un organisme transgénique consiste à insérer le gène d'intérêt directement dans un ovule.

Concernant le collagène de type I, il y a eu peu de travaux effectués sur sa production via des animaux transgéniques. John *et al.* [34] ont ciblé les glandes mammaires de souris. Leur but était de produire du collagène humain dans le lait de souris. La première tentative a abouti à l'obtention de collagène sous-hydroxylé et donc instable à 37°C. L'hypothèse retenue est que la prolyl hydroxylase endogène n'est pas adaptée pour fonctionnaliser le collagène humain. Une seconde souche de souris transgénique, coexprimant le collagène et la prolyl hydroxylase humaine, a permis d'obtenir du lait contenant du collagène hydroxylé avec un rendement plutôt faible (0,2 g de collagène/L de lait). Là encore, le collagène de type I exprimé est homotrimérique.

Adachi *et al.* [35] ont, quant à eux, exploré la piste du vers à soie. De nombreuses protéines recombinantes ont déjà été produites avec succès dans des cocons de vers à soie [36]. Ce système économique et simple permet de récupérer facilement la protéine recombinante. De plus, on observe en moyenne une nette augmentation du taux de protéines produites comparé aux méthodes de laboratoire (entre 20 et 10 000 fois) [31]. Concernant le collagène de type I, après optimisation, Adachi a obtenu des cocons contenant 8% de collagène en masse. Toutefois, une caractérisation par dichroïsme circulaire a montré que ce collagène recombinant est partiellement replié sous forme de triple hélice. Il se rapproche donc plus de la gélatine.

#### d – Production du collagène par des plantes transgéniques.

Les plantes transgéniques sont des systèmes régulièrement employés pour la synthèse industrielle de protéines recombinantes. Elles ont, par exemple, été utilisées en pharmacutique pour produire de l'insuline ou des anticorps. Elles ont l'avantage d'être économiques si on les compare aux animaux qu'il faut régulièrement nourrir et soigner. De plus, leur cycle de développement est, en général, bien plus rapide.



Les plants de tabac sont les premières plantes avoir été modifiées pour produire du collagène de type I [37]. En absence de prolyl hydroxylase, Ruggiero *et al.* ont obtenu un collagène de type I homotrimérique partiellement replié. Si le collagène n'était pas utilisable en l'état, ces travaux ont permis de préciser le rôle de l'hydroxyproline au cours du repliement et de la fibrillogenèse du collagène [38]. De plus, le rendement obtenu avec ces plants de tabac s'est avéré très élevé. Plus récemment, Stein *et al.* [39] ont repris ce concept en coexprimant le collagène avec des prolyl et lysyl hydroxylases. Ils ont ainsi obtenu, avec un rendement particulièrement élevé (2% des protéines solubles), un collagène recombinant de type I hétérotrimérique comportant un taux d'hydroxyproline et d'hydroxylysine similaire au collagène natif. L'expression de la lysyl hydroxylase permet également la O-glycosylation de ce collagène, le rapprochant un peu plus de la forme native. Le collagène recombinant de plants de tabac est aujourd'hui vendu par la compagnie CollPlant sous le nom de « Collage ». Cette dernière commercialise également des biomatériaux à base de collagène végétal pour des applications médicales [40].

L'orge et le maïs ont également été modifiés afin de produire du collagène de type I. Dans le cas de l'orge, quelques travaux ont permis d'aboutir à la synthèse de chaînes  $\alpha 1(I)$  mais avec un rendement beaucoup trop faible pour espérer une commercialisation. Quant au maïs, il a été sélectionné pour sa forte production, le faible coût de ses graines à l'achat mais aussi pour la présence d'une prolyl hydroxylase endogène. Toutefois, son activité est trop faible pour assurer une hydroxylation suffisante du collagène exprimé. Des travaux d'optimisation sont actuellement en cours, en particulier dans le domaine de l'extraction et de la purification.

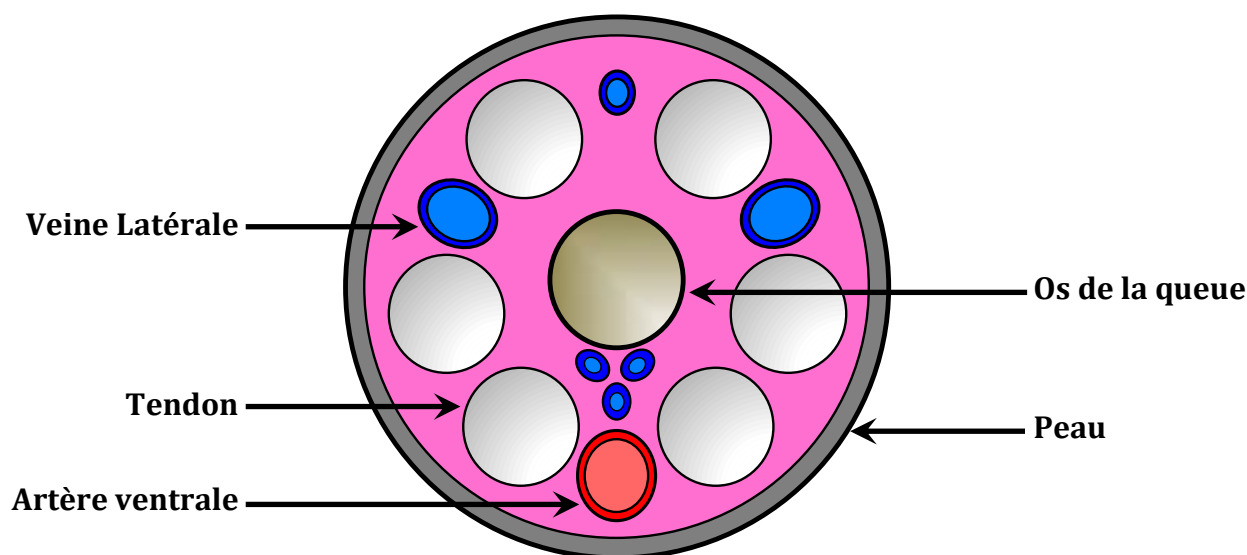
En conclusion, les nombreux travaux des trente dernières années ont permis d'aboutir à un collagène recombinant très semblable à la version native (pas de N-glycosylation). Ce collagène végétal est bien assimilé par l'Homme et est déjà commercialisé sous forme de biomatériaux tel que des matrices de comblement osseux. Si il permet de répondre aux problèmes de contaminations (ex : prions), d'homogénéité (ex : réticulation enzymatique) ou de production de masse ; il ne résout toujours pas celui de la stérilité. De plus, le collagène recombinant végétal, malgré le faible coût d'entretien des plants de tabac transgénique, est vendu plus cher qu'un collagène natif purifié. En l'état, le collagène recombinant ne permet donc pas le développement du marché des matrices denses et organisées de collagène.

## VI – La purification du collagène de type I au laboratoire.

Dans notre équipe, le collagène de type I est extrait à partir de tendons de queues de rats. Les cadavres de rats utilisés proviennent de laboratoires de biologie où ils ont servi de rats témoins pour des expériences diverses. Notre collagène ne provient donc pas d'animaux abattus uniquement pour permettre cette purification. Les rats que nous utilisons sont âgés seulement de quelques mois. A ce stade de développement, le collagène du tendon est très faiblement réticulé. On s'assure donc ainsi de l'homogénéité des propriétés physico-chimique de notre collagène. De plus, la stabilité du tendon n'est due qu'aux

interactions supramoléculaires et réversibles à l'origine des fibrilles. Les tendons sont ainsi solubles dans des solutions d'acides, à un pH où les molécules de collagène sont chargés et se repoussent.

#### 1 – Protocole d'extraction du collagène.



*Figure 5: Schéma d'une coupe transversale de queue de rat*

La queue du rat est parcourue par des tendons sur toute sa longueur (voir figure 5). La première étape consiste à sectionner partiellement et séquentiellement des tronçons de queue de 1 cm, à partir de l'extrémité de celle-ci, afin d'en extirper des faisceaux de tendons. Les tendons prélevés sont ensuite lavés plusieurs fois dans du PBS (tampon phosphate à pH = 7,4). On enlève ainsi toutes traces de sang et de vaisseaux sanguins. Les tendons sont ensuite rincés avec une solution concentrée en NaCl (4M). Cette solution hypertonique assèche et détruit les cellules. Pour évacuer les fragments cellulaires et l'excès de sel, les tendons sont ensuite lavés plusieurs fois dans l'eau déionisée. On passe alors à l'étape de solubilisation : les tendons sont plongés pour une nuit dans une solution aqueuse d'acide acétique 500 mM (pH = 2,5). On obtient un mélange visqueux contenant des protéoglycanes, du collagène, des petites protéines (voir infra) et quelques fibres insolubles. On purifie ensuite le collagène par une série de centrifugations et de précipitations salines :

- Par centrifugation à haute vitesse, on écarte tout d'abord les fibres insolubles.
- Les protéoglycanes, polyélectrolytes de haut poids moléculaire, sont précipités par un premier ajout de NaCl (concentration finale 300 mM).
- On peut alors les séparer par une nouvelle étape de centrifugation.
- Enfin, on précipite le collagène par un second ajout de NaCl (concentration finale 600 mM).
- En centrifugeant à faible vitesse, on récupère le culot contenant le collagène.

Le culot est solubilisé et dialysé dans l'acide acétique 500 mM afin de se débarrasser du NaCl. La solution de collagène ainsi obtenue peut être conservée à 4°C sans craindre une détérioration de la protéine. Après chaque extraction, on s'assure de la pureté protéique et on quantifie la concentration en collagène.

## 2 – Dosage des solutions de collagène.

Contrairement aux autres protéines, le collagène ne peut pas être directement quantifié par spectrométrie UV-visible. Il contient très peu de résidus aromatiques [41] (voir figure 3). Par contre, l'hydroxylation des prolines est spécifique de la superfamille des collagènes. On dose donc le collagène en dosant ses résidus d'hydroxyproline.

La première étape consiste à hydrolyser totalement le collagène en milieu acide. L'hydroxyproline libérée est ensuite oxydée en pyrrole par l'action de la chloramine T. Cette réaction d'oxydation est stoppée par l'ajout d'un excès d'acide perchlorique. Finalement, on forme un complexe coloré (rose fuchsia) en faisant réagir le pyrrole avec du DMBA (diméthylbenzaldéhyde) [42]. L'absorbance du complexe à 557 nm nous permet de remonter à sa concentration grâce à la loi de Beer-Lambert et à une courbe étalon établie en parallèle avec des solutions d'hydroxyproline de concentration connue. Connaissant la composition en acides aminés du collagène, on obtient ainsi la concentration massique de ce dernier.

Cette méthode peut également être utilisée pour quantifier le collagène dans des matrices fibrillées. Toutefois, on obtiendra dans ce cas le pourcentage massique en collagène.

## 3 – Caractérisation de la pureté : électrophorèse en condition dénaturante.

La pureté de nos solutions de collagène est caractérisée par une électrophorèse en condition dénaturante ou SDS-PAGE. Les techniques d'électrophorèse consistent à séparer des molécules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Dans le cas de la SDS-PAGE, on utilise une molécule tensioactive, le sodium dodécyl sulfate (pour SDS) afin de dénaturer la conformation des protéines. Le SDS est composé d'une longue chaîne alkyl apolaire et d'un groupement sulfate chargé négativement. Par sa chaîne alkyl apolaire, le SDS peut se fixer au niveau des zones hydrophobes de la protéine et les « solubiliser ». Les protéines sont ainsi dépliées et chargées négativement. La charge de la protéine dépend alors de la quantité de SDS liée à sa surface ; c'est à dire :

- de la longueur de la protéine
- de la quantité d'acides aminés hydrophobes sur la protéine
- de l'état de glycosylation de la protéine

En général, la répartition de SDS sur les protéines étant assez uniforme, on considère que la séparation se fait en fonction de la masse moléculaire *apparente* de la protéine. Afin d'être dans des conditions totalement dénaturantes, on ajoute un réducteur de pont disulfures à l'échantillon (ex :  $\beta$ -

mercaptoéthanol) et on le chauffe à 100°C pendant quelques minutes pour rompre les liaisons hydrogènes. Dans le cas du collagène, on fait migrer des chaînes  $\alpha$  et des dimères de chaînes  $\alpha$  notés «  $\beta$  ».

Les protéines migrent au sein d'un gel de polyacrylamide réticulés par des monomères bis-acrylamides. En modifiant la concentration en monomère acrylamide ou le rapport acrylamide/bis-acrylamide, on module la porosité du gel. Le contrôle de cette porosité permet de définir la gamme de poids moléculaire que l'on souhaite discriminer. Un gel dense, avec de petits pores, est efficace pour séparer des protéines de faible poids moléculaire. A l'inverse, on utilise un gel lâche avec de gros pores pour caractériser des protéines de haut poids moléculaire.

Dans le système développé par Ornstein et Davis [43], les protéines migrent successivement à travers deux gels :

- **un gel de concentration** sur la partie haute. Il s'agit d'un gel lâche (5% en acrylamide, pH = 6,8) dans lequel on ajoute de la glycine, un composé qui migre plus lentement que les protéines. Sous l'effet du champ électrique, le déplacement de la glycine permet de concentrer spatialement les protéines (indifféremment de leur masse moléculaire). Le but est d'aligner les protéines avant de les faire migrer en fonction de leur masse.
- **un gel de migration** sur la partie basse. Ce gel est plus dense (10% en acrylamide) et a un pH différent (pH = 8,8) du gel de concentration. Il en résulte que la glycine migre plus vite que les protéines dans le gel de migration. En changeant de gel, on commence réellement la séparation de protéines en fonction de leur masse moléculaire apparente.

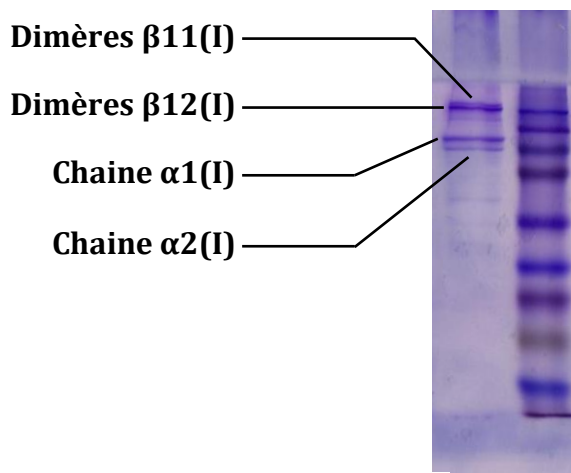
Après la migration, les protéines sont révélées par une coloration au bleu de Coomassie. En comparant leur migration à celles de marqueurs de poids moléculaire et en utilisant la relation (1), on peut alors attribuer une masse moléculaire à chaque bande.

$$\log (\text{masse moléculaire}) = a (\text{mobilité relative}) + b \quad (1)$$

où la mobilité relative d'une protéine est définie comme le rapport entre sa distance de migration et la distance de migration du front.

La figure 6 est un gel typique obtenu à partir d'une solution de collagène purifié au laboratoire. On note la présence de quatre bandes intenses, les bandes caractéristiques du collagène. Les deux bandes autour de 100 kDa correspondent aux chaînes  $\alpha 1(I)$  et  $\alpha 2(I)$ . Les bandes autour de 200 kDa sont attribuées aux dimères  $\beta 12(I)$ . On peut également noter la présence de quelques bandes moins intenses. Elles pourraient correspondre à de l'albumine (présente en grande quantité dans le sang), à de l'élastine (autre protéine de la matrice extracellulaire) ou bien à des chaperons du collagène (HSP 47). Toutefois, leur présence en très faible quantité, n'empêche pas la formation des phases cristallines liquides du collagène.

Les protocoles détaillés relatifs à l'extraction et au dosage du collagène ainsi qu'à l'électrophorèse en condition dénaturante sont fournis en annexe.



**Figure 6:** Gel d'électrophorèse en condition dénaturante. A gauche, solution de collagène. A droite, marqueur de poids moléculaire.

### Bibliographie :

- [1] – FRATZL P. Collagen : Structure and Mechanics, an Introduction. In : FRATZL P. (dir.). *Collagen – Structure and Mechanics*. New York : Springer US, 2008, chapitre 1, p. 1-13. ISBN : 978-0-387-73905-2
- [2] – IZQUIERDO E. *Caractérisation des effets de la chaleur sur des cuirs de tannage végétal et développement d'une stratégie de restauration par voie enzymatique*. Thèse de doctorat : Science de la vie et de la santé, spécialité Biochimie. Université de Cergy-Pontoise : 2016.
- [3] – WANG Y., AZAÏS T., ROBIN M., VALLEE A., CATANIA C., LEGRIEL P., PEHAU-ARNAUDET G., BABONNEAU F., GIRAUD-GUILLE M.M., NASSIF N. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nature Materials*, 2012, vol 11, p. 724-733. DOI : 10.1038/nmat3362.
- [4] – TIDU A., GHOUBAY-BENALLAOUA D., LYNCH B., HAYE B., ILLOUL C., ALLAIN J.M., BORDERIE V., MOSSER G. Development of human corneal epithelium on organized fibrillated transparent collagen matrices synthesized at high concentration. *Acta Biomaterialia*, 2015, vol 22, p. 50-58. DOI : 10.1016/j.actbio.2015.04.018.
- [5] – SWEENEY S.M., ORGEL J.P., FERTALA A., Mc AULIFFE J.D., TURNER K.R., DI LULLO G.A., CHEN S., ANTIPOVA O., PERUMAL S., ALA-KOKKO L., FORLINO A., CABRAL W.A., BARNES A.M., MARINI J.C., SAN ANTONIO J.D. Candidate Cell and Matrix Interaction Domains on the Collagen Fibril, the Predominant Protein of Vertebrates. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, vol 283, n°30, p. 21187-21197. DOI : 10.1074/jbc.M709319200.
- [6] – ECKES B., NISCHT R., KRIEG T. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 2010, vol 4, n°3. DOI : 10.1186/1755-1536-3-4
- [7] – GRINNELL F. Fibroblast biology in three dimensional collagen matrices. *TRENDS in Cell Biology*, 2003, vol 13, n°5, p. 264-269. DOI :

10.1016/S0962-8924(03)00057-6

- [8] – LEE C.H., SINGLA A., LEE Y. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, vol 221, p. 1-22. PII : S0378-5173(01)00691-3
- [9] – ABOU NEEL E.A., BOZEC L., KNOWLES J.C., SYED O., MUDERA V., DAY R., KEUN HYUN J. Collagen - Emerging collagen based therapies hit the patient. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, vol 65, p. 429-456. DOI : 10.1016/j.addr.2012.08.010
- [10] – HELARY C., PANDIT A. Collagen-based biomaterials for regenerative medicine. In : MANO J.F. (dir.). *Biomimetic approaches for biomaterials development*. Wiley, 2012, chapitre 3, p. 55-74. ISBN: 9783527329168. DOI : 10.1002/9783527652273.ch3
- [11] – ALVAREZ G.S., HELARY C., MEBERT A.M., WANG X., CORADIN T., DESIMONE M.F. Antibiotic-loaded silica nanoparticle-collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. *Journal of Material Chemistry B*, 2014, vol 2, p. 4660-4670. DOI : 10.1039/c4tb00327f
- [12] – HULMES D.J.S. Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In : FRATZL P. (dir.). *Collagen – Structure and Mechanics*. New York : Springer US, 2008, chapitre 2, p. 15-47. ISBN : 978-0-387-73905-2.
- [13] – GOBEAUX F. *Phases denses de collagène de type I : Transition isotrope/cholestérique, fibrillogenèse et minéralisation*. Thèse de doctorat : Biophysique Moléculaire. Paris, Université Pierre et Marie Curie : 2007.
- [14] – RAMACHANDRAN J.N. Stereochemistry of collagen. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1988, vol 31, p. 1-16.
- [15] – PROCKOP D.J., FERTALA A. Inhibition of the self-assembly of collagen I into fibrils with synthetic peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, vol 273, n°25, p. 15598-15604.
- [16] – MU C., LI D., LIN W., DING Y., ZHANG G. Temperature induced denaturation of collagen in acidic solution. *Biopolymers*, 2007, vol 86, n°4, p. 282-287. DOI : 10.1002/bip.20742.
- [17] – BHATNAGAR R.S., GOUGH C.A. Circular dichroism of collagen and related polypeptides. In : FASMAN G.D. (dir.). *Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. New York : Plenum Press, 1996, chapitre 6, p. 183-199. ISBN : 978-1-4419-3249-5
- [18] – DE SA PEIXOTO P., LAURENT G., AZAÏS T., MOSSER G. Solid-state NMR Study Reveals Collagen I Structural modifications of amino acid side chains upon fibrillogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, vol 288, n°11, p. 7528-7535. DOI : 10.1074/jbc.M112.390146.
- [19] – BERISIO R., DE SIMONE A., RUGGIERO A., IMPROTA R., VITAGLIANO L. Role of side chains in collagen triple helix stabilization and partner recognition. *Journal of peptide science*, 2009, vol 15, p. 131-140. DOI : 10.1002/psc.1082.
- [20] – LI Y., ASADI A., MONROE M.R., DOUGLAS E.P. pH effects on collagen fibrillogenesis in vitro: Electrostatic interactions and phosphate binding. *Materials Science and Engineering C*, 2009, vol 29, p. 1643-1649. DOI : 10.1016/j.msec.2009.01.001
- [21] – OECHSLE A.M., WITTMANN X., GIBIS M., KOHLUS R., WEISS J.

- Collagen entanglement influenced by the addition of acids. *European Polymer Journal*, 2014, vol 58, p. 144-156. DOI : 10.1016/j.eurpolymj.2014.06.015.
- [22] – OECHSLE A.M., WITTMANN X., GIBIS M., KOHLUS R., WEISS J. Modulation of collagen by addition of Hofmeister salts. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, vol 79, p. 518-526. DOI : 10.1016/j.ijbiomac.2015.05.023.
  - [23] – BRODSKY B., PERSIKOV A. Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in protein chemistry*, 2005, vol 70, p. 301-339. DOI : 10.1016/S0065-3233(04)70009-1.
  - [24] – ROSENBLOOM J., HARSCH M., JIMENEZ S. Hydroxyproline content determines the denaturation temperature of chick tendon collagen. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1973, vol 158, p. 478-484.
  - [25] – TERRIEN A. *Synthèse et étude structurale multi-échelle de peptides mimes de collagène*. Thèse de doctorat : Biochimie. Paris, Université Pierre et Marie Curie : 2015.
  - [26] – ABOU NEEL E.A., BOZEC L., KNOWLES J.C., SYED O., MUDERA V., DAY R., HYUN J.K. Collagen — Emerging collagen based therapies hit the patient. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, vol 65, p. 429-456.
  - [27] – RESORBA Medical GmbH (en ligne). Consulté le 11/05/16. Disponible à l'adresse : <http://www.resorba.com/index.php>
  - [28] - LE JOLIF J.C., HUC A. Le collagène. In : *L'observatoire des Cosmétiques* (en ligne). Publié le 27/01/16. Consulté le 11/05/16. Disponible à l'adresse : <http://www.observatoiredescosmetiques.com/pro/actualite/ingredients/le-collagene-3435>
  - [29] - Japon. La bière au collagène qui nous rend plus beaux. In : *Ouest France* (en ligne). Publié le 24/04/15. Consulté le 4/06/15. Disponible à l'adresse : <http://www.ouest-france.fr/insolite/la-biere-au-collagene-qui-nous-rend-plus-beaux-3347720>
  - [30] – LANGTON A.K., GRIFFITHS C.E.M., SHERRATT M.J., WATSON R.E.B. Cross-linking of structural proteins in ageing skin: an in situ assay for the detection of amine oxidase activity. *Biogerontology*, 2014, vol 14, p. 89-97. DOI : 10.1007/s10522-012-9394-3.
  - [31] – WERKMEISTER J.A., RAMSHAW J.A.M. Recombinant protein scaffolds for tissue engineering. *Biomedical Materials*, 2012, vol 7. DOI : 10.1088/1748-6041/7/1/012002.
  - [32] – NEUBAUER A., NEUBAUER P., MYLLYHARJU J. High-level production of human collagen prolyl 4-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Matrix Biology*, 2005, vol 24, p. 59-68. DOI : 10.1016/j.matbio.2004.11.004.
  - [33] – FibroGen (en ligne). Consulté le 25/04/2016. Disponible à l'adresse : <http://www.fibrogen.com>
  - [34] – JOHN D.C.A., WATSON R., KIND A.J., SCOTT A.R., KADLER K.E., BULLEID N.J. Expression of an engineered form of recombinant procollagen in mouse milk. *Nature Biotechnology*, 1999, vol 17, p. 385-389.
  - [35] – ADACHI T., WANG X., MURATA T., OBARA M., AKUTSU H., MACHIDA

- M., UMEZAWA A., TOMITA M. Production of a non-triple helical collagen a chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, vol 106, n°6, p. 860-870. DOI : 10.1002/bit.22752.
- [36] – KATO T., KAJIKAWA M., MAENAKA K., PARK E.Y. Silkworm expression system as a platform technology in life science. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, vol 85, p. 459-470. DOI : 10.1007/s00253-009-2267-2.
  - [37] – RUGGIERO F., EXPOSITO J.Y., BOURNAT P., GRUBER V., PERRET S., COMTE J., OLAGNIER B., GARRONE R., THEISEN M. Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Letters*, 2000, vol 469, p. 132-136. PII : S0014-5793(00)01259-X
  - [38] – PERRET S., MERLE C., BERNOCCO S., BERLAND P., GARRONE R., HULMES D.J.S., THEISEN M., RUGGIERO F. Unhydroxylated triple helical collagen I produced in transgenic plants provides new clues on the role of hydroxyproline in collagen folding and fibril formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol 276, n°47, p. 43693-43698. DOI : 10.1074/jbc.M105507200.
  - [39] – STEIN H., WILENSKY M., TSAFRIR Y., ROSENTHAL M., AMIR R., AVRAHAM T., OFIR K., DGANY O., YAYON A., SHOSEYOV O. Production of bioactive, post-translationally modified, heterotrimeric, human recombinant type-I collagen in transgenic tobacco. *Biomacromolecules*, 2009, vol 10, p. 2640-2645. DOI : 10.1021/bm900571b.
  - [40] – CollPlant (en ligne). Consulté le 25/04/2016. Disponible à l'adresse : <http://www.collplant.com>
  - [41] – EASTOE J.E. The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochemical Journal*, 1955, vol 61, n°4 p. 589-600. DOI : 10.1042/bj0610589.
  - [42] – DA SILVA C.M.L., SPINELLI E., RODIGUES S.V. Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/ hydroxyproline assay. *Food Chemistry*, 2015, vol 173, p. 619-623. DOI : 10.1016/j.foodchem.2014.10.073.
  - [43] – Overview for electrophoresis and western blotting (en ligne). Consulté le 25/04/2015. Disponible à l'adresse : [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/appendix/elec\\_blotting/overview.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/appendix/elec_blotting/overview.pdf)
  - [44] – Extracellular Matrix of Animal Cells (en ligne). Consulté le 31/08/2016. Disponible à l'adresse : <https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/cell-structure-4/connections-between-cells-and-cellular-activities-63/extracellular-matrix-of-animal-cells-324-11461/>
  - [45] – SILVER F.H., HORVATH I., FORAN D.J. Mechanical implications of the domain structure of fibril forming collagens: comparison of the molecular and fibrillar flexibilities of the a-chains found in types I, II, and III collagen. *Journal of Theoretical Biology*, 2002, vol 216, p. 243-254. DOI : 10.1006/jtbi.2002.2542.
  - [46] – SILVER F.H., EBRAHIMI A., SNOWHILL P.B. Viscoelastic properties of self-assembled type I collagen fibers: molecular basis of elastic and viscous behaviors. *Connective Tissue Research*, 2002, vol 43, p. 569-580.





## Partie I - Chapitre 2 : Les techniques d'observations

### I – Microscopie Electronique à Transmission (MET) [10].

#### 1 – Principe du MET.

La microscopie électronique à transmission est souvent comparée à la microscopie optique classique : on irradie un échantillon avec un faisceau d'électrons à haute vitesse et les électrons transmis forment ainsi l'image de cet échantillon sur un écran phosphorescent. L'utilisation d'électrons, dont la longueur d'onde est très petite ( $\lambda_{\text{électron}} \approx 4$  picomètre pour une tension de 100 kV à la source) permet de sonder la matière à l'échelle nanométrique. C'est cette faible longueur d'onde qui permet de passer sous la limite de la microscopie photonique. De nos jours, le MET à haute résolution possède même la limite de résolution la plus basse (environ 0,8 Å).

A la différence de la microscopie optique, le contraste en MET ne repose pas uniquement sur l'absorption d'électrons par l'échantillon. Quand les électrons traversent l'échantillon, trois cas de figures se présentent :

- L'électron passe au travers de l'échantillon sans rencontrer d'atomes. Sa trajectoire n'est alors pas déviée. Il peut passer le diaphragme objectif et continuer sa progression jusqu'à l'écran.
- L'électron passe au travers de l'échantillon sans modifier notablement sa trajectoire initiale mais en perdant de l'énergie. Il participe à la formation de l'image de l'échantillon. De plus, en équipant le microscope d'un analyseur d'énergie, on peut réaliser de la spectroscopie de pertes d'énergie des électrons. On parle alors de microscopie électronique analytique : l'échantillon peut être cartographié chimiquement à l'échelle de l'atome !
- L'électron traverse l'échantillon en passant à proximité d'un atome. Il est alors dévié de sa trajectoire sans perte d'énergie et peut éventuellement être arrêté par le diaphragme de l'objectif afin d'augmenter le contraste d'amplitude. Ce sont ces électrons qui sont à l'origine du contraste de phase en MET.

Si le passage aux électrons a permis de baisser dramatiquement la limite de résolution des microscopes, leur utilisation implique également de nombreuses contraintes techniques.

#### 2 – Contraintes associées à l'utilisation d'un faisceau d'électrons.

Afin d'irradier localement l'échantillon, le faisceau d'électron doit pouvoir être focalisé. A la fin des années 20, Busch a démontré que l'application d'un champ magnétique permet la focalisation d'un faisceau d'électron de la même manière qu'une lentille focalise la lumière. À partir d'une bobine circulaire enchâssée dans une culasse de fer, on a ainsi construit les premières lentilles électroniques. Cependant, ces lentilles sont à l'origine de nombreuses aberrations. Elles imposent, entre autre, que les électrons utilisés aient tous la même vitesse. Pour régler ce problème, les microscopes récents ont été équipés

de monochromateurs en sortie de source. Il est également nécessaire d'implémenter des stigmatiseurs, en aval de l'objectif, qui corrigent les autres aberrations liées aux lentilles.

Plusieurs contraintes découlent du faible pouvoir de pénétration des électrons. Les électrons sont en effet rapidement diffusés par la matière (solide ou gazeuse), même à haute vitesse. Par conséquent, la colonne doit être maintenue sous un vide poussé (de l'ordre du mPa). De plus, les échantillons étudiés doivent être extrêmement minces (quelques dizaines de nm d'épaisseur). Plusieurs stratégies ont été élaborées, en fonction de l'objet étudié, afin d'obtenir des échantillons observables au MET. Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé l'inclusion dans une matrice polymère associée à l'ultramicrotomie pour étudier les matériaux denses. Les solutions de particules de collagène fibrillé ont quant à elles été observées par cryo-MET.

### 3 – Préparation des matériaux denses pour l'observation MET.

La préparation des échantillons s'effectue en 4 étapes : La fixation, la déshydratation, l'infiltration et l'inclusion.

- **La fixation.** Pour éviter une modification de la structure lors de l'étape de déshydratation ou d'inclusion, les matériaux biologiques sont réticulés chimiquement. On réalise une première étape de fixation avec une solution de glutaraldéhyde (ou de paraformaldéhyde) dans un tampon à pH neutre. Le glutaraldéhyde est un réticulant idéal pour les protéines puisqu'il réagit en se liant aux fonctions amines libres. Après un lavage de l'échantillon, on effectue la deuxième étape de fixation. On utilise cette fois-ci du tétraoxyde d'osmium qui réagit sur le matériau en l'oxydant. L'utilisation de tétraoxyde d'osmium permet également d'augmenter le contraste en microscopie électronique.
- **La déshydratation.** Il s'agit d'une étape de substitution progressive de l'eau du matériau par de l'éthanol. Cette étape permet de rendre le matériau plus hydrophobe et de faciliter les substitutions avec des solvants apolaires.
- **L'infiltration.** Il s'agit d'une série de substitutions de solvant organiques permettant l'infiltration de la résine araldite, hydrophobe, dans tout le matériau. En plusieurs bains, on passe de l'éthanol à l'oxyde propylène puis à la résine pure. Cette étape est importante puisque le matériau doit être totalement imprégné de résine afin d'être solidaire de son bloc.
- **L'inclusion.** Après avoir coulé la résine dans des moules rectangulaires (blocs), on dispose un morceau d'échantillon dans chaque bloc. La résine est ensuite polymérisée à chaud (60°C) pendant 3 jours.

Les blocs, pavés rigides et transparents contenant l'échantillon, peuvent ensuite être découpés en fines coupes (environ 30 nm) à l'aide d'un ultramicrotome (EM UC7, Leica). Cette opération très technique est réalisée par Bernard Haye dans notre laboratoire. Les coupes ultrafines sont finalement « contrastées » par une solution d'acétate d'uranyl. Les matériaux biologiques étant constitués d'atomes légers, ils sont relativement transparents aux électrons. Pour l'observation au MET, il est souvent nécessaire de les imprégner avec des atomes lourds (ex : uranium, plomb, osmium, etc.).

La préparation des échantillons pour l'ultramicrotomie peut introduire de nombreux artefacts : le matériau n'est pas observé dans son solvant d'origine, la structure du matériau peut-être sévèrement altérée par la déshydratation, des composés hydrophobes (lipides) sont potentiellement solubilisés dans les solvants organiques utilisés au cours de l'infiltration, etc. Les contraintes mécaniques induites par la coupe peuvent également être délétères pour l'échantillon. Pour minimiser les problèmes lors de la coupe, le choix de la résine est extrêmement important. Dans l'idéal, il faut que la résine polymère et le matériau aient les mêmes propriétés mécaniques. Enfin, il est absolument nécessaire que la résine soit bien imprégnée dans l'échantillon : la résine polymérisée et l'échantillon doivent former un continuum pour réaliser une coupe propre.

Le protocole de préparation des échantillons pour le MET est indiqué de manière détaillée en annexe.

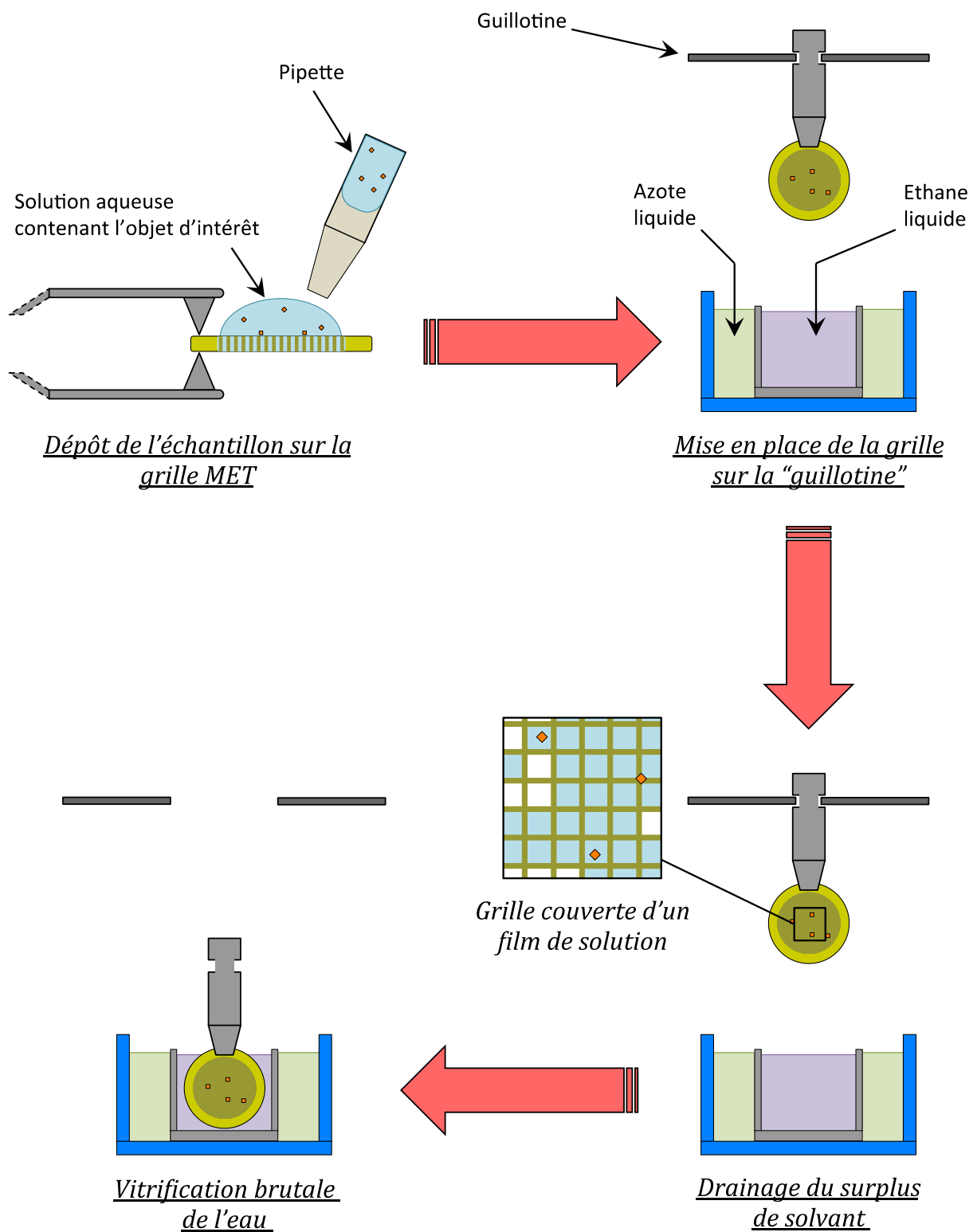
#### 4 – La cryo-microscopie électronique : principe (voir figure 1).

La cryo-microscopie électronique consiste à observer directement un objet solubilisé dans l'eau en gelant rapidement une couche mince de la solution d'intérêt. Cette technique permet donc d'observer des protéines dans leur environnement naturel. Toutefois, elle impose plusieurs contraintes.

La couche doit être suffisamment mince pour que les électrons soient transmis. En pratique, la solution est déposée sur une grille métallique (cuivre, or ou nickel) recouverte d'un film de carbone et présentant un maillage micrométrique. Le surplus de solution est drainé avec un papier absorbant, laissant sur la grille quelques gouttes micrométriques piégées dans les trous. La grille est alors violemment précipitée dans l'éthane liquide (environ  $-180^{\circ}\text{C}$ ). L'eau fige quasi-instantanément dans un état vitreux.

Il s'agit de la seconde contrainte en cryo-MET. En effet, si l'eau cristallise, on risque de modifier dramatiquement la structure de la protéine étudiée. De plus, l'eau sous forme cristalline diffracte efficacement les électrons, empêchant la visualisation des objets qui y sont piégés.

Enfin, la troisième contrainte concerne la conservation de l'eau sous sa forme vitreuse. Si la grille est légèrement réchauffée, l'eau repasse alors sous une forme cristalline. Il est donc absolument nécessaire de travailler dans l'azote liquide à tout moment. Cela s'applique également au porte-échantillon du microscope qui comprend un système de réfrigération. Travailler à très basse température permet toutefois d'augmenter la durée de vie des échantillons sous le faisceau.



**Figure 1 : Préparation des échantillons pour le cryo-MET.**

## II – Microscopie Multiphoton [1-5].

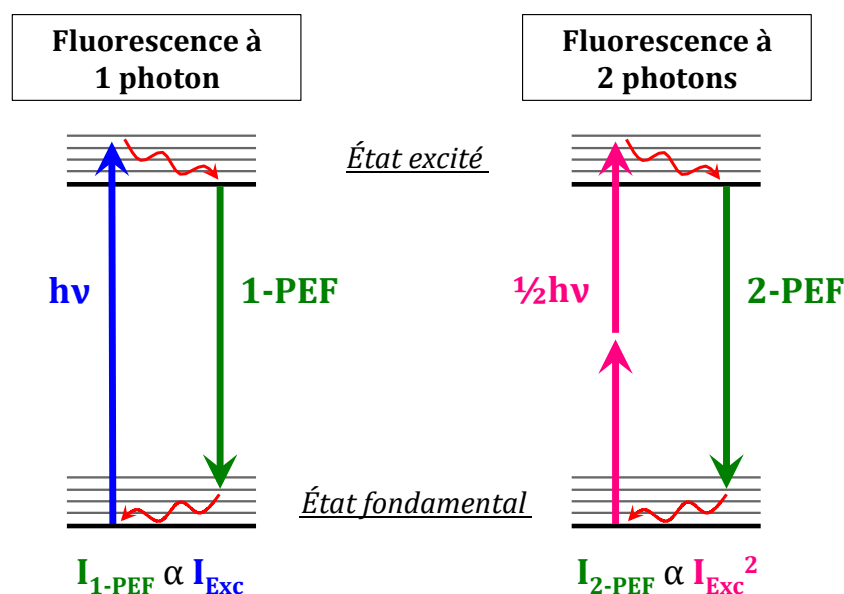
La microscopie multiphoton est basée sur l'interaction simultanée de plusieurs photons avec la matière. Les processus dont elle tire profit sont donc, par essence, des processus non-linéaires. Cette non-linéarité présente de nombreux avantages :

- une faible phototoxicité
- une résolution 3D intrinsèque
- une grande profondeur de pénétration, etc.

Le laboratoire d'optique et biosciences (L.O.B., Ecole polytechnique, CNRS, INSERM U1182 - UMR7645) a développé une plateforme de microscopie tirant partie des nombreuses interactions non-linéaires entre la lumière et la matière. Grâce à une collaboration avec Marie-Claire Schanne-Klein, chercheuse aux L.O.B., et au travail de thèse de Claire Teulon sous sa direction, nous avons eu recours à deux techniques de microscopie multiphoton :

- la microscopie de fluorescence excitée à deux photons ou 2-PEF.
- la microscopie par génération de seconde harmonique (SHG) résolue en polarisation ou P-SHG.

### 1 – Microscopie de fluorescence excitée à deux photons (2-PEF).



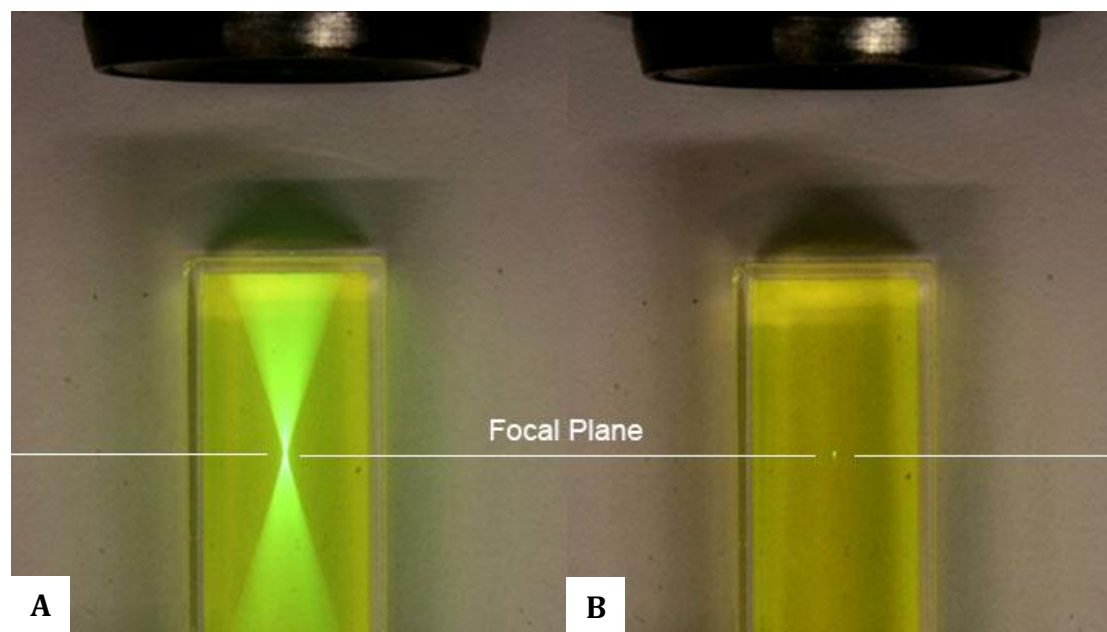
**Figure 2 :** Diagrammes de Jablonski simplifiés des processus de fluorescence excitée à 1 et 2 photons.

La fluorescence excitée à un photon repose sur l'absorption d'un photon par un fluorophore. L'énergie  $h\nu$  du photon doit correspondre à l'énergie de transition de l'état fondamental vers un des états excités de la molécule. Une partie des électrons excités relaxe ensuite vers des niveaux vibrationnels plus bas (décalage de Stokes) avant d'émettre des photons pour revenir au niveau fondamental (voir figure 2). Ce sont ces photons réémis que l'on nomme photons

de fluorescence. La fluorescence excitée à un photon est un processus linéaire : l'intensité de fluorescence est proportionnelle à l'intensité du faisceau excitateur ainsi qu'à la concentration locale en fluorophore.

La fluorescence excitée à deux photons est définie comme l'absorption simultanée de deux photons d'énergie  $\frac{1}{2}h\nu$  par un fluorophore. La somme de l'énergie des deux photons incidents,  $h\nu$ , correspond, là encore, à l'énergie de transition de l'état fondamental vers un état excité de la molécule. Le fluorophore relaxe en émettant un unique photon de fluorescence, dont l'énergie est plus faible que l'énergie de la transition électronique  $h\nu$  (décalage de Stokes dû à la relaxation vibrationnelle, voir figure 2). L'intensité de fluorescence est maintenant proportionnelle au carré de l'intensité du faisceau d'excitation : la fluorescence à deux photons est donc un processus non-linéaire. L'intensité de fluorescence reste proportionnelle à la concentration locale en fluorophore.

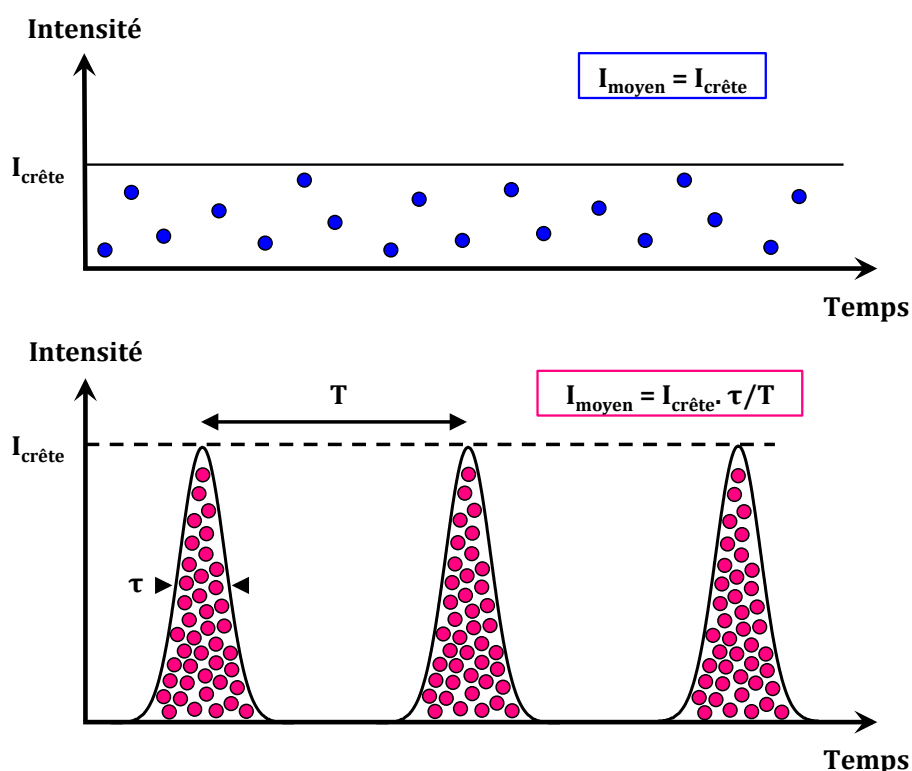
La probabilité d'une interaction simultanée entre deux photons et une molécule est très faible. Il en résulte que la fluorescence excitée à deux photons est confinée sur un petit volume ( $V = 300 \text{ nm} \times 300 \text{ nm} \times 1 \text{ }\mu\text{m}$ ) au niveau du plan focal du faisceau d'excitation (voir figure 3B). Cette propriété permet d'effectuer un sectionnement optique des échantillons et d'en réaliser une image 3D (résolution axiale intrinsèque  $\approx 1 \text{ }\mu\text{m}$ ). En comparaison, en microscopie de fluorescence conventionnelle (i.e. à 1 photon), la fluorescence est générée sur tout le trajet d'illumination (voir figure 3A). Le signal au foyer est par conséquent noyé dans le bruit émis par les fluorophores hors du plan focal. Il est cependant possible, en introduisant un diaphragme dans le dispositif, d'obtenir une bonne résolution axiale ( $\approx 0,6 \text{ }\mu\text{m}$ ) et de faire de l'imagerie tridimensionnelle. On parle alors de microscopie confocale.



**Figure 3:** Distribution spatiale de l'intensité de fluorescence pour un phénomène d'absorption à un photon (A) et à deux photons (B). Les deux cuves contiennent la même solution de fluorescéine. Sur la figure B, on observe la propriété intrinsèque de sectionnement optique du 2-PEF (d'après [8]).

Pour compenser la faible efficacité du processus d'absorption à deux photons, des lasers dits « femtoseconde » sont utilisés. Il s'agit de lasers capables d'émettre des impulsions d'une centaine de femtosecondes avec une intensité crête élevée (voir figure 4).

Pour une puissance moyenne compatible avec des échantillons biologiques ( $P_{\text{moyenne}} \approx \text{mW}$ ), on peut ainsi produire des puissances crêtes de l'ordre du kW. Fortement focalisé, ces lasers permettent d'obtenir une probabilité non négligeable d'absorption simultanée de deux photons. L'utilisation d'un laser femtoseconde, combiné avec le confinement spatial inhérent de l'absorption à deux photons, permet de réduire considérablement les effets de photoblanchiment des fluorophores.

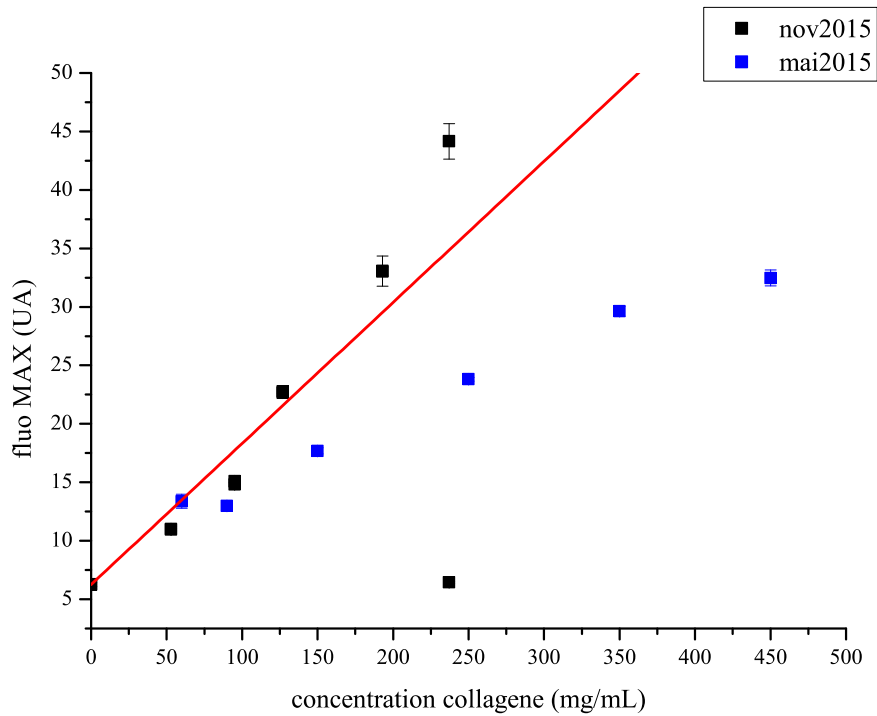


**Figure 4 :** Intensité en fonction du temps pour un laser continu (en haut) et un laser impulsionnel (en bas)

Dans le cadre de cette thèse, les fluorophores visualisés en 2-PEF sont le collagène et la gélatine. Ces deux protéines sont des fluorophores endogènes dont le rendement quantique est faible. L'origine de leur fluorescence n'est toutefois pas encore bien comprise. La gélatine, bien qu'étant une protéine dénaturée, présente les mêmes propriétés, en terme de fluorescence, que le collagène dont elle est issue. Nous avons montré que l'intensité de fluorescence du collagène (et de la gélatine) est proportionnelle à sa concentration (voir figure 5). La 2-PEF nous permet donc de mesurer la quantité de collagène (ou de gélatine) présente dans le volume focal.

Enfin, la 2-PEF présente l'avantage de pouvoir être couplée facilement avec d'autres modes de contraste non-linéaire. Dans le cadre de cette thèse, nous l'avons conjugué avec la microscopie SHG résolue en polarisation (P-SHG).

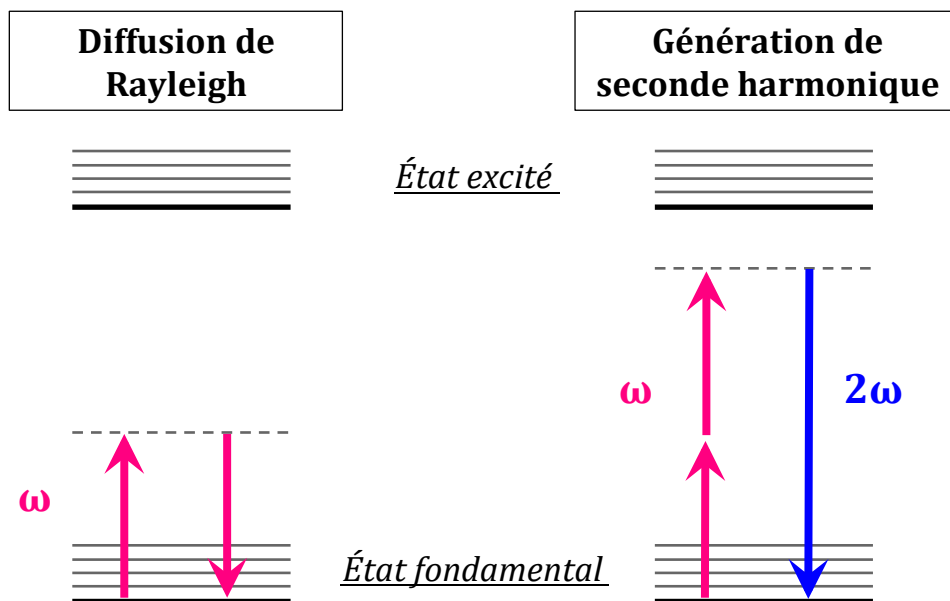




*Figure 5 : Intensité de fluorescence à deux photons en fonction de la concentration en collagène. Les mesures ont été effectuées sur deux lots de collagène.*

2 – Microscopie SHG résolue en polarisation (P-SHG).

a – Origine moléculaire du signal SHG : l'harmonophore.



*Figure 6 : Diagrammes de Jablonski simplifiés de la diffusion de Rayleigh et de la SHG.*

La SHG est un processus cohérent de diffusion non linéaire de deux photons de même fréquence  $\omega$  ( $\omega < \omega_{\text{résonance}}$ ) qui permet de générer un photon de fréquence  $2\omega$  (voir figure 6). Les phénomènes de diffusion de la lumière par la matière peuvent être abordés ici par un modèle classique. On s'intéresse plus particulièrement à l'interaction entre les photons incidents et les électrons d'un harmonophore. Lorsque l'on applique un champ électrique  $\mathbf{E}$ , les électrons se déplacent sous l'action de la force de Lorentz. On peut alors les décrire comme des dipôles électriques  $\mathbf{p}$  composés d'un moment dipolaire permanent  $\mathbf{p}_0$  (inhérent à la molécule) et d'un moment dipolaire  $\mathbf{p}(\mathbf{E})$  induit par le champ électrique incident.

$$\mathbf{p} = \mathbf{p}_0 + \mathbf{p}(\mathbf{E})$$

où  $\mathbf{p}(\mathbf{E})$  décrit la déformation du nuage électronique de l'harmonophore en réponse au champ incident. Par un développement en série de Taylor, en fonction de  $\mathbf{E}$ , on obtient alors :

$$\mathbf{p}(\mathbf{E}) = \alpha : \mathbf{E} + \beta : \mathbf{E}\mathbf{E} + \gamma : \mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E} + \dots$$

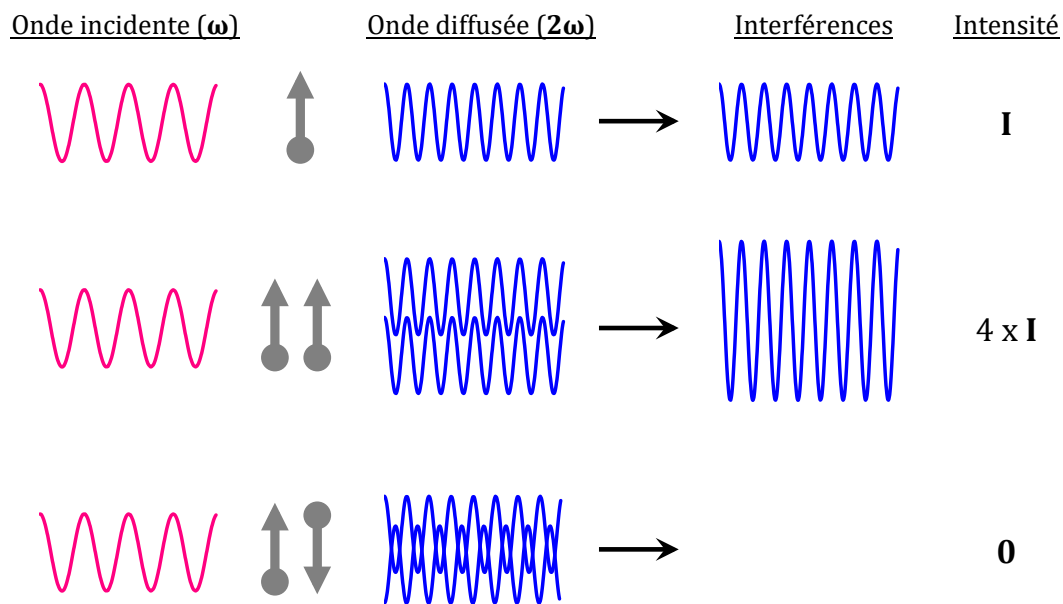
où  $\alpha$  est le tenseur de polarisabilité du nuage d'électron et  $\beta$  et  $\gamma$  sont respectivement les tenseurs d'hyperpolarisabilité du second et troisième ordre. On peut décrire alors deux comportements :

- le champ  $\mathbf{E}$  appliqué est faible. Les électrons oscillent autour de leur position d'équilibre dans un puits de potentiel harmonique. On observe une diffusion élastique des photons ou diffusion de Rayleigh (voir figure 5). Il s'agit du comportement linéaire du nuage électronique vis à vis d'un champ électrique incident.  $\mathbf{p}(\mathbf{E})$  se compose donc uniquement du premier terme de polarisabilité,  $\alpha$ .
- le champ  $\mathbf{E}$  appliqué est intense. Les électrons oscillent maintenant dans un potentiel anharmonique. Afin de décrire leur réponse sous l'effet du champ  $\mathbf{E}$ , il est nécessaire d'introduire des termes d'ordre supérieur. Les termes  $\beta : \mathbf{E}\mathbf{E}$  et  $\gamma : \mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E}$  sont respectivement à l'origine de la génération de seconde et troisième harmonique. Dans le cas d'un potentiel anharmonique symétrique,  $\mathbf{p}(\mathbf{E})$  se compose seulement des termes pairs de la série de Taylor. Ces termes pairs correspondent aux harmoniques multiples impaires de  $\omega$  (ex : THG). Par conséquent, pour générer un signal de SHG, l'harmonophore doit nécessairement être non-centrosymétrique.

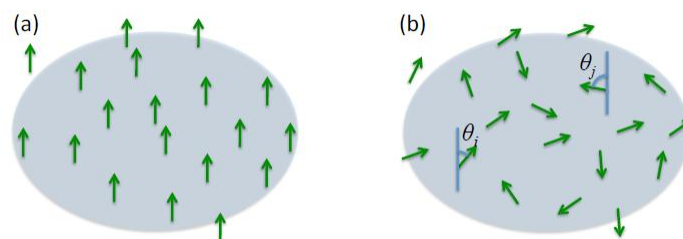
b - De la molécule à l'ensemble d'harmonophores.

Au niveau du volume d'excitation, les champs diffusés simultanément par les différents harmonophores vont interférer. Or la phase du champ diffusé à  $2\omega$  dépend de l'orientation de l'harmonophore. Considérons tout d'abord un exemple simple : l'observation de deux harmonophores (voir figure 7). Si les deux harmonophores sont orientés parallèlement, leurs signaux SHG ont la même phase et ils interfèrent de manière constructive. L'intensité du champ diffusé est alors quatre fois plus élevée que pour une molécule unique.

Au contraire, pour deux harmonophores antiparallèles, les signaux SHG générés sont en opposition de phase. Par conséquent, ils interfèrent de manière destructive : l'intensité du champ diffusé est nulle.



**Figure 7 :** Effet de l'orientation des harmonophores sur le signal SHG : cas de deux harmonophores orientés parallèlement (interférences constructives) ou anti-parallèlement (interférences destructives).



**Figure 8 :** Illustration d'un milieu permettant la SHG (a, milieu organisé) ou la diffusion hyper-Rayleigh (b, milieu isotrope) (d'après [1]).

Considérons maintenant le cas de N molécules réparties dans le plan de l'image. On peut alors distinguer deux situations (voir figure 8) :

- **Les harmonophores ont une orientation aléatoire.** La phase du champ diffusé dépend de l'orientation des harmonophores. Statistiquement, on observe donc la diffusion **non-cohérente** d'un champ émis à  $2\omega$ . Elle porte le nom de diffusion Hyper-Rayleigh et son intensité est proportionnelle au nombre N de diffuseurs. Comparée à la SHG, la diffusion Hyper-Rayleigh est un phénomène d'intensité négligeable.
- **Les harmonophores sont orientés selon la même direction.** Les champs diffusés par les harmonophores sont tous en phase. On observe alors **la somme cohérente** de tous ces champs que l'on nomme **génération de seconde harmonique**. L'intensité du signal SHG est

proportionnelle au carré du nombre N de diffuseurs. C'est l'une des caractéristiques des rayonnements cohérents.

Pour conclure, la SHG est un processus cohérent dont la génération est soumise à la condition de non-centrosymétrie. Cette condition concerne à la fois la structure des harmonophores mais aussi leur répartition spatiale. C'est également cette condition qui est à l'origine de la spécificité du signal SHG. De plus, afin d'être efficace, la SHG requiert une haute densité de diffuseurs dans le volume d'excitation. Ces caractéristiques font de la microscopie SHG une technique de choix afin d'observer l'organisation des phases cristallines liquides lyotropes d'harmonophores.

c – Le collagène, un harmonophore endogène.

Les molécules de collagène, organisées sous forme de phases cristallines liquides [6] ou insérées au sein d'une fibrille [7], sont capables de générer un signal SHG. On notera qu'il s'agit dans les deux cas de systèmes denses en harmonophores pour lesquels la condition de non-centrosymétrie est respectée. Il n'est d'ailleurs pas possible d'observer une molécule unique de collagène par SHG, la densité de groupements diffusants étant trop faible. Le diffuseur élémentaire, au sein de la triple hélice, est la liaison peptidique [1, 4]. La microscopie SHG permet, par ses spécificités explicitées ci-dessus, de sonder l'organisation tridimensionnelle des liaisons peptidiques en prenant en compte la structure hiérarchique des assemblages de collagène (voir figure 9). Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé la microscopie SHG afin d'observer des phases cristallines-liquides de collagène non fibrillé (cf Partie B – Chapitre 2). Nous nous sommes donc placé à l'échelle de la triple hélice. Cette dernière peut être assimilée à un cylindre sur lequel sont régulièrement disposées les liaisons peptidiques. Nous avons également analysé des matrices fibrillées (cf Partie B – Chapitre 3).

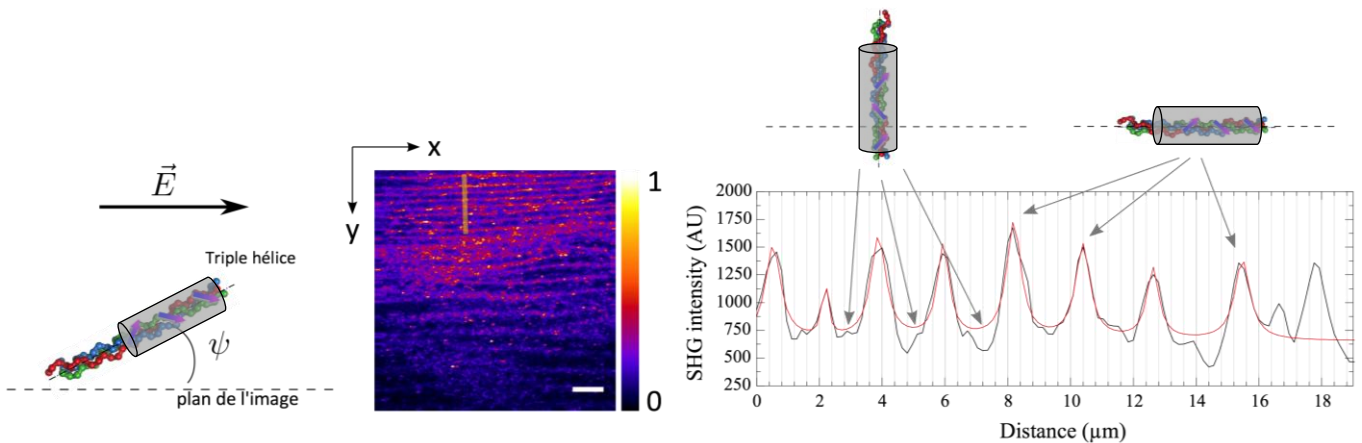
d – Effet de l'orientation du collagène sur l'intensité du signal SHG.

A densité égale dans le volume d'excitation, et pour des harmonophores orientés dans le même sens, il y aura plus de signal si les harmonophores sont alignés avec la polarisation incidente.

En appliquant une polarisation circulaire à **E** (dans le plan de l'image), on peut s'affranchir de l'effet de l'orientation moyenne des triples hélices sur l'intensité du signal SHG (voir infra). Le signal SHG enregistré est alors, en première approximation, proportionnel à  $\cos^2(\psi)$ , où  $\psi$  est l'angle des triples hélices par rapport au plan de l'image (voir figure 9), appelé aussi angle hors plan. On remarque que le signal SHG est d'autant plus atténué que l'angle  $\psi$  est important. Pour un ensemble de triples hélices perpendiculaires au plan de l'image, l'intensité SHG est alors théoriquement nulle.

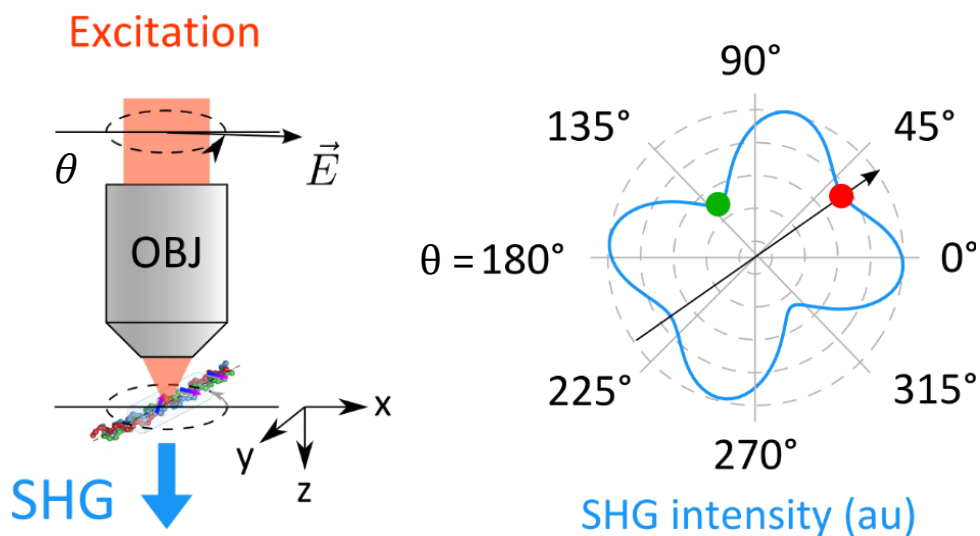
Cette méthode d'imagerie nous a permis de discriminer différents types de phases cristallines liquides [9]. Toutefois, pour obtenir des informations sur

l'orientation des triples hélices, il est nécessaire d'avoir recours à la SHG résolue en polarisation ou P-SHG.



**Figure 9 :** Effet de l'angle hors plan  $\psi$  sur l'intensité du signal SHG. Au centre, image en microscopie SHG d'une phase cristalline liquide de collagène. A l'aide du profil d'intensité à droite, on identifie une phase organisée en contre-plaqué (voir Partie II-Chapitre 2). Le collagène est alternativement dans le plan de l'image ou perpendiculaire au plan de l'image (d'après [4]).

e – Microscopie SHG résolue en polarisation.



**(9a) :** Excitation avec une polarisation linéaire à différents angles  $\theta$

**(9b) :** Diagramme d'intensité  $I_{2\omega}(\theta)$  (allure pour le collagène)

**Figure 10 :** Principe des mesures résolues en polarisation et diagramme angulaire typique du collagène (d'après [4]).

De manière simple, la P-SHG consiste à combiner la microscopie en lumière polarisée avec la microscopie SHG. En pratique, on excite l'échantillon avec un champ incident de polarisation linéaire et d'orientation  $\theta$  (voir figure 10a). L'intensité SHG est mesurée pour chaque angle  $\theta$  ce qui revient à sonder

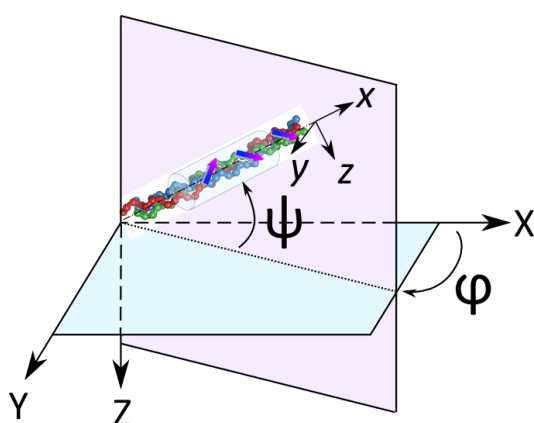
l'orientation des fibrilles dans le volume d'excitation. On peut alors représenter le diagramme angulaire d'intensité SHG en fonction de l'orientation de la polarisation (voir figure 10b). La forme atypique de ce diagramme est due à la non-linéarité du processus de SHG.

Claire Teulon a effectué, au cours de sa thèse [4, 5], un calcul analytique de l'intensité SHG en fonction de la polarisation incidente. Elle est parvenue, dans le cadre de la symétrie de Kleinman, à l'expression suivante :

$$I_{2\omega}(\theta) = (I_{\omega})^2 \cos^2(\psi) \times [A(\psi) \cos(4(\theta - \varphi)) + B(\psi) \cos(2(\theta - \varphi)) + C(\psi)]$$

où :

- $I_{\omega}$  et  $I_{2\omega}$  sont respectivement les intensités du champ incident et du signal SHG.
- $\theta$  est l'orientation de la polarisation incidente.
- $\varphi$  est l'orientation moyenne dans le plan de l'image des triples hélices contenues dans le volume focal (voir figure 11).
- $A(\psi)$ ,  $B(\psi)$  et  $C(\psi)$  sont des paramètres dépendant de  $\psi$ , l'angle hors plan des triples hélices de collagène.



**Figure 11 :** Angles  $\varphi$  et  $\psi$  caractérisant l'orientation moyenne des triples hélices dans le volume focal (d'après [4]).

En ajustant la transformée de Fourier de  $I_{2\omega}(\theta)$  avec cette expression, on peut directement obtenir **l'orientation  $\varphi$  des molécules de collagène** dans le plan de l'image. A partir des paramètres  $A(\psi)$ ,  $B(\psi)$  et  $C(\psi)$ , on peut également en déduire deux autres informations [4, 5] :

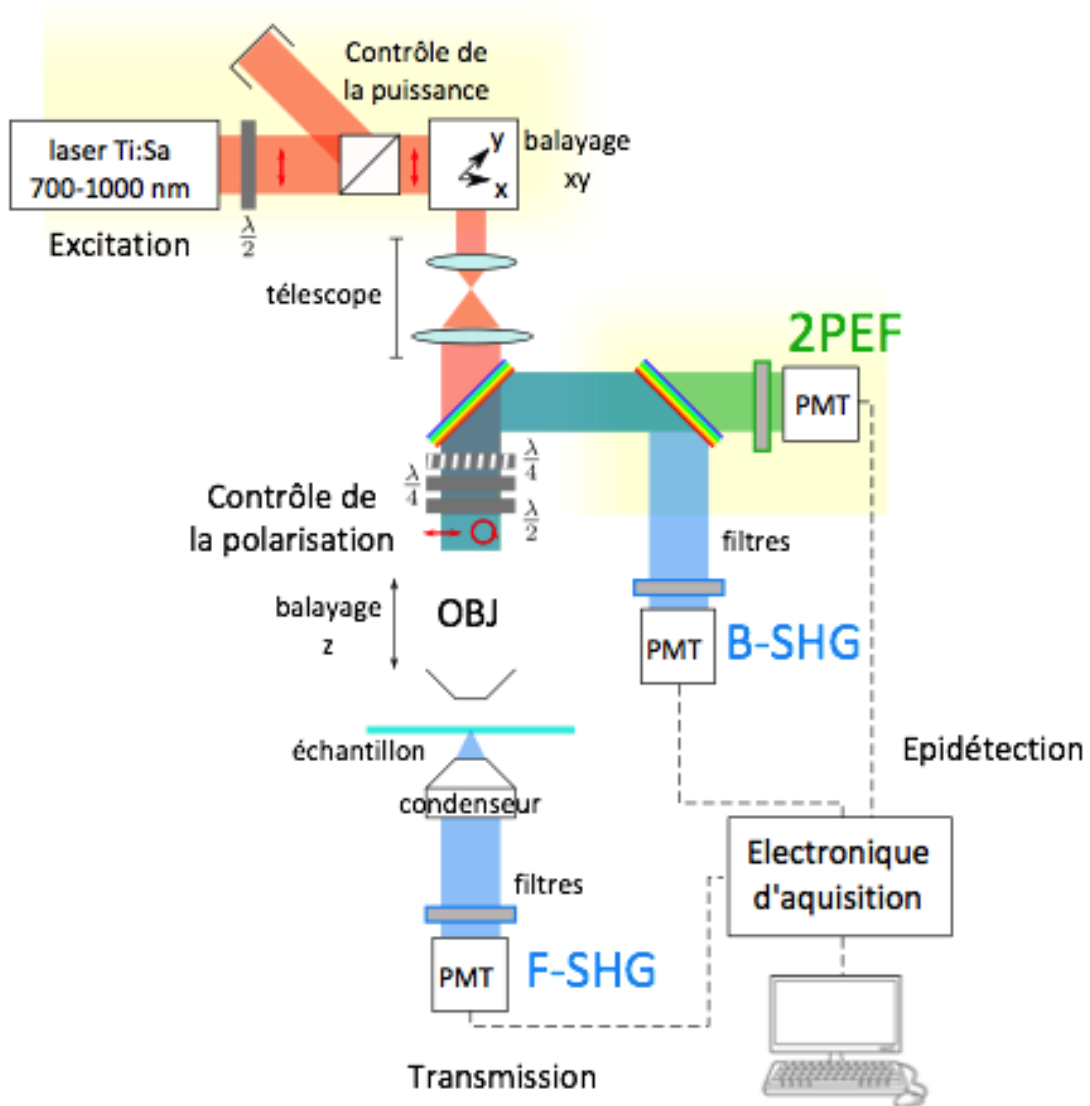
- **L'intensité SHG moyenne**, paramètre mesuré aussi en microscopie SHG.
- **Le paramètre d'anisotropie,  $\rho$ .**

L'intensité SHG et  $\rho$  dépendent tous les deux de l'orientation 3D des harmonophores et du désordre. Si on considère une phase cristalline liquide, les triples hélices y sont localement orientées le long d'une direction moyenne ou directeur (cf Partie II). Le désordre correspond alors à un écart au directeur.

Pour résumer, la microscopie P-SHG est une technique sélective des milieux denses et organisés (non-centrosymétriques) qui nous permet d'observer les phases cristallines liquides du collagène de type I. L'utilisation de

processus non-linéaire confère une résolution 3D intrinsèque à ce mode d'imagerie. Par la polarisation, nous pouvons aussi déterminer l'orientation moyenne des triples hélices dans le volume d'excitation ( $1 \mu\text{m}^3$ ) et ce en chaque point du volume 3D de l'échantillon (par déplacement du volume d'excitation). Enfin, elle peut être couplée à la 2-PEF, nous donnant ainsi accès à la concentration moyenne en collagène et en gélatine. Il s'agit donc d'un outil d'analyse d'une puissance extraordinaire adapté à l'étude de ces systèmes complexes.

f – Description du microscope.



*Figure 12 : Schéma du microscope (d'après [4]).*

Le microscope utilisé a été conçu au LOB par Emmanuel Beaurepaire. Son schéma de principe est représenté en figure 12. Il est piloté par un programme Labview. Une modification de ce programme, permettant le contrôle de la

polarisation du champ incident, a été mise en place par Ivan Gusachenko, Gaël Latour, Claire Teulon et Marie-Claire Schanne-Klein.

La configuration utilisée pour toutes les expériences permet une imagerie multimodale SHG/2-PEF. Les signaux sont collectés vers l'avant (transmission 2-PEF, F-SHG) ou en épidétection vers l'arrière (B-SHG). L'image est réalisée pixel par pixel en balayant le volume d'excitation dans l'échantillon. La focalisation se fait avec un objectif à forte ouverture numérique pour que le volume d'excitation soit le plus petit possible.

### III – Imagerie par Résonance Magnétique [11].

L'imagerie par résonance magnétique (ou IRM) repose sur l'utilisation du phénomène de résonance magnétique nucléaire (ou RMN) appliqué au proton  $^1\text{H}$  (essentiellement de l'eau) afin de discriminer des matériaux de structure et/ou de composition différentes. L'observation de matériaux par IRM ne nécessite aucune préparation préalable et permet une étude des protéines en milieu aqueux. La résolution spatiale de l'IRM est de l'ordre de la centaine de microns. Nous avons donc utilisé cette technique afin d'imager nos matrices collagène/gélatine à l'échelle macroscopique. Les expériences d'IRM ont été effectuées au sein du LCMCP par Agnieszka Nowacka et Flavien Guenneau.

#### 1 – Origine du signal de résonance magnétique nucléaire (RMN).

La RMN, comme son nom l'indique, concerne les constituants du noyau : les neutrons (particules de charge nulle) et les protons (particules chargées positivement). Ces nucléons sont animés d'un mouvement de rotation dont l'axe passe par leurs propres centres. Ce mouvement induit un moment cinétique, encore appelé « spin », aligné sur l'axe de rotation. Les nucléons sont constitués de quarks, des particules élémentaires de charge non-nulle. La rotation des nucléons met donc en mouvement des particules chargées et génère ainsi un moment magnétique de spin. Les protons et les neutrons peuvent par conséquent être décrits comme de petits aimants. Au sein du noyau, les protons/neutrons s'apparient de manière à annuler leur moment magnétique de spin (minimisation de l'énergie nucléaire). Seuls les noyaux comportant un nombre impair de nucléons possèdent un moment magnétique nucléaire et peuvent être sondés par RMN. Parmi eux, le proton  $^1\text{H}$  est le noyau de choix pour réaliser de l'IRM. Ce choix s'explique en partie par sa très forte abondance naturelle (99,98%).

Le phénomène de RMN repose tout d'abord sur l'interaction entre le moment magnétique d'un noyau et un champ magnétique intense  $\mathbf{B}_0$  extérieur (figure 13). Considérons un ensemble de protons  $^1\text{H}$  qui ne subit l'effet d'aucun champ magnétique. L'orientation de leurs moments magnétiques est complètement aléatoire et tous ces états ont une énergie équivalente. Le vecteur d'aimantation macroscopique, somme des moments magnétiques de chaque proton, est alors nul.

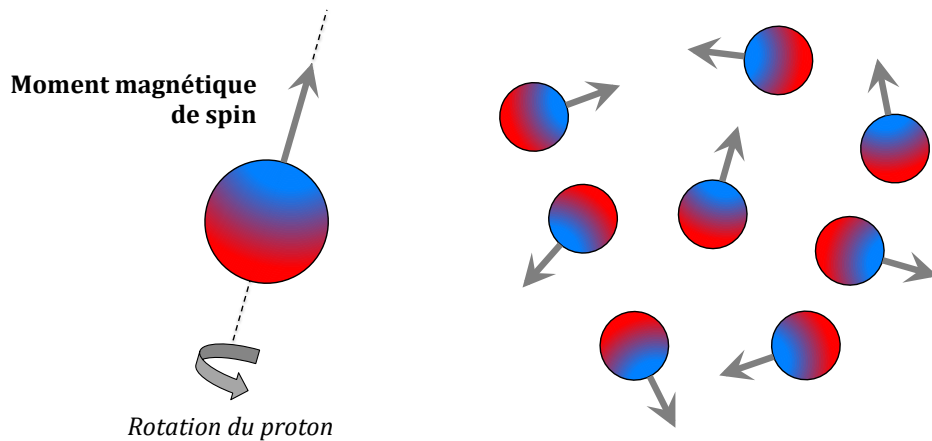
Appliquons à présent un champ magnétique  $\mathbf{B}_0$  sur notre système. Les moments magnétiques de spin des protons se mettent alors à précesser autour



de l'axe de  $\mathbf{B}_0$ . De plus, on observe une levée de dégénérescence puisque les spins peuvent se retrouver sous deux états d'énergie différente (voir figure 14):

- **spin up.** Le moment magnétique de spin du proton est parallèle à  $\mathbf{B}_0$ . Il s'agit du niveau de plus basse énergie.
- **spin down.** Le moment magnétique de spin du proton est antiparallèle à  $\mathbf{B}_0$ . Il s'agit du niveau de haute énergie.

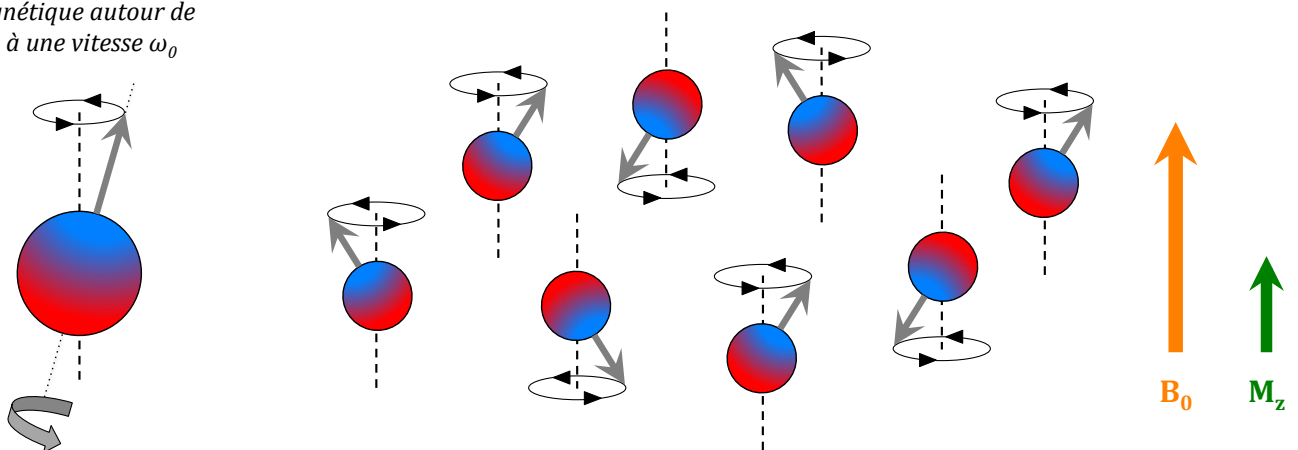
Sans champ magnétique  $\mathbf{B}_0$



Vecteur d'aimantation  $\mathbf{M}$  nul

Avec champ magnétique  $\mathbf{B}_0$

Précession du moment magnétique autour de  $\mathbf{B}_0$  à une vitesse  $\omega_0$



Vecteur d'aimantation  $\mathbf{M}$  = composante longitudinale  $\mathbf{M}_z$

*Figure 13 : Illustration de l'effet Zeeman sur un ensemble de protons  $^1\text{H}$ .*

L'effet produit par un champ magnétique  $\mathbf{B}_0$  sur des protons est appelé effet Zeeman. L'écart entre les deux niveaux d'énergie ainsi créés dépend à la fois du noyau sondé et de l'intensité de  $\mathbf{B}_0$  :

$$\Delta E = \hbar\gamma\mathbf{B}_0$$

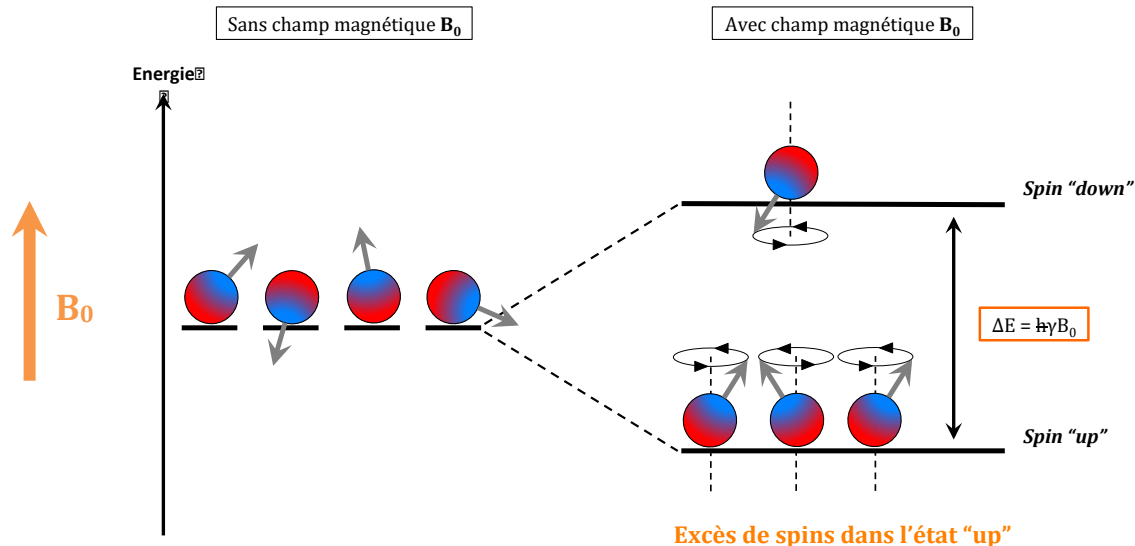
avec :

- $\hbar$ , la constante de Planck divisée par  $2\pi$ .
- $\gamma$ , le rapport gyromagnétique, un paramètre propre à chaque isotope.

La population de chaque niveau énergétique obéit à une distribution de Boltzmann :

$$\frac{N_{up}}{N_{down}} = \exp\left(\frac{\Delta E}{kT}\right)$$

En pratique, à température ambiante et pour une population totale d'un million de protons, on observe une différence de seulement quelques spins en faveur du niveau de basse énergie (spin « up »). Ce sont ces spins en excès qui sont à l'origine du signal RMN. La différence de population peut être augmentée en utilisant un champ  $\mathbf{B}_0$  très intense ou en sélectionnant un isotope dont le rapport gyromagnétique est élevé. Le proton  $^1\text{H}$  possède un rapport gyromagnétique extrêmement élevé. C'est la seconde raison qui explique la popularité du proton en IRM.

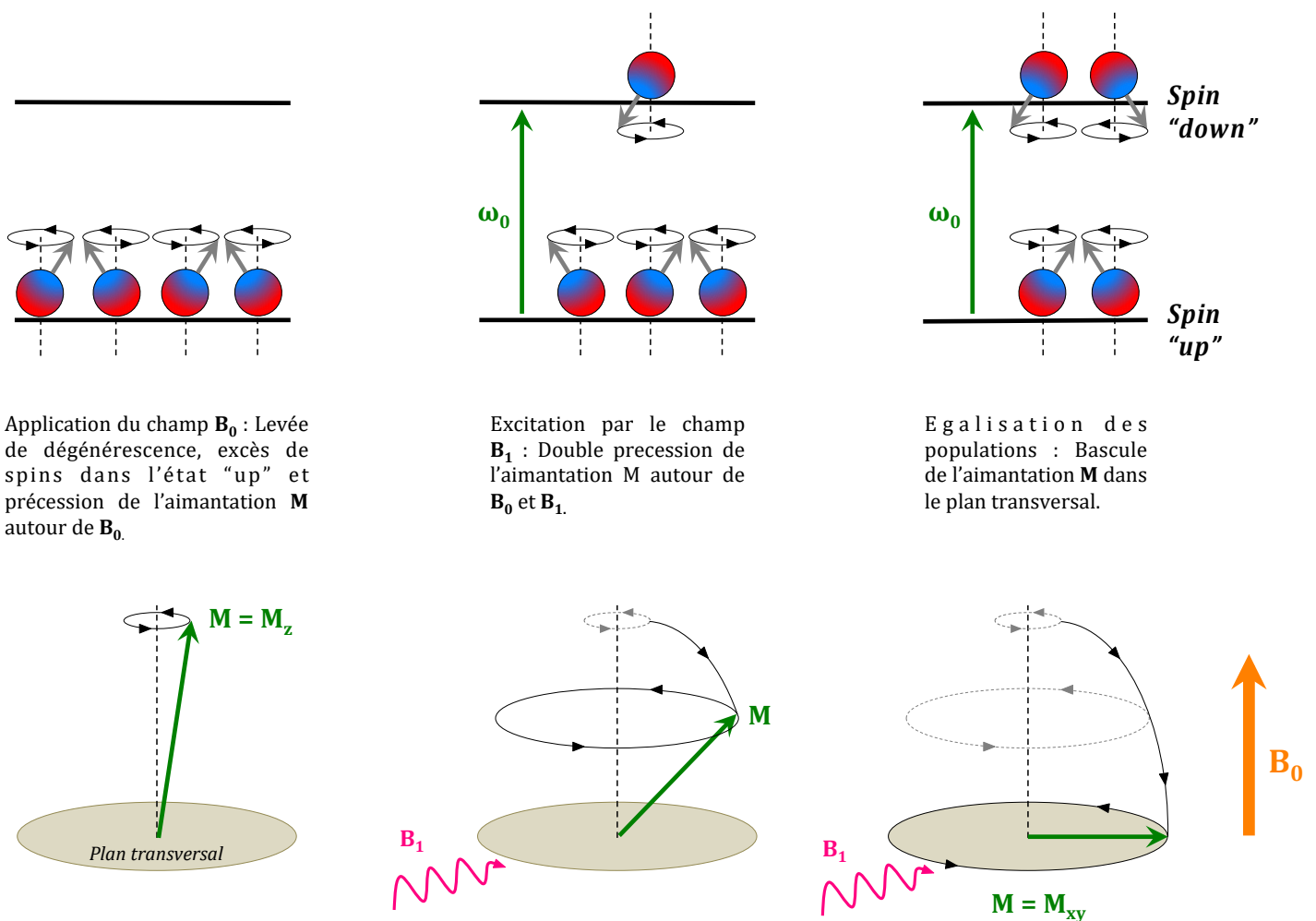


**Figure 14 :** Approche énergétique de l'effet Zeeman : la levée de dégénérescence.

Considérons à présent le cas du vecteur d'aimantation macroscopique  $\mathbf{M}$ , c'est à dire la somme des moments magnétiques de chaque proton. Ce vecteur comporte une composante longitudinale  $\mathbf{M}_z$  (colinéaire à  $\mathbf{B}_0$ ) et une composante transversale  $\mathbf{M}_{xy}$  (orthogonale à  $\mathbf{B}_0$ ) :

- **Composante longitudinale  $M_z$ .** La composante longitudinale du moment magnétique de spin d'un proton est soit parallèle à  $B_0$  (spin « up »), soit anti-parallèle à  $B_0$  (spin « down »). En sommant sur l'ensemble des protons, les spins up et down s'annulent et il ne reste que les spins « up » en excès. Par conséquent,  $M_z$  est la somme de la composante longitudinale des spins en excès.
- **Composante transversale  $M_{xy}$ .** Les protons précessent de manière incohérente autour de  $B_0$ . La composante transversale de leur moment magnétique a par conséquent une orientation aléatoire. Statistiquement, la composante macroscopique  $M_{xy}$  est donc nulle.

Le vecteur d'aimantation macroscopique  $M$  se résume à sa composante longitudinale  $M_z$  qui provient elle-même des spins en excès.

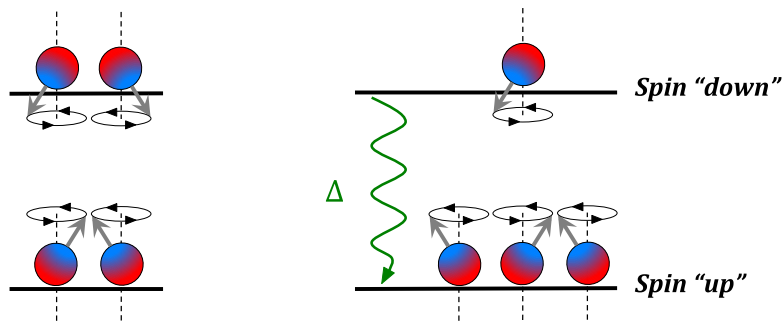


**Figure 15:** Approche quantique (partie haute) et classique (partie basse) du phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN).

Le vecteur  $\mathbf{M}$  précesse autour de  $\mathbf{B}_0$  à une fréquence angulaire  $\omega_0$  où :

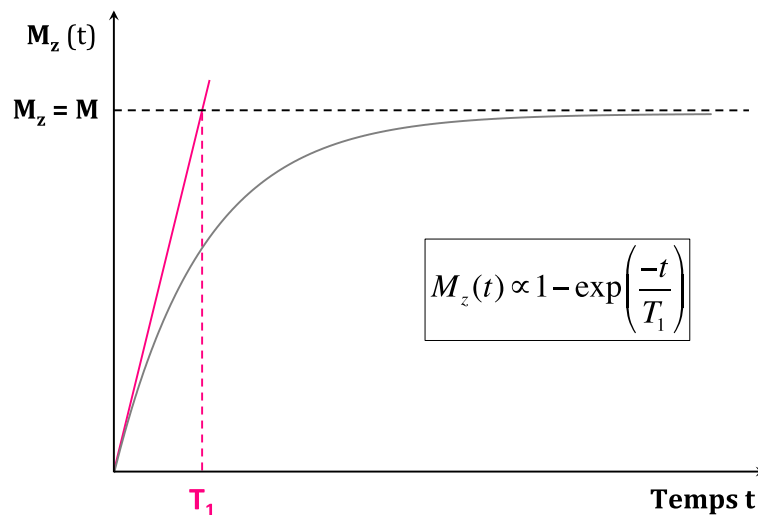
$$\omega_0 = \gamma B_0$$

$\omega_0$  est également appelé fréquence de Larmor. Afin de faire entrer les spins en résonance, il est nécessaire d'appliquer un champ magnétique tournant  $\mathbf{B}_1$  (dans le plan transverse) dont la fréquence de rotation  $\omega_{\text{Rot}}$  correspond à la fréquence de Larmor des protons.  $\mathbf{M}$  effectue alors un double mouvement de précession : L'aimantation tourne à la fois autour de  $\mathbf{B}_0$  et de  $\mathbf{B}_1$  à des vitesses différentes ( $\omega_0$  et  $\omega_1$  respectivement). Ce phénomène est appelé résonance magnétique nucléaire ou RMN. En ajustant le temps et/ou l'intensité de l'impulsion  $\mathbf{B}_1$ , on peut faire basculer l'aimantation  $\mathbf{M}$  dans le plan transversal. Une antenne, placée dans ce plan, permet alors la détection de l'aimantation  $\mathbf{M}$ .



$\mathbf{M}$  dans le plan transversal à la fin du pulse  $\mathbf{B}_1$

Relaxation longitudinale : desexcitation par échange thermique avec le milieu environnant



**Figure 16 :** Relaxation longitudinale ou relaxation  $T_1$ . La désexcitation des spins s'opère par échange thermique avec le milieu environnant. Il entraîne une repousse de l'aimantation longitudinale ( $M_z$ ).

La condition de résonance ( $\omega_{\text{Rot}} = \omega_0$ ) est directement liée à la différence d'énergie  $\Delta E$  entre les états spin « up » et spin « down ».  $\Delta E$  étant proportionnelle

à  $\omega_0$ , en appliquant le champ  $\mathbf{B}_1$ , on fournit l'énergie nécessaire afin de faire passer un spin « up » dans l'état spin « down » (figure 15). La bascule de  $\mathbf{M}$  dans le plan transverse revient alors à exciter la moitié des spins « up » en excès. L'excitation des spins par  $\mathbf{B}_1$  s'accompagne également de leur rephasage. Sans cette cohérence, la composante transversale resterait nulle.

La relaxation magnétique nucléaire est le processus à la base de l'IRM. Elle consiste à exciter un ensemble de spins à l'équilibre (sous l'effet d'un champ magnétique statique  $\mathbf{B}_0$ ) à l'aide d'un champ magnétique tournant  $\mathbf{B}_1$ . Toutefois, c'est la relaxation de ces spins excités qui est à l'origine du contraste en IRM.

## 2 – Relaxation longitudinale et relaxation transversale.

Considérons un ensemble de spins sous l'effet d'un champ magnétique statique  $\mathbf{B}_0$ . L'application d'un champ tournant  $\mathbf{B}_1$  approprié permet de faire basculer le vecteur d'aimantation macroscopique  $\mathbf{M}$  dans le plan transverse (voir ci-dessus). Dès la fin du pulse  $\mathbf{B}_1$ , les spins débutent leur relaxation. Cette relaxation peut être décomposée en deux phénomènes :

- **La relaxation longitudinale.** Il s'agit de la repousse de la composante longitudinale  $\mathbf{M}_z$  du vecteur aimantation. D'un point de vue énergétique, les spins « down » excités relaxent en émettant de l'énergie sous forme d'un échange thermique avec le milieu moléculaire environnant. Les spins retournent ainsi à l'état spin « up », recréant l'excès de spins initial. La repousse de  $\mathbf{M}_z$  est une fonction exponentielle du temps (voir figure 16) dont la constante caractéristique est  $T_1$ .

$$M_z(t) \propto 1 - e^{-\frac{t}{T_1}}$$

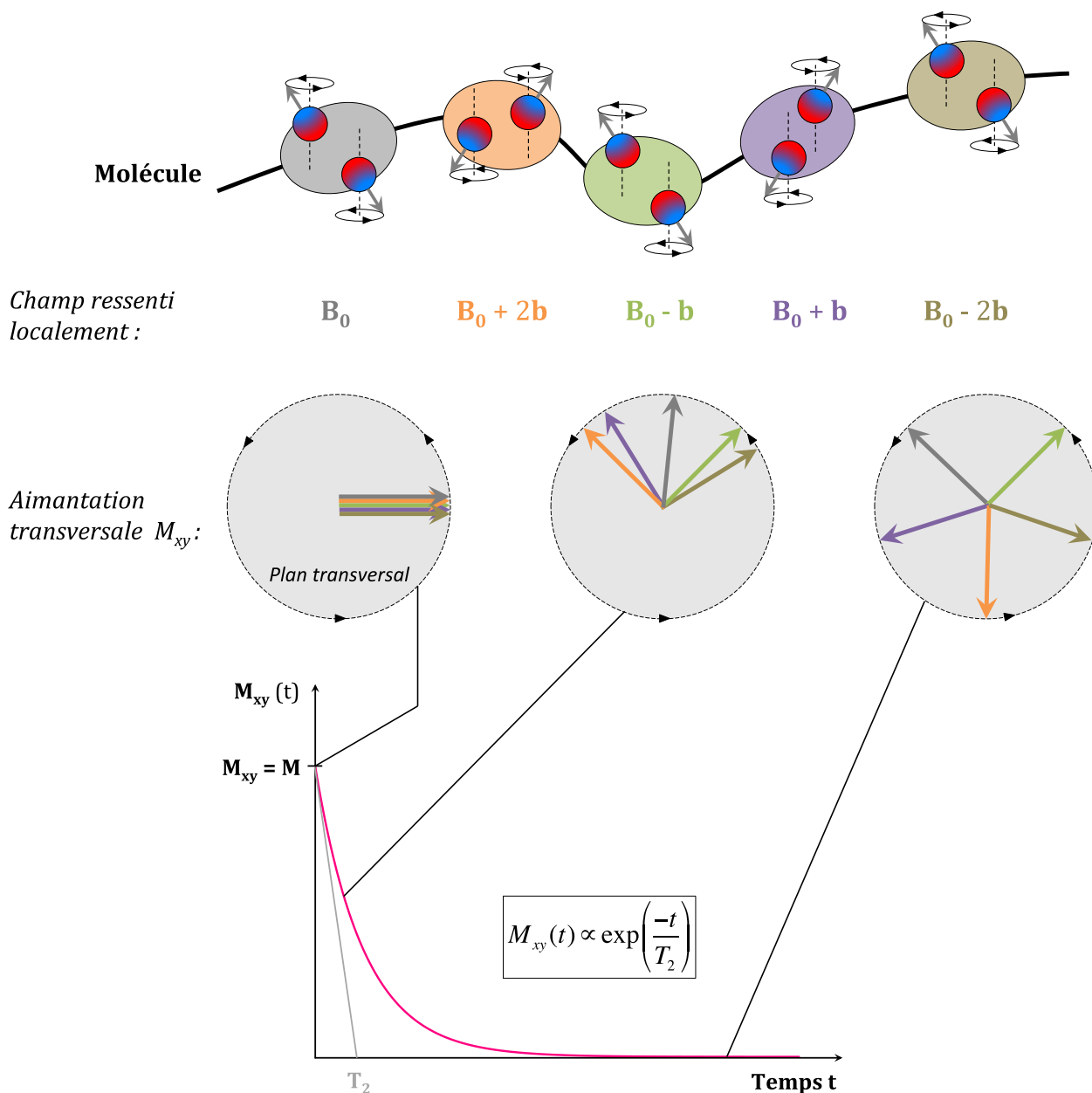
Par conséquent, la relaxation longitudinale est également appelée relaxation  $T_1$ .

- **La relaxation transversale.** Elle correspond au déphasage de la composante transversale du moment magnétique des spins excités. Ce déphasage débute dès l'interruption du champ  $\mathbf{B}_1$ . Cette perte de cohérence est due aux inhomogénéités locales du champ magnétique. Au sein d'une même molécule, les divers protons  $^1\text{H}$  voient un environnement chimique et donc magnétique différent. Ces inhomogénéités d'origine moléculaire sont assimilables à de petits champs magnétiques qui se superposent à  $\mathbf{B}_0$  (en s'additionnant ou en se soustrayant). Or, la vitesse de précession du spin dépend directement de l'intensité du champ magnétique ressenti par le proton (voir ci-dessus). Les spins tournent donc spontanément à des vitesses légèrement différentes de  $\omega_0$ , aboutissant ainsi à un déphasage. La relaxation transversale est un processus sans échange d'énergie. La disparition de  $\mathbf{M}_{xy}$  est une fonction exponentielle du temps (voir figure 17) dont la constante caractéristique est  $T_2$ .

$$M_{xy}(t) \propto e^{-\frac{t}{T_2}}$$

Par conséquent, la relaxation transversale est également appelée relaxation  $T_2$ .

En pratique, la relaxation transversale est bien plus rapide que la relaxation longitudinale. L'antenne placée dans le plan transversal enregistre la décroissance du champ  $M_{xy}$  due à la perte de cohérence. Ce signal de décroissance est appelé signal FID (pour Free Induction Decay). Durant la phase de relaxation, l'aimantation  $M$  continue à précesser autour de  $B_0$ . C'est pour cette raison que le signal FID est une sinusoïdale amortie.



**Figure 17 :** Relaxation transversale ou relaxation  $T_2$ . Les inhomogénéités locales du champ magnétique modifient légèrement la vitesse de précession des spins (partie haute) et induisent une perte de cohérence dans le plan transversal (milieu de la figure) à l'origine de la disparition de  $M_{xy}$  (partie basse).

Pour imager un objet par IRM, on compose des séquences d'impulsions  $B_1$  permettant de discriminer les matériaux le composant en fonction de leur  $T_1$ , de leur  $T_2$  ou encore de leur densité de protons. Au cours de cette thèse, nous avons utilisé deux types de séquences :

- **Une séquence pondérée en densité de protons.** On se place dans des conditions où le contraste en  $T_1$  et en  $T_2$  sont extrêmement faibles. Cette séquence permet de discriminer, au sein de l'échantillon, des zones/domaines en fonction de leur concentration en proton. Dans le cas d'un hydrogel, tel qu'une matrice collagène/gélatine, on a alors accès à la répartition de l'eau dans l'échantillon.
- **Une séquence pondérée en  $T_1$  et en  $T_2$ .**

Les schémas de ces séquences, ainsi qu'une explication quant à l'origine des pondérations, sont consultables en annexe.

### Bibliographie :

- [1] – BANCELIN S. *Imagerie quantitative du collagène par génération de seconde harmonique*. Thèse de doctorat : Biophysique. Ecole Polytechnique : 2013.
- [2] – GUSACHENKO I. *Polarization-resolved second harmonic microscopy in collagenous tissues : theoretical and experimental developments, and application to microstructural imaging during biomechanical assays in tendon*. Thèse de doctorat : Physique. Ecole Polytechnique : 2012.
- [3] – STRUPLER M. *Imagerie du collagène par microscopie multiphotonique. Application aux fibres rénales*. Thèse de doctorat : Physique. Ecole Polytechnique : 2008.
- [4] – TEULON C. *Imagerie quantitative du collagène par microscopie par génération de seconde harmonique résolue en polarisation*. Thèse de doctorat : Biophysique. Ecole Polytechnique : 2016.
- [5] – TEULON C., TIDU A., PORTIER F., MOSSER G., SCHANNE-KLEIN M.-C. Probing the 3D structure of collagen liquid crystals with polarization-resolved SHG microscopy. *Optics Express*, soumis en avril 2016.
- [6] – DENISET-BESSEAU A., DE SA PEIXOTO P., MOSSER G., SCHANNE-KLEIN M.-C. Nonlinear optical imaging of lyotropic cholesteric liquid crystals. *Optics Express*, 2010, vol 18, n°2, p 1113-1121. DOI : 10.1364/OE.18.001113.
- [7] – BANCELIN S., AIME C., GUSACHENKO I., KOWALCZUK L., LATOUR G., CORADIN T., SCHANNE-KLEIN M.-C. Determination of collagen fibril size via absolute measurements of second-harmonic generation signals. *Nature Communications*, 2014, vol 5, article n°4920. DOI : 10.1038/ncomms5920.
- [8] – Xu Research Group – Biomedical Imaging (en ligne). Consulté le 31/08/2016. Disponible à l'adresse : <http://xu.research.engineering.cornell.edu/research>
- [9] – DE SA PEIXOTO P., DENISET-BESSEAU A., SCHMUTZ M., ANGLO A., ILLOUL C., SCHANNE-KLEIN M.-C., MOSSER G. Achievement of cornea-like organizations in dense collagen I solutions: clues to the physico-chemistry

of cornea morphogenesis. *Soft Matter*, 2013, vol 9, p 11241-11248. DOI : 10.1039/C3SM52097H.

- [10] – HAWKES P. *Electrons et microscopes. Vers les nanosciences*. Paris : Belin, CNRS Editions, 1995. ISBN : 2-271-05365-X.
- [11] – KASTLER B., VETTER D. *Comprendre l'IRM. Manuel d'auto-apprentissage, 7<sup>ème</sup> édition*. Paris : Elsevier Masson, 2011. Imagerie Médicale. ISBN : 9782294710445





## **Partie B :**

Phases denses  
collagène/gélatine

## Partie B – Introduction : Pourquoi la gélatine ?

« La nature est un professeur universel et sûr pour celui qui l'observe. »  
*C. Goldoni*

De nos jours, la gélatine est omniprésente dans notre société [1]. Cette protéine entre dans la composition d'un grand nombre de produits alimentaires (bonbons, pâtisseries, produits laitiers, charcuteries...). Dans le domaine pharmaceutique/médicale, elle sert à confectionner l'enrobage de nombreux médicaments (capsules molles et dures, gélules, comprimés...) ainsi que des éponges hémostatiques. Elle est encore beaucoup utilisée en photographie pour réaliser des films ultrasensibles (ex : film radiographique) ou du papier photo brillant. La gélatine est même employée au cours des opérations de désamiantage ! Aspergée sur une plaque d'amiante, elle emprisonne les fibres en gélifiant et évite ainsi leur propagation dans l'air.

Cette utilisation de la gélatine dans des proportions gigantesques (350 000 tonnes par an [2]) s'explique par son faible prix, sa facilité d'extraction à une échelle industrielle et sa forte abondance naturelle. En effet, la gélatine est le produit de dégradation thermique de la protéine la plus représentée du règne animal : le collagène. C'est d'ailleurs sa ressemblance avec le collagène qui est à l'origine de sa forte popularité dans le domaine des biomatériaux [3]. Nous souhaitons nous aussi tirer profit de cette ressemblance afin de remplacer partiellement le collagène par de la gélatine au sein de phases denses.

Au cours des années 1950, Yves Bouligand a établi un parallèle intéressant entre la structure de certains tissus biologiques organisés (ex : os humain, carapace de crabe, paroi de poire, etc.) et les phases cristallines liquides [4]. Il a démontré que les motifs en arceaux observés dans ces tissus correspondent en fait à une coupe oblique d'une structure en contre-plaqué « twisté ». Or, cette structure ressemble fortement à l'organisation d'une phase cristalline-liquide : la phase cholestérique.

Depuis, au LCMCP, nous avons démontré, *in vitro*, que le collagène de type I est un mésogène lyotrope capable de former des phases cholestériques ou contre-plaqué [5-7]. La structure de ces phases correspond respectivement à l'organisation observée dans l'os et dans la cornée, des tissus dont la matrice organique est majoritairement constituée de collagène. Notre stratégie à présent est de reproduire des tissus organisés en fibrillant des mésophases de collagène. Par cette démarche biomimétique, nous voulons en particulier synthétiser des substituts cornéens.

Cependant, l'utilisation du collagène est problématique. Malgré son abondance, c'est une protéine chère (> 1000 €/g) car elle est difficile à extraire à grande échelle. Le « collagène végétal », une alternative recombinante, est quant à lui encore plus onéreux (cf Partie A – Chapitre 1). De plus, le collagène ne peut être stérilisé sans altérer sa structure et le dénaturer en gélatine.

Le but de ma thèse est de déterminer si le collagène peut être remplacé partiellement par de la gélatine sans perdre la structure observée au sein des

phases denses. Nous souhaitons, en particulier, utiliser cette stratégie pour préparer des matériaux transparents reproduisant la structure cornéenne en contre-plaqué.

La gélatine est l'objet du premier chapitre de cette partie. Nous nous intéresserons à sa production et mettrons en avance les différences entre gélatine et collagène.

Le deuxième chapitre porte quant à lui sur les phases denses collagène/gélatine et leur organisation. Nous en profiterons pour faire quelques rappels sur les phases cristallines liquides et leur place en Biologie.

Enfin, dans le troisième chapitre, nous décrirons le phénomène de fibrillogenèse du collagène avant de s'intéresser à la structure de matrices denses collagène/gélatine.

### **Bibliographie :**

- [1] – *Gelatin Manufacturers in Europe* (en ligne). Consulté le 24/06/2016. Disponible à l'adresse : <http://www.gelatine.org/fr/applications/gelatine.html>
- [2] – ABDERRAZAK M., TREMBLIN G. *Abrégé de biochimie appliquée (2nde édition)*. EDP Sciences, 2015, Grenoble Sciences. ISBN: 9782759817764
- [3] – SANTORO M., TATARA A.M., MIKOS A.G. Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering. *Journal of controlled release*, 2014, vol 190, p 210-218. DOI : 10.1016/j.conrel.2014.04.014.
- [4] – BOULIGAND Y. Liquid crystals and biological morphogenesis : Ancient and new questions. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences - Chimie*, 2007, p 1-16. DOI : 10.1016/j.crci.2007.10.001.
- [5] – GIRAUD-GUILLE M.M., MOSSER G., BELAMIE E. Liquid cristallinity in collagen systems in vitro and in vivo. *Current opinion in colloid and interface science*, 2008, vol 13, p 303-313. DOI : 10.1016/j.cocis.2008.03.002.
- [6] – DE SA PEIXOTO P., DENISET-BESSEAU A., SCHMUTZ M., ANGLO A., ILLOUL C., SCHANNE-KLEIN M.-C., MOSSER G. Achievement of cornea-like organizations in dense collagen I solutions: clues to the physico-chemistry of cornea morphogenesis. *Soft Matter*, 2013, vol 9, p 11241-11248. DOI : 10.1039/C3SM52097H.
- [7] – MOSSER G., ANGLO A., HELARY C., BOULIGAND Y., GIRAUD-GUILLE M.-M. Dense tissue-like collagen matrices formed in cell-free conditions. *Matrix Biology*, 2006, vol 25, p 3-13. DOI : 10.1016/j.matbio.2005.09.002.

## Partie II – Chapitre 1 : Du collagène à la gélatine

### I - La gélatine : un nom pour plusieurs espèces.

La gélatine est un composé d'origine biologique utilisé depuis près de 8000 ans dans de nombreux secteurs :

- A l'époque préhistorique, elle servait de liant pour les peintures des hommes de Neandertal.
- En Egypte, dès la haute antiquité (4000 avant JC), les artisans produisaient de la colle à partir de peaux et d'os d'animaux afin d'assembler des pièces de bois [1].
- Les premiers écrits indiquant une utilisation de la gélatine en cuisine remontent à 500 ans. Obtenue à partir de pieds de veau, elle entraînait dans la confection de plats marinés servis régulièrement à la cour du roi Henry VIII d'Angleterre.
- La gélatine est utilisée depuis près de deux siècles pour préparer des capsules de médicaments (dures et molles). Outre le confort apporté au patient, ces capsules permettent une libération contrôlée du médicament qu'elles renferment.
- La gélatine est également utilisée en photographie depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, pour la préparation des films photographiques et radiographiques.
- Enfin, la gélatine rentre depuis longtemps dans la composition de nombreux cosmétiques, jouant à la fois le rôle de texturant et de principe actif.

La gélatine est donc un produit auquel nous sommes quotidiennement confrontés. Toutefois, si la gélatine est toujours extraite à partir de tissus riches en collagène (peau, os) ; ce terme englobe en fait une multitude de produits aux propriétés physico-chimiques radicalement différentes (voir ci-dessous). Au sein même de la communauté scientifique, le terme de « gélatine » reste ambigu et peut désigner deux types d'objets :

- **La forme dénaturée d'une triple hélice de collagène.** Il s'agit alors uniquement d'une modification de la conformation du collagène sans altération de sa séquence. En chauffant une solution acide de collagène au-dessus de sa température de dénaturation, on rompt les liaisons hydrogènes à l'origine de la stabilité de la triple hélice. Les chaînes  $\alpha$  se séparent et adoptent une conformation de type pelote statistique [2]. La dénaturation du collagène est un processus irréversible [3] : en refroidissant une solution de collagène dénaturé, on observe la formation de petits morceaux de triples hélices (renaturation partielle) mais les chaînes  $\alpha$  ne parviennent pas à se réassocier sur toute leur longueur (voir figure 4).
- **Le produit de la dégradation de tissus riche en collagène** par des traitements chimiques et thermiques. Il s'agit ici de la gélatine commerciale, utilisée quotidiennement dans de nombreux foyers. Si elle reste principalement du collagène **dénaturé et hydrolysé**, elle contient également les résidus des tissus dont elle est extraite (lipides, glucides, autres protéines, etc.). Je reviendrai un peu plus en détail sur la

composition de ce mélange dans le paragraphe traitant de l'extraction industrielle de la gélatine.

Par soucis de clarté, je distinguerai donc **le collagène dénaturé** (obtenu en laboratoire, à partir d'une solution acide de collagène natif) de la gélatine qui désignera pour nous **la gélatine commerciale**.

II – D'où provient la gélatine commerciale ? Procédé d'extraction industrielle de la gélatine.

La gélatine est extraite à partir de tissus riches en collagène : l'os (bœuf) et la peau (porc, bœuf). Ces tissus sont, en majorité, des déchets provenant d'abattoirs. En fonction du tissu et de l'âge de la bête abattue, on utilisera des procédés d'extraction différents [4, 5] (voir figure 1).

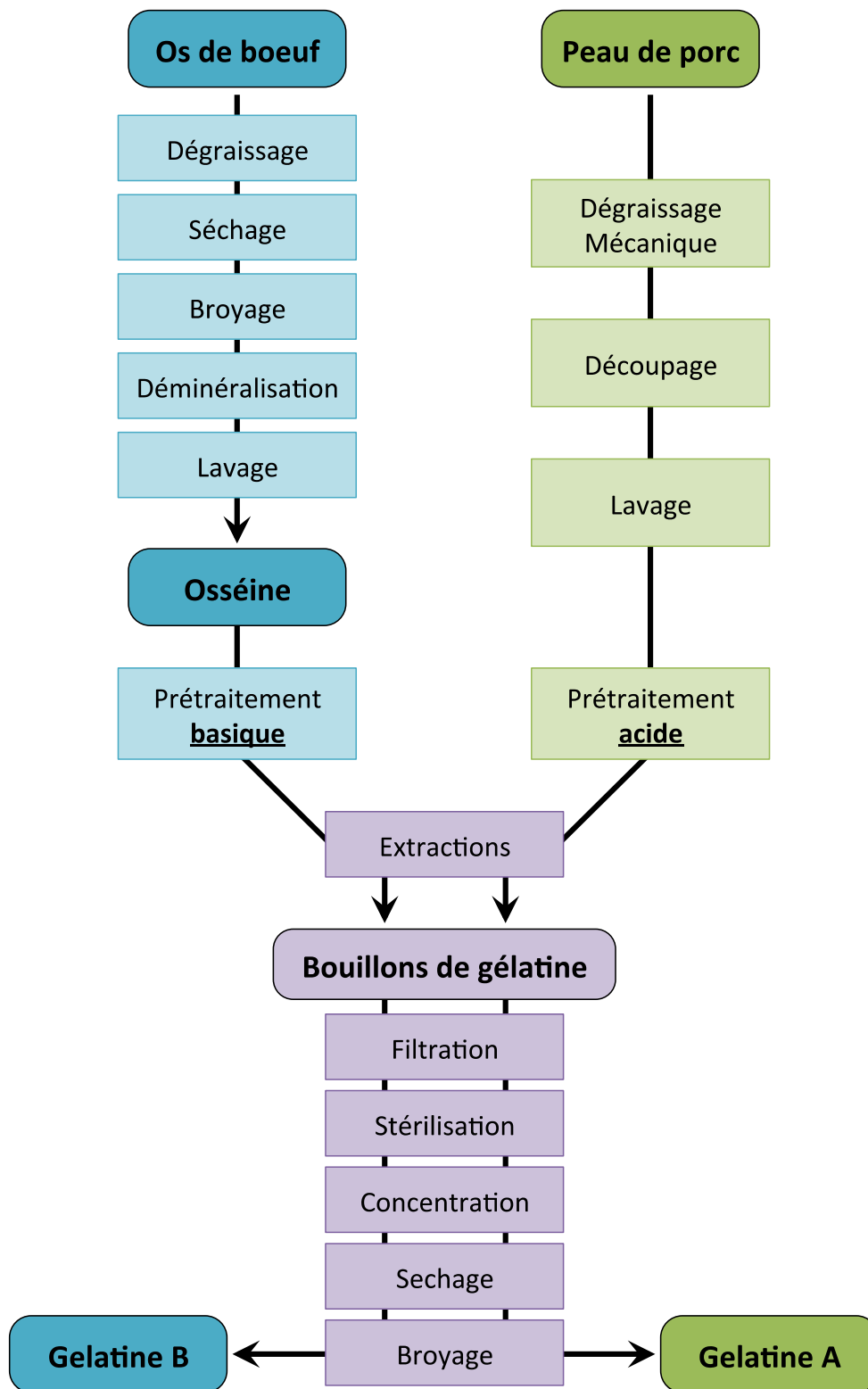
1 – Déminéralisation de l'os en vue de l'extraction de gélatine.

Les os sont lavés et dégraissés avant d'être broyés sous forme de particules. On effectue ensuite une étape de déminéralisation qui consiste à ôter les cristaux d'hydroxyapatite de la matrice organique de l'os. Les particules d'os sont alors mises à tremper dans un bain d'acide dilué (HCl 5%) pendant quelques semaines afin de solubiliser la phase inorganique. Ce traitement est effectué à froid et ne dénature donc pas le collagène. Toutefois, il peut entraîner une hydrolyse des liaisons peptidiques et de certaines liaisons interchaînes. La matière organique obtenue de cette manière est appelée osséine.

2 – Prétraitement des tissus densément réticulés : procédé alcalin.

Le taux de réticulation inter et intrachaîne du collagène dépend de l'âge de l'animal : plus une bête est vieille et plus le collagène de ses tissus est réticulé (voir chapitre 1). Ce taux de réticulation varie également en fonction des tissus. Un tissu comme l'os, soumis à de très fortes contraintes mécaniques et constitué d'une matrice organique dense et organisée [6], présente un taux de réticulation du collagène bien plus élevé que celui de la peau [7]. Afin d'extraire la gélatine de ces tissus, il est nécessaire de cliver ces liaisons covalentes entre les chaînes de collagène. Cependant, cette opération doit être effectuée en préservant au maximum l'intégrité des chaînes  $\alpha$ .

Les industriels ont développé un procédé alcalin permettant de rompre efficacement la réticulation des tissus densément réticulés, tel que l'osséine ou la peau de bœuf. Le prétraitement en milieu alcalin consiste à immerger l'osséine ou les peaux dans du lait de chaux (pH 12), à 20°C (température contrôlée), pendant 6 à 12 semaines. On effectue ensuite une étape de lavage à l'eau, sur des tapis vibrants, avant de débiter l'étape d'extraction. La gélatine obtenue après un prétraitement en milieu alcalin est appelée gélatine de type B.



*Figure 1 : Procédé industriel d'extraction de la gélatine (A et B) à partir d'os de bœuf et de peau de porc.*

Le prétraitement est adapté pour minimiser l'hydrolyse des chaînes de collagène. Toutefois, il engendre des modifications chimiques importantes pour les chaînes latérales de certains acides aminés. Les acides aminés possédant une fonction amide latérale, l'asparagine et la glutamine, sont désaminés en aspartate et glutamate au cours du procédé. La fonction amide devient alors une fonction carboxylate modifiant à la fois la structure primaire du collagène ainsi que ses propriétés physico-chimiques. En effet, le point isoélectrique de la gélatine de type B est situé entre pH 4,7 et 5,6. Il s'agit de la principale différence entre les gélatines de type B et de type A présentée ci-dessous.

### 3 – Prétraitement des tissus peu réticulés : procédé acide.

Pour les tissus faiblement réticulés, comme la couenne de porc, il est possible de réaliser la phase de prétraitement en milieu acide. Les peaux de porcs sont lavées et trempées dans une solution diluée d'acide minérale (pH entre 3,5 et 4,5). Le traitement s'effectue à température ambiante et dure entre 10 et 48 heures. Grâce à un gain de temps considérable, le procédé acide permet donc une réduction importante des coûts de production. La gélatine obtenue après un prétraitement en milieu acide est appelée gélatine de type A. Le procédé acide étant relativement court, il n'y a pas de modification de la séquence primaire du collagène. Le point isoélectrique du collagène et de la gélatine A sont donc identiques ( $pH = 9,5 > pI > pH = 6$ ).

### 4 – Extraction de la gélatine : la cuisson.

Après l'étape de prétraitement, on passe à l'extraction de la gélatine. Les morceaux de peau et d'oséine sont successivement immergés dans des solutions d'eau chaude acidulée de température croissante (de 55 à 100°C). La matière subit ainsi une suite de 5 à 6 extractions, chacune d'elle durant plusieurs heures. Au cours de ces étapes, le collagène est alors dénaturé et hydrolysé, libérant ainsi la gélatine dans l'eau de cuisson : on obtient un bouillon de gélatine. La composition du bouillon de gélatine dépend fortement de la température du bain de cuisson. Le bouillon issu du premier bain ( $T = 55^{\circ}\text{C}$ ) contient les chaînes les plus longues qui donneront les gels les plus résistants. C'est une solution claire, contenant peu de molécules contaminantes (glucides, lipides, protéines, etc.). Au contraire, le dernier bouillon (100°C) contient les chaînes de collagène les plus dégradées, formant les gels les plus faibles. De plus, la proportion en molécules contaminantes y est la plus élevée, donnant au bouillon une couleur orangée et un aspect turbide. Par conséquent, chaque bain d'extraction contient une gélatine aux propriétés physico-chimiques différentes. Chacun de ces « lots » de gélatine trouve son application (voir tableau 1).

### 5 – Du bouillon à la gélatine en poudre.

Après l'étape d'extraction, chacun des lots de bouillon est filtré (clarification) puis stérilisé sur un échangeur à plaque chauffée à 125°C. Les



bouillons sont ensuite déminéralisés à l'aide de résines échangeuses d'ions (cationique et anionique). On passe alors à l'étape de concentration de la gélatine. Cette étape s'effectue en évaporant l'eau sous vide. La concentration en gélatine passe de 7% à 45% au cours de ce processus. Le but est d'obtenir un bouillon qui gélifie à 30°C. Les gels de gélatine peuvent ensuite être extrudés sous forme de « nouilles » (voir figure 2) afin d'augmenter la surface d'échange du gel de gélatine. On atteint alors la dernière étape : l'étape de séchage. Les nouilles sont disposées dans une chambre de séchage divisée en plusieurs zones. Chaque zone est contrôlée en température et en humidité. La gélatine est alors séchée, pendant 2 jours, sous un flux d'air filtré et constant dont la température augmente en passant d'une zone à une autre (de 30°C jusqu'à 70°C). A la fin de l'étape de séchage, les nouilles de gélatine ne contiennent plus que 10 à 15% d'humidité. Elles sont finalement broyées sous forme de poudre avant de subir le contrôle qualité.



*Figure 2 : Extrusion de bouillon concentré et gélifié de gélatine (d'après [5]).*

Le contrôle qualité porte sur plusieurs critères :

- **La force en gel ou bloom** qui caractérise le pouvoir gélifiant d'un lot de gélatine. Il s'agit du paramètre le plus important puisqu'il fixe le prix du lot de gélatine. Ce paramètre est en fait directement lié à l'élasticité mécanique d'un gel de gélatine. La mesure du bloom est standardisée et décrite par des normes internationales : à l'aide d'un gélo-mètre, on détermine la force nécessaire pour enfoncer un piston (12,7 mm de diamètre) d'une profondeur de 4 mm dans un gel de gélatine (concentration : 6,67% w/v). Les gels sont préalablement stockés à 10°C, pendant 18h, pour s'assurer qu'ils ont un même historique thermique (voir ci-dessous). La force mesurée est exprimée en gramme. Les gélatines commerciales ont un bloom situé entre 50 et 300 g. Pour chaque catégorie de bloom, on trouve une application industrielle (voir tableau 1). La réticulation des gels de gélatine étant due à une renaturation partielle des chaînes  $\alpha$ , l'indice bloom est souvent abusivement relié à la taille moyenne des chaînes de gélatine. Toutefois, comme nous le verrons

par la suite, le procédé d'extraction peut également induire la formation de liaisons interchaines, créant ainsi des molécules de haut poids moléculaire (> 400 000 g/mol), très ramifiées et qui perturbent fortement la formation des triples hélices [8].

- **La viscosité.**
- **Le point isoélectrique** qui dépend du type de gélatine.
- **La couleur.** Elle dépend du type de tissus utilisés pour l'extraction.
- **La turbidité.** Une turbidité élevée correspond souvent à une gélatine de basse qualité (indice bloom faible) ou à une procédure d'extraction trop agressive.
- **La composition.** En particulier, la teneur en cendres qui est un critère important pour les applications dans les secteurs pharmaceutiques et photographiques.
- **La qualité microbiologique.** Il s'agit de vérifier l'absence d'agent pathogène suite à la stérilisation. Ce critère est extrêmement important pour les secteurs pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.

Applications	Bloom (g)
Guimauves	75 - 125
Nougats	100 - 150
Desserts/Laitages industriels	150 - 250
Capsules molles	120 - 200
Capsules dures	150 - 280
Photographie	200 - 300

*Tableau 1 : Les domaines d'applications de la gélatine en fonction de l'indice bloom.*

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé une gélatine commerciale de type A dont l'indice bloom est de 300 g. Nous souhaitons utiliser la gélatine commerciale la plus proche d'un collagène dénaturé (même séquence primaire).

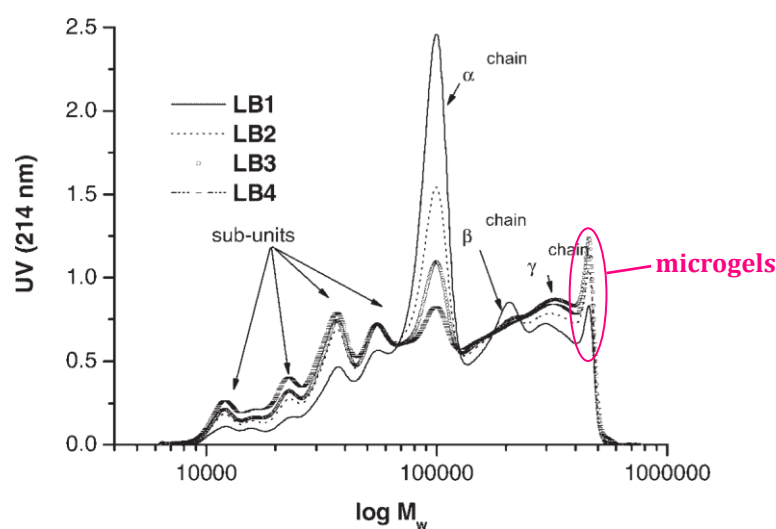
### III – Quelles différences entre le collagène et la gélatine ?

#### 1 – La composition chimique

La gélatine A que nous utilisons est extraite à partir de peau de porc. Les fibrilles de collagène, dans la peau humaine, sont dites « hétérotypiques » [9, 10] : elles sont constituées de plusieurs types de collagène. Dans le cas de la peau, on trouve du collagène de type I, de type III et de type V (quantité faible). La proportion de collagène de type III varie avec l'âge : on trouve jusqu'à 50% de collagène III dans la peau embryonnaire alors que les peaux âgées n'en contiennent que 5 à 10% [4]. Chez l'Homme adulte, le ratio collagène I/III est d'environ 4 pour 1 [10, 11]. Il n'y a pas eu d'études effectuées sur la composition des fibrilles de collagène dans la peau de porc [11]. Toutefois, on peut supposer que la gélatine que nous employons est composée d'au moins 10% de collagène III.

Le collagène de type III est un collagène homotrimérique. Il est plus long que le collagène de type I tout en possédant des télépeptides plus courts. Sa séquence peptidique diffère également puisque le collagène de type III contient des résidus cystéines situés en bout de chaîne. La présence de ces résidus permet la formation de pont disulfure intra et interchaines qui stabilisent la triple hélice. Une autre des spécificités du collagène de type III concerne le clivage de son propeptide N qui est relativement lent. Il a été démontré, *in vitro*, que la persistance du propeptide N du collagène III permet de réguler le diamètre des fibrilles de collagène hétérotypique [12]. Enfin, Henkel *et al.* [13] ont identifié la présence de « cross-link » entre des collagènes de type I et de type III, au niveau des télépeptides N-terminaux des deux molécules. L'établissement de cette liaison covalente peut-être à l'origine de la formation de polypeptides hybrides collagène I/III au cours de la dégradation du collagène en gélatine.

La réticulation *in vivo* du collagène est d'ailleurs un processus important à prendre en compte. Nous purifions notre collagène de type I à partir de tendons de queue de jeunes rats (pour s'assurer d'un faible taux de réticulation) et par une étape de centrifugation à haute vitesse, nous nous assurons que nos solutions ne contiennent que des triples hélices non réticulées. La gélatine que nous utilisons est extraite à partir d'une peau de porc mature. Le collagène qui la compose est naturellement réticulé par des enzymes de la matrice extracellulaire (ex : les lysyl-oxydases ou LOX). L'action de ces enzymes et donc le taux de réticulation du collagène varie avec l'âge : plus une peau est vieille et plus elle est réticulée. Les liaisons covalentes que les enzymes génèrent sont de nature variée. Duconseille *et al.* ont listé de manière exhaustive les différentes réactions de réticulation pour la peau [11].



**Figure 3 :** Distribution des masses moléculaires pour 4 échantillons de gélatine B extrait d'os de bœuf. Seules les conditions d'extractions diffèrent entre les échantillons.  $\beta$  et  $\gamma$  correspondent respectivement aux dimères et trimères de chaînes  $\alpha$ . En notera également la présence d'objets de haut poids moléculaire appelés microgels. Ces microgels sont surtout présents dans l'échantillon LB4, le plus dégradé (d'après [8]).

Seule une partie de ces liaisons est clivée au cours de l'étape de prétraitement. La gélatine extraite est donc un mélange de monomère, dimère, trimère... de chaînes  $\alpha$  (voir figure 3). Les chaînes  $\alpha$  associées peuvent être issus d'un seul type de collagène ou de collagène de type différent (voir ci-dessus). Rappelons-nous également que le collagène de type I est hétérotrimérique (voir chapitre I). Dans la gélatine, on trouve par conséquent des n-mères de stoechiométries variées. A la réticulation enzymatique du collagène peut s'ajouter également une réticulation chimique. En effet, au cours du procédé d'extraction de la gélatine, les températures élevées et les taux d'humidité importants peuvent favoriser la création de nouveaux cross-links. On aboutit alors à la formation de microgels : des polypeptides hyperbranchés de haut poids moléculaire et à la structure non linéaire. Enfin, si l'extraction est à l'origine de nouvelles liaisons covalentes, elle entraîne également une hydrolyse des chaînes  $\alpha$  [8].

Par conséquent, les polypeptides qui composent la gélatine de peau de porc sont en fait des morceaux de chaînes  $\alpha$  liés entre-eux par des liaisons intra et/ou intermoléculaires. Toutefois, leur composition en acide aminé reste assez similaire [14]. De plus, la taille de ces polypeptides est extrêmement variable (entre 15 000 et 400 000 Da). Outre les produits de dégradation du collagène, la gélatine contient aussi une faible proportion de lipides, de glucides et de petits peptides dont la nature dépend de la matière brute utilisée. Ces molécules contaminantes peuvent d'ailleurs être à l'origine de nombreuses réactions de réticulation au cours de l'extraction de la gélatine [11, 5].

## 2 – Auto-association et assemblage hiérarchisé.

La dénaturation thermique du collagène est un processus irréversible. En refroidissant une solution de collagène dénaturé, sous sa température de dénaturation, on observe une renaturation **partielle** des chaînes  $\alpha$  en triples hélices. Les chaînes  $\alpha$  ne parviennent pas à se réassocier sur toute leur longueur (voir figure 1). Pour la gélatine, on observe le même phénomène. C'est, par ailleurs, la reformation de domaines en triple hélice qui est à l'origine de la réticulation des gels de gélatine [2].

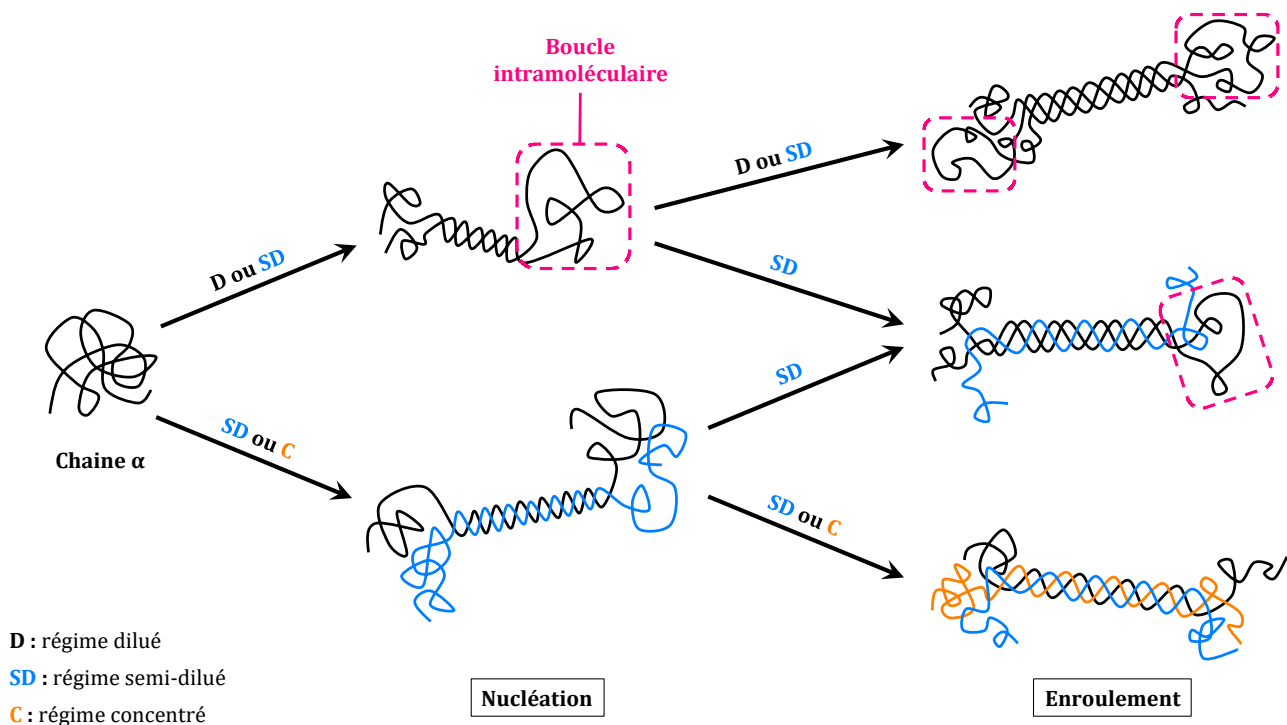
La formation des triples hélices de gélatine dépend de nombreux paramètres : la concentration en gélatine, la taille moyenne des polypeptides, leur polydispersité, la vitesse de refroidissement, la température, etc [11, 15]. Ce processus s'effectue en deux étapes [16] :

- **La nucléation.** Il s'agit de l'étape cinétiquement limitante. Elle consiste en la formation d'une double hélice. En fonction de la concentration en gélatine, la double hélice peut-être intrachaîne (régime dilué), interchaîne (régime concentré) ou un mélange des deux (régime semi-dilué). Dans le cas d'une hélice intrachaîne, son établissement induit la formation d'une boucle intramoléculaire; une conformation énergétiquement défavorable (voir figure 4). Les chaînes de gélatine hautement enchevêtrées facilitent la nucléation. Or la concentration critique d'enchevêtrement d'un polymère est directement reliée à sa masse moléculaire moyenne : plus les chaînes sont courtes et plus la concentration critique d'enchevêtrement est élevée. Par conséquent, les lots de gélatine

constitués de petites chaînes peuvent difficilement former des *nuclei* et ont ainsi un pouvoir gélifiant faible (voir inexistant).

- **L'enroulement.** Il s'agit d'une étape rapide qui se produit dès l'apparition d'un nucleus. Une chaîne  $\alpha$  s'enroule alors autour du nucleus pour former une triple hélice. En fonction de la provenance du troisième brin, on peut décrire des triples hélices formées d'une chaîne  $\alpha$  (deux boucles intramoléculaires), de deux chaînes  $\alpha$  (une boucle intramoléculaire) ou de trois chaînes  $\alpha$  (voir figure 4).

A la première phase de formation de segments courts de triples hélices succède ensuite une phase longue de réarrangement et d'élongation de ces triples hélices [17] sans toutefois parvenir à une renaturation complète du collagène.



**Figure 4 :** La trimérisation de la gélatine. Le processus s'effectue en 2 étapes : la nucléation et l'enroulement. Les triples hélices peuvent se former entre 1, 2 ou 3 chaîne(s) en fonction de la concentration en gélatine. La formation de boucles intramoléculaires étant énergétiquement défavorable, les triples hélices à 3 chaînes  $\alpha$  sont les plus stables.

La gélatine, ne pouvant reformer de longs bâtonnets semi flexible, elle perd deux des propriétés d'auto-association du collagène :

- La fibrillation à pH neutre/basique
- La formation de phases cristalline-liquide lyotropes

En effet, à ma connaissance, nul n'a jamais rapporté la possibilité de former des phases cristalline-liquide à partir de solutions de gélatine. Entre ces

deux extrêmes, le collagène et la gélatine, nous avons montré, au cours de cette thèse, qu'il existe une multitude de structure. L'étude de l'effet de la gélatine sur les phases denses et organisées de collagène fait l'objet de cette partie. Avant de décrire les mélanges collagène/gélatine, il est toutefois nécessaire de faire quelques rappels sur les cristaux liquides et, en particulier, sur les cristaux liquides de collagène.

## Bibliographie :

- [1] – WALKER A. A. Oldest Glue Discovered. In : *Archeology* (en ligne). 21 mai 1998. Consulté le 28/05/2016. Disponible à l'adresse : <http://archive.archaeology.org/online/news/glue.html>
- [2] – DJABOUROV M., LEBLOND J., PAPON P. I. Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. *Journal de physique*, 1988, vol 49, p 319-332.
- [3] – WRIGHT N.T., HUMPHREY J.D. Denaturation of collagen via heating : an irreversible rate process. *Annual review of biomedical engineering*, 2002, vol 4, p 109-128. DOI : 10.1146/annurev.bioeng.4.101001.131546
- [4] – BABEL W., SCHULZ D., GIESEN-WIESE M., SEYBOLD U., GAREIS H., DICK E., SCHRIEBER R., SCHOTT A., STEIN W. Gelatin. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2000. DOI : 10.1002/14356007.a12\_307.
- [5] – RBII K. *Formation d'agrégats de haut poids moléculaires dans la gélatine et comportement en solution aqueuse*. Thèse de doctorat : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition. Toulouse : Institut National Polytechnique de Toulouse, 2010.
- [6] – GIRAUD-GUILLE M.M. Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcified tissue international*, 1988, vol 42, p. 167-180. DOI : 10.1007/BF02556330.
- [7] – DEPALLEA B., QINA Z., SHEFELBINEB S.J., BUEHLER M. J. Influence of cross-link structure, density and mechanical properties in the mesoscale deformation mechanisms of collagen fibrils. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2015, vol 52, p. 1-13. DOI : 10.1016/j.jmbbm.2014.07.008.
- [8] – ELHARFAOUI N., DJABOUROV M., BABEL W. Molecular weight influence on gelatin gels : structure, enthalpy and rheology. *Macromolecular symposia*, 2007, vol 256, p. 149-157. DOI : 10.1002/masy.200751017
- [9] – RUGGIERO F., ROULET M., BONOD-BIDAUD C. Les collagènes du derme : au-delà de leurs propriétés structurales. *Journal de la société de Biologie*, 2005, vol 199, p. 301-311. DOI : 10.1051/jbio:2005031.
- [10] – CAMERON G. J., ALBERTS I. L., LAING J. H., WESS T.J. Structure of type I and type III heterotypic collagen fibrils : an X-Ray diffraction study. *Journal of structural biology*, 2002, vol 137, p. 15-22. DOI : 10.1006/jsbi.2002.4459.
- [11] – DUCONSEILLE A., ASTRUC T., QUINTANA N., MEERSMAN F., SANTE-LHOUELIER V. Gelatin structure and composition linked to

hard capsule dissolution : a review. *Food hydrocolloids*, 2015, vol 43, p. 360-376. DOI : 10.1016/j.foodhyd.2014.06.006.

- [12] – HULMES D.J.S. Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In : FRATZL P. (dir.). *Collagen – Structure and Mechanics*. New York : Springer US, 2008, chapitre 2, p. 15-47. ISBN : 978-0-387-73905-2.
- [13] – HENKEL W., GLANVILLE R.W. Covalent crosslinking between molecules of type I and type III collagen. The Involvement of the N-Terminal, nonhelical regions of the  $\alpha 1(I)$  and  $\alpha 1(III)$  chains in the formation of intermolecular crosslinks. *European Journal of Biochemistry*, 1982, vol 122, p. 205-213.
- [14] – EASTOE J.E. The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochemical Journal*, 1955, vol 61, n°4 p. 589-600. DOI : 10.1042/bj0610589.
- [15] – HARRINGTON W.F., VENKATESWARA RAO N. Collagen structure in solution. I. Kinetics of helix regeneration in single-chain gelatins. *Biochemistry*, 1970, vol 9, n°19 p. 3714-3724.
- [16] – GUO L., COLBY R.H., LUSIGNAN C.P., WHITESIDES T.H. Kinetics of triple helix formation in semidilute gelatin solutions. *Macromolecules*, 2003, vol 36, p. 9999-10008.
- [17] – GUO L., COLBY R.H., LUSIGNAN C.P., HOWE A.M. Physical gelations of gelatin studied with rheo-optics. *Macromolecules*, 2003, vol 36, p. 10009-10020.





## Partie II – Chapitre 2 : Le collagène, un mésogène.

### I – Les cristaux liquides : un compromis entre ordre et fluidité.

#### 1 - Comment reconnaître un solide d'un liquide ?

Comment reconnaître un solide d'un liquide ? Une question assez simple, en apparence, que l'on aborde dès la maternelle. Dans le dictionnaire, on trouve les définitions suivantes pour les noms « *liquide* » et « *solide* » :

- Liquide : « Corps qui prend la forme du récipient qui le contient mais dont le volume est déterminé ».
- Solide : « Corps qui présente une consistance ferme, non fluide. Les solides ont une forme propre ».

Cependant, une poudre, c'est à dire un solide divisé, correspond plutôt à la définition du liquide. La farine, par exemple, s'écoule comme un fluide et adopte la forme du récipient qui la contient. On se doit donc de préciser notre définition : la surface libre d'un liquide est parfaitement plane (à la différence de la poudre).

Abordons à présent le cas des solides vitreux ou amorphes comme le bitume. A 20°C, le bitume se présente comme un solide fragile ayant une forme propre. Il peut même être broyé sous forme de poudre. Toutefois, si on attend suffisamment longtemps (quelques dizaines d'années...), le bitume s'écoule ! Il s'agit d'ailleurs du sujet de l'expérience la longue au monde : « The pitch drop experiment ». Débuté en 1927 par le professeur Parnell, elle consiste en l'étude de l'écoulement du bitume au travers d'un entonnoir (voir figure 1). Quarante-vingt-dix ans après, seules neuf gouttes sont tombées [1] et il n'y a eu aucun témoin de leur chute ! Le temps est donc également une variable à prendre en compte pour juger de l'état physique d'un matériau. Les solides amorphes se comportent comme des solides, aux temps courts. Toutefois, ils s'écoulent comme des liquides aux temps longs. Ces ambiguïtés démontrent la difficulté à définir la matière et ses états à une échelle macroscopique.



**Figure 1 :** « The pitch drop experiment » (d'après [2]).

D'un point de vue microscopique, le solide cristallin se caractérise comme un empilement régulier de composés (molécule, atome, ion, etc.) sur un réseau 3D périodique. On observe à la fois une corrélation de position et d'orientation à longue portée. Les mouvements des composés au sein du réseau sont fortement limités (rotation et vibration essentiellement). Au contraire, dans un liquide, on observe un ordre à courte portée qui s'estompe exponentiellement avec la distance. Des liaisons faibles intermoléculaires s'établissent et se rompent très régulièrement (mettre la dynamique de formation des liaisons H dans l'eau). Cette dynamique élevée permet une réorientation et une diffusion rapide des composés. Elle est également à l'origine de la fluidité des liquides.

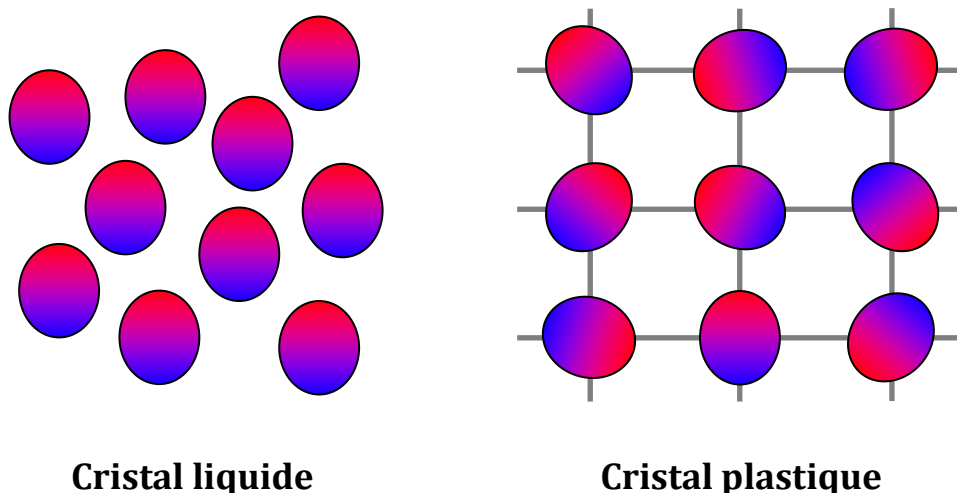
A la frontière entre ces deux états, un troisième état peut toutefois venir s'intercaler : les mésophases.

## 2 – Quelques généralités sur les mésophases.

Ce terme désigne des phases fluides partiellement organisées. Il existe deux grands types de mésophases : les cristaux liquides et les cristaux plastiques. Afin de les définir, il est nécessaire de revenir sur la notion d'« ordre ». On distingue deux types d'ordre :

- L'ordre positionnel. Il s'agit de la disposition du centre de gravité des composés sur les nœuds d'un réseau périodique (1D, 2D ou 3D). On parle également d'ordre translationnel.
- L'ordre orientationnel. Il désigne l'alignement des molécules selon une direction préférentielle.

Les cristaux plastiques présentent un ordre positionnel (dans les trois directions de l'espace) mais pas orientationnel (voir figure 2). Ils sont constitués de mésogènes de forme quasi-sphérique dont la rotation est libre. Ces phases sont également désignées sous le nom de phase solide rotationnelle.



*Figure 2 : Les deux types de mésophases. A gauche, le cristal liquide présente un ordre orientationnel 1D mais pas d'ordre positionnel. A l'inverse, à droite, le cristal plastique présente un ordre positionnel 2D mais pas d'ordre orientationnel.*

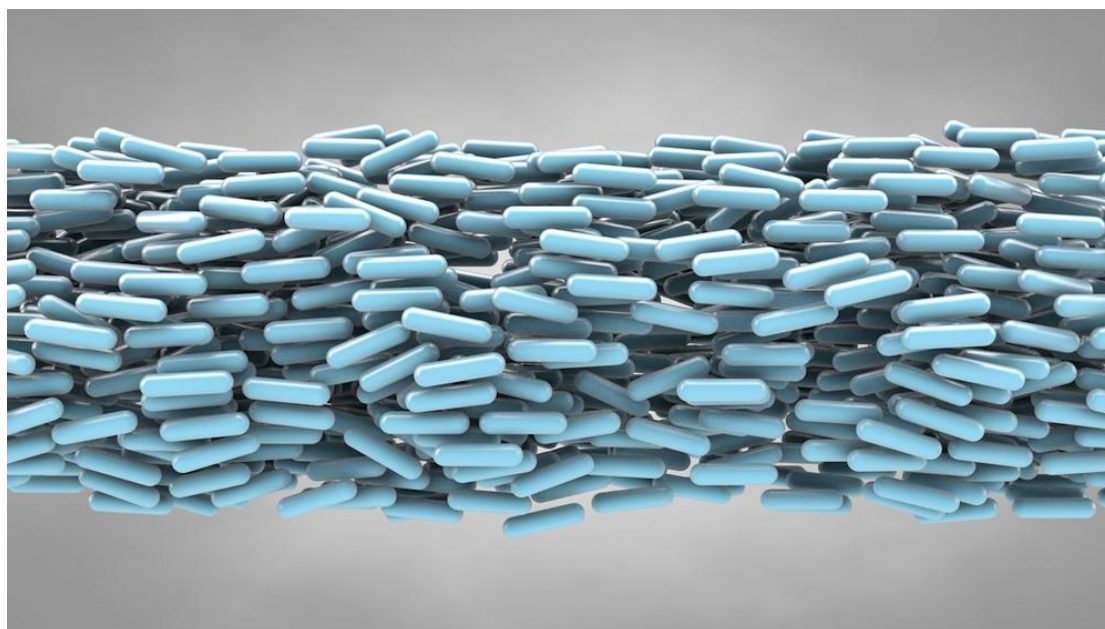
Au contraire, les cristaux liquides présentent tous un ordre orientationnel. Ils sont constitués de mésogènes dont la forme est anisotrope. On distingue deux types de mésogènes anisotropes : les calamitiques (en forme de bâtonnets) et les discotiques (en forme de disque). Certaines des phases cristallines liquides possèdent aussi un ordre positionnel (voir paragraphe smectique). Les cristaux liquides peuvent être divisés en deux classes :

- **Les thermotropes.** Ce sont des phases de mésogène pure (sans solvant) dont la transition de phase isotrope/mésophase (appelée encore « mise en ordre ») dépend uniquement de la température. En augmentant la température, on passe alors successivement d'un solide cristallin à un cristal liquide puis à un liquide isotrope. Pour ces composés, le diagramme de phase comporte souvent plusieurs transitions mésophase/mésophase.
- **Les lyotropes.** Ce sont des **solutions** de mésogène pour lesquels la mise en ordre s'effectue à partir d'une **concentration critique** en mésogène. La structure des phases lyotropes dépend également de la température et de la nature du solvant.

Au-delà du paramètre de mise en ordre, les phases cristallines liquides peuvent également être répertoriées en fonction de leur structure.

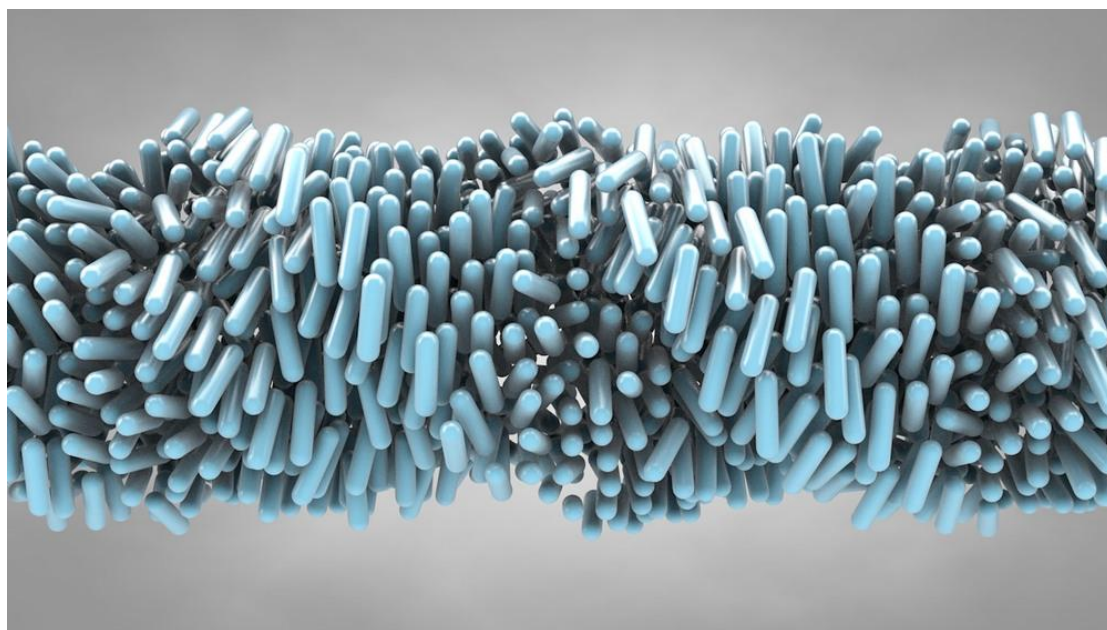
### 3 – Des cristaux liquides aux structures variées.

#### a – Phase nématique, cholestérique et contre-plaqué.

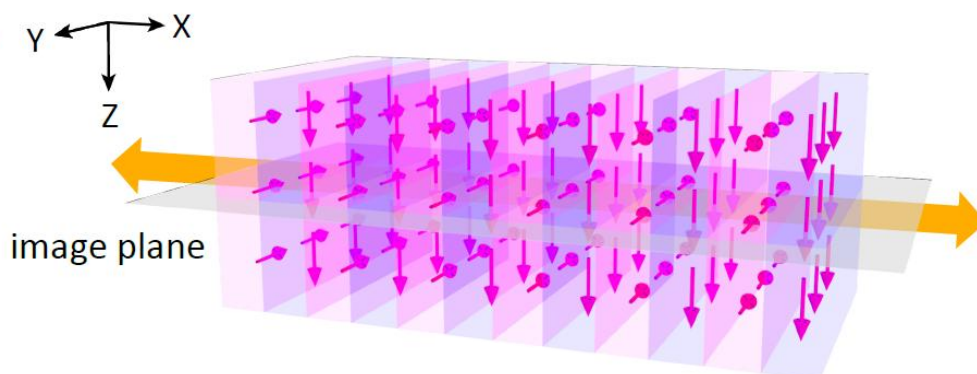


*Figure 3: Représentation schématique d'une phase nématique calamitique. Les mésogènes, figurés sous la forme de bâtonnets bleus, sont orientés selon le directeur. On note qu'il n'y a toutefois pas d'ordre positionnel (d'après [3]).*

La phase nématique est la phase cristalline liquide dont la structure est la plus simple. Elle ne présente aucune organisation positionnelle, comme dans un liquide. Cependant, les mésogènes sont relativement alignés dans une même direction, appelée le directeur. Si le mésogène est calamitique, le directeur est parallèle au grand axe moyen des mésogènes (voir figure 3). Par contre, pour un mésogène discotique, le directeur est perpendiculaire au plan moyen des disques.



**Figure 4 :** Représentation schématique d'une phase nématique chirale calamitique ou phase cholestérique. Les mésogènes, figurés sous la forme de bâtonnets bleus, sont orientés selon le directeur. Le directeur effectue, quant à lui, une rotation continue autour d'un axe perpendiculaire aux plans des mésogènes. On note qu'il n'y a toutefois pas d'ordre positionnel (d'après [3]).



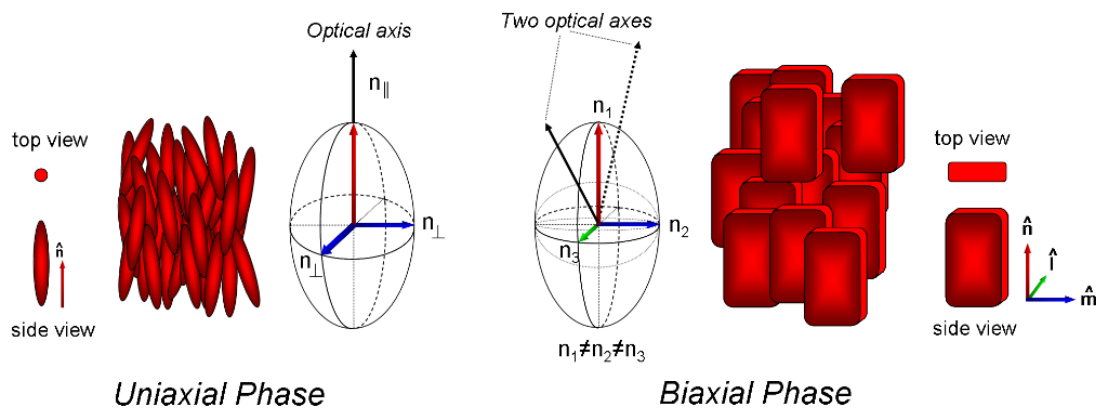
**Figure 5 :** Représentation schématique d'une phase contre-plaqué calamitique. Les mésogènes, polaires, sont figurés sous la forme de flèches roses. On observe l'alternance de lamelles nématiques dont le directeur est successivement orienté selon Y ou selon Z (d'après [5]).

La phase cholestérique est une phase nématique dont le directeur effectue une rotation continue autour d'un axe, appelé axe du cholestérique (figure 4). La phase cholestérique a, par conséquent, une structure hélicoïdale caractérisée par un pas  $\mathbf{p}$ . Les molécules chirales étant asymétriques, le pas  $\mathbf{p}$  vaut deux fois la périodicité de l'hélice [4]. La phase cholestérique étant mesoscopiquement chirale, elle est également appelée phase nématique chirale. Ce type de phase n'est d'ailleurs observé qu'en présence d'un composé chiral (mésogène ou additif).

La phase contre-plaqué est un cas particulier de phase cholestérique où la rotation du directeur est discrète. L'orientation du directeur varie brutalement d'un angle de  $90^\circ$  en passant d'une lamelle de nématique à une autre (figure 5).

Les trois phases présentées ci-dessus sont dites uniaxes : elles ne possèdent qu'un seul directeur (dont l'orientation peut varier). Dans le cas de mésogènes plaquettaires (épaisseur  $\ll$  largeur/longueur), on peut également observer la formation d'une phase nématique biaxe. Les mésogènes sont alors alignés selon deux directeurs (voir figure 6) :

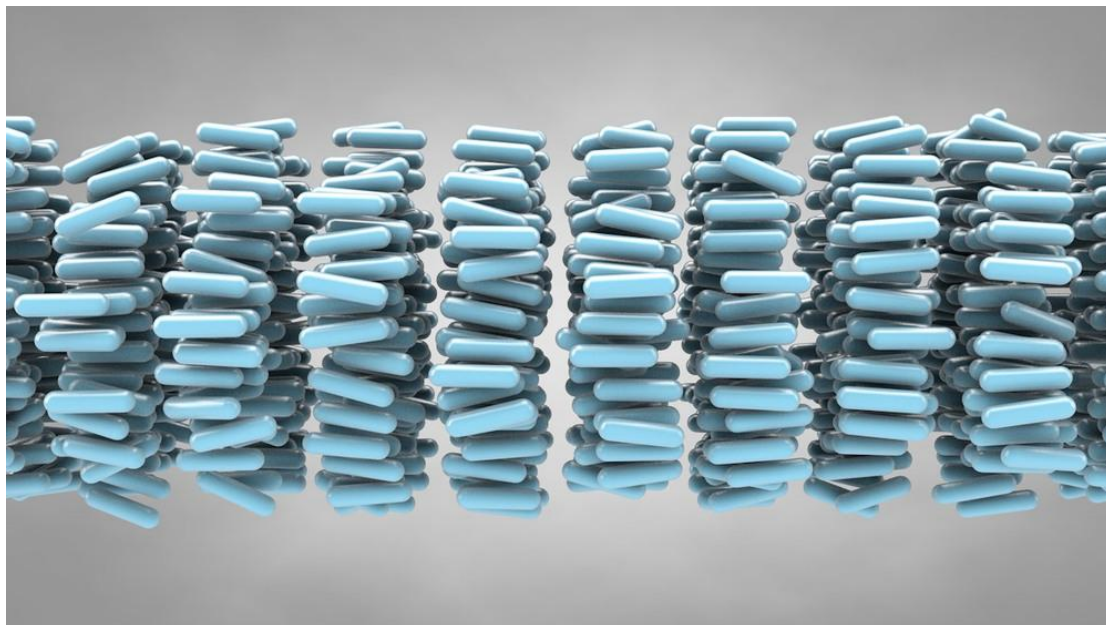
- un directeur parallèle à la moyenne des longueurs des mésogènes.
- un directeur parallèle à la moyenne des largeurs des mésogènes.



**Figure 6 :** Nématique uniaxe (à gauche) et biaxe (à droite) (d'après [6]).

## b – Phase smectique

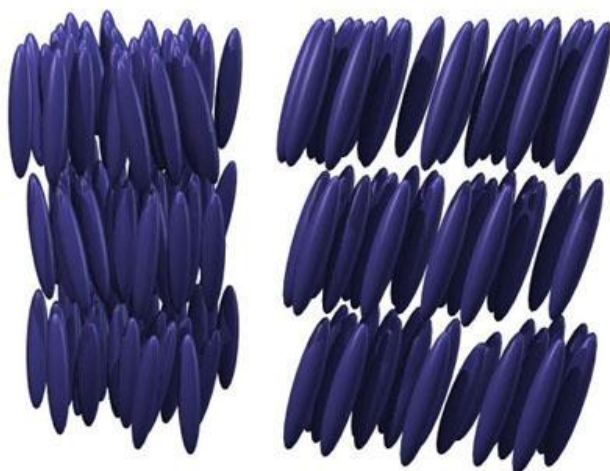
Dans une phase smectique, les mésogènes s'associent pour former des couches fluides **équidistantes** (voir figure 7). Les phases smectiques présentent donc à la fois un ordre orientationnel et un ordre positionnel à une dimension.



*Figure 7 : Représentation schématique d'une phase smectique calamitique. Les mésogènes, figurés sous la forme de bâtonnets bleus, sont orientés selon le directeur. De plus, ils s'associent pour former des couches équidistantes. On observe à la fois un ordre orientationnel et un ordre positionnel (d'après [3]).*

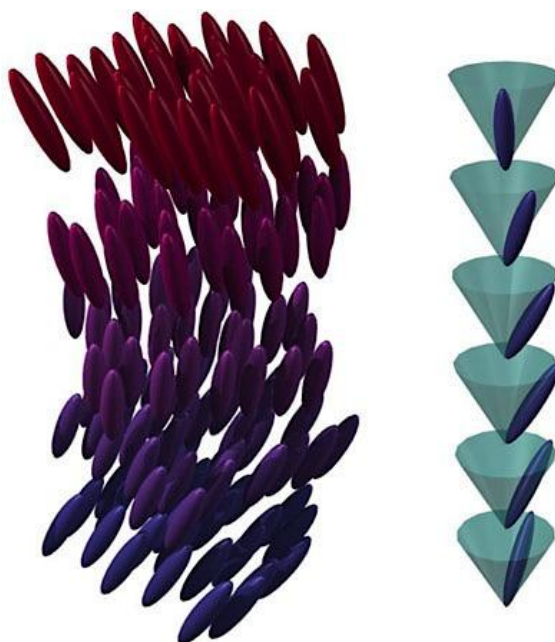
En fonction de l'orientation du directeur, on distingue deux types de smectique (voir figure 8) :

- Smectique A : le directeur est perpendiculaire au plan des couches.
- Smectique C : le directeur est incliné par rapport au plan des couches.



*Figure 8 : Phase smectique A (à gauche) et phase smectique C ou tiltée (à droite) (d'après [7]).*

Enfin, comme pour le nématique, il existe une phase smectique C chirale. Le directeur, incliné, effectue une rotation continue autour de l'axe perpendiculaire au plan des couches (voir figure 9).



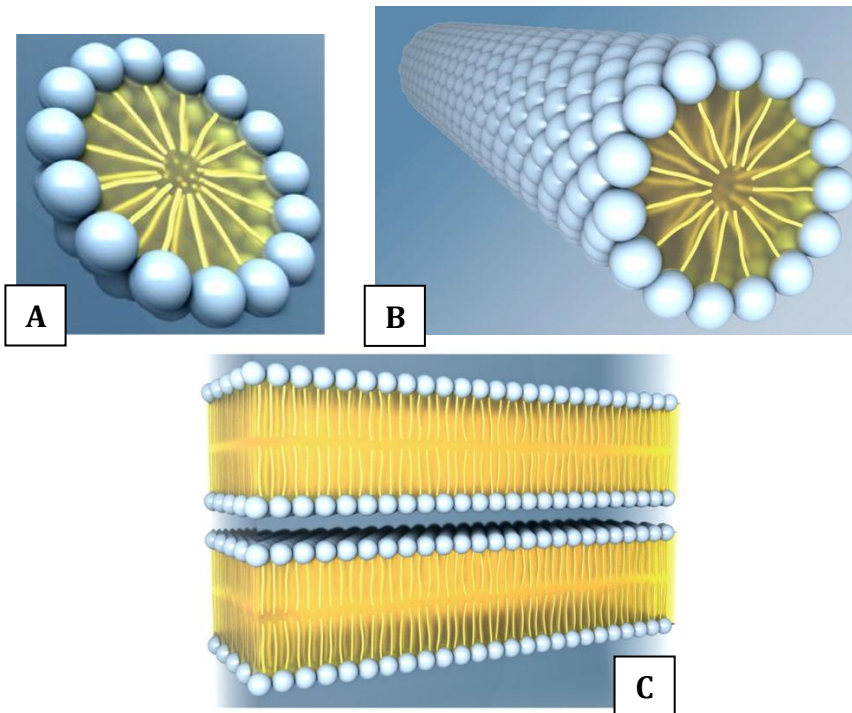
*Figure 9 : A gauche, phase smectique C chirale. A droite, représentation de la rotation du directeur en passant d'une couche à une autre (d'après [7]).*

#### c - Les phases de mésogènes amphiphiles.

L'association de mésogènes amphiphiles dans l'eau est à l'origine d'une riche variété de phases organisées (voir figure 10) :

- **Les micelles** qui peuvent être sphériques ou cylindriques.
- **La phase cubique micellaire.** On l'observe pour une concentration élevée en micelles sphériques. Ces dernières s'empilent alors en formant un réseau cubique (ordre positionnel 3D).
- **La phase hexagonale.** On l'observe pour une concentration élevée en micelles cylindriques. Les micelles cylindriques s'alignent et s'empilent sous la forme d'un réseau hexagonal bidimensionnel (ordre positionnel 2D).
- **La phase lamellaire.** Cette phase ressemble beaucoup à une phase smectique. Les mésogènes s'associent sous forme de bicouches de façon à exposer uniquement les parties hydrophiles en surface. En augmentant la concentration en mésogène, les bicouches s'empilent pour donner la phase lamellaire. Pour une concentration fixée, la distance intercouche est constante (ordre positionnel 1D).
- **La phase cubique bicontinue ou phase gyroïde.** Dans ce système, l'eau et les mesogènes sont séparés en deux phases continues enchevêtrées dont l'interface est également continue. Cette interface forme une surface minimale, triplement périodique, connue sous le nom de gyroïde (voir figure 11). Localement, l'interface peut-être décrite comme une selle de cheval.

A l'ensemble de ces phases, on doit également ajouter les phases dites « inverses » dans le cas où l'eau est un composé minoritaire.



*Figure 10* : Les assemblages obtenus à partir de mésogènes amphiphiles dispersés dans l'eau (d'après [50]). En A, une micelle sphérique directe. En B, une micelle cylindrique directe. En C, une phase lamellaire.



*Figure 11* : Sculpture représentant un gyroïde. En suivant les arêtes, on peut observer les courbures en forme de selle de cheval (d'après [8]).



Après cette introduction sur les cristaux liquides, intéressons nous à présent à leur place dans le monde du vivant.

## II – Cristaux liquides et biologie.

Basées sur des liaisons faibles et dynamiques, combinant à la fois fluidité et organisation, les mésophases sont adaptées aux systèmes vivants [9]. Observables *in vivo*, elles peuvent avoir un rôle structural (membrane) ou fonctionnel (stockage, adhésion, mouvement, etc.). La phase cristalline liquide peut également être un état transitoire afin d'obtenir un matériau organisé (soie d'araignée, nacre, etc.). Enfin, un grand nombre de biomolécules (collagène, insuline, chitine, etc.) se comportent, *in vitro*, comme des mésogènes. Cette partie a pour but d'illustrer à la fois la diversité chimique mais également structurale des mésophases biologiques.

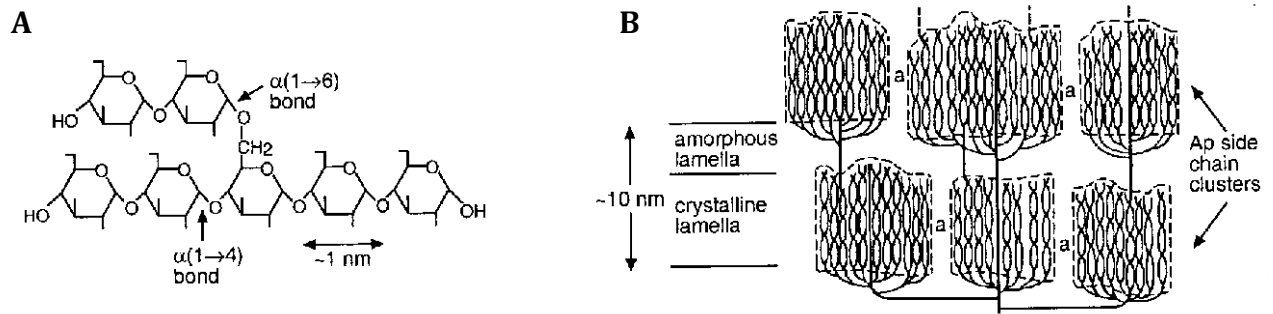
### 1 – Mésophases *in vivo*.

L'exemple le plus frappant de mésophase biologique demeure la membrane biologique. Cette dernière est majoritairement constituée de phospholipides (molécules amphiphiles) associés en une bicouche thermodynamique stable (cf phase lamellaire). Les membranes ont un rôle structural puisqu'elles délimitent des compartiments contenant des fluides différents (organites, noyau, cellule, etc.).

Le caractère fluide de la membrane lui confère également de nombreux avantages. Au sein de la membrane, elle permet tout d'abord une diffusion latérale rapide des lipides et des protéines membranaires [10]. Cette diffusion serait impliquée dans la formation de micro-domaines dynamiques tels que les radeaux lipidiques. Des membranes fluides ont également la capacité de fusionner ou de se séparer. Ces mécanismes sont prépondérants dans les phénomènes d'exocytose et d'endocytose. Ils sont aussi impliqués dans le transport de protéines à travers l'appareil de Golgi [10]. Enfin, la fluidité est à l'origine du caractère déformable de la membrane. C'est cette propriété qui permet par exemple aux cellules de s'étirer et de créer des pseudopodes.

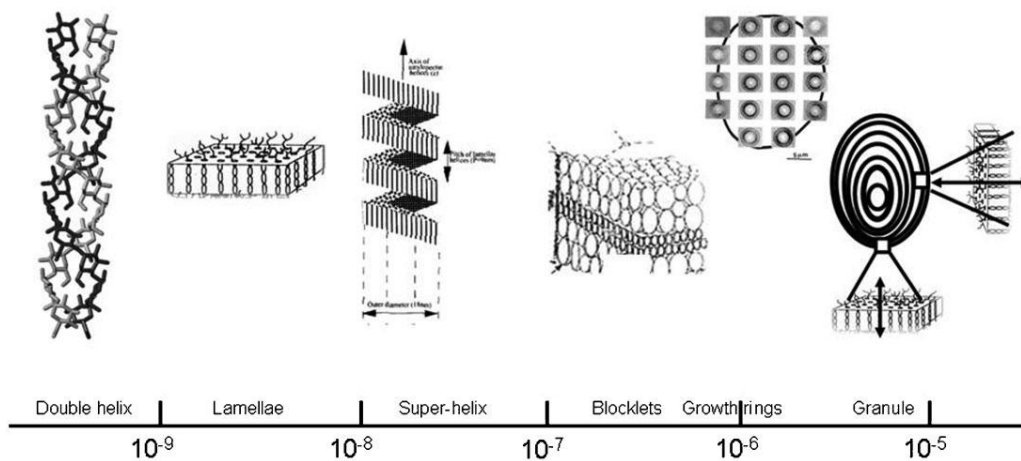
Un nombre important de polysaccharides et de protéines forment également des mésophases *in vivo*. Chez les végétaux supérieurs, l'amidon sert de molécule de stockage de l'énergie et des nutriments. Il est constitué de deux macromolécules :

- L'amylose (20 à 30%), un polymère linéaire qui résulte de l'association d'unités D-glucose par des liaisons osidiques  $\alpha$ -(1-4).
- L'amylopectine (70 à 80%), une version très ramifiée de l'amylose dont les branches de poly-D-glucose sont liées à la chaîne principale par des liaisons osidiques  $\alpha$ -(1-6).



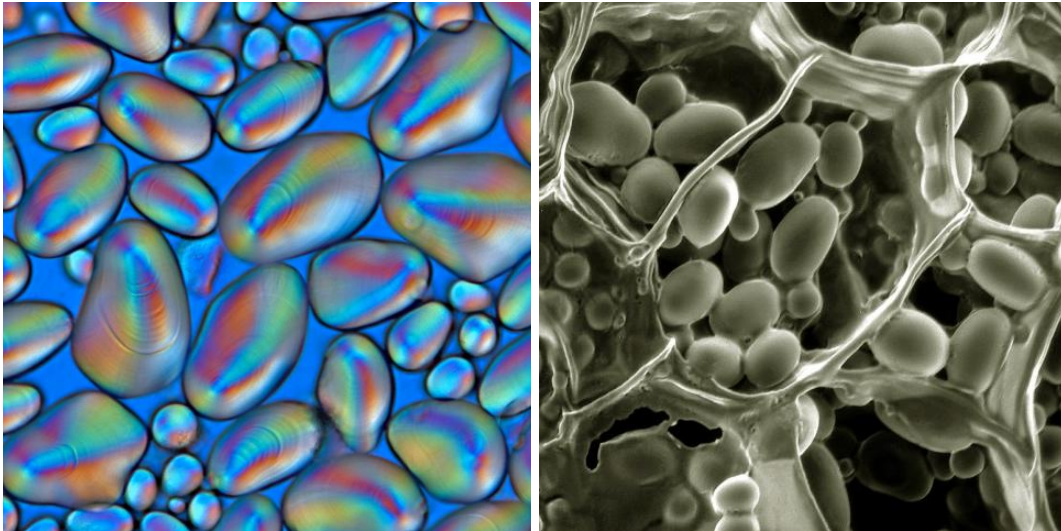
**Figure 12 :** L'amylopectine (Ap), un polysaccharide cristal-liquide en peigne. En A, structure chimique de l'amylopectine. La chaîne principale est constituée d'unités D-glucose liés par des liaisons osidiques  $\alpha$ -(1-4). Des branches de poly-D-glucose sont attachées à la chaîne principale par des liaisons osidiques  $\alpha$ -(1-6). Dans l'eau, les branches de l'amylopectine s'associent par deux et forment des doubles hélices. Ces doubles hélices sont des mésogènes capables de former des phases smectiques (B) (d'après [11]).

L'amylopectine appartient à la famille des polymères cristaux-liquides en peigne. En effet, les branches de poly-D-glucose, associées en double hélice, sont des mésogènes. En présence d'eau, ces ramifications forment une phase smectique dont les feuillets sont alternés par des couches amorphes de chaînes principales (voir figure 12).



**Figure 13 :** Les différents niveaux de structuration de l'amylopectine au sein de l'amyloplaste (d'après [12]).

Le mésogène étant chiral (hélice double), la phase smectique subit également un twist, induisant la formation d'une superhélice de feuillets (smectique C chirale). Récemment, il a été supposé que cette phase lamellaire s'agence, à plus grande échelle, sous la forme de « blocklets » sphérique, une structure rappelant celle des tactoïdes [12].



**Figure 14 :** *L'amyloplaste, l'organe de stockage de la cellule végétale. A gauche, amyloplastes de pomme de terre observées en microscopie à lumière polarisée (MOP) entre polariseurs croisés (d'après [17]). L'organisation hiérarchisée de l'amylopectine est à l'origine de la biréfringence de l'amyloplaste. On distingue également une striation qui est due à l'alternance des couches amorphes et des couches de phase smectique. A droite, observation MEB d'amyloplastes matures au sein de cellules de pomme de terre. On distingue également les parois cellulaires végétales.*

Les blocklets structurés d'amylopectine s'associent ensuite en couches concentriques ; couches séparées par une matrice amorphe d'amylose (voir figure 13). Cet ensemble forme un organite sphérique responsable du stockage de l'énergie dans la cellule végétale : l'amyloplaste (voir figure 14). L'organisation en phase cristalline liquide présente, pour la fonction de stockage, plusieurs avantages :

- La compaction des macromolécules.
- La formation d'une structure hautement hiérarchisée sur laquelle peut-être déposée de nouvelles couches d'amidon [13].

Une fluidité rémanente qui autorise une diffusion et une métabolisation rapide de l'amidon.

L'utilisation de mésophase pour le stockage de macromolécules serait une stratégie utilisée également par les limaces et les escargots ! Le mucus est la bave visqueuse produite par les gastéropodes pour se mouvoir et adhérer à diverses surfaces verticales. Cette substance sert également de barrière chimique et biologique et protège l'animal contre la déshydratation.

Outre l'eau, le constituant majoritaire du mucus est la mucine. La mucine est une protéine constituée de segments rigides et hautement glycosylés (hydrophiles) espacés par des segments flexibles et non-glycosylés (hydrophobes). En étudiant des trainées de bave déposées par des limaces sur des lames de verre, Viney *et al.* ont démontré que la mucine forme localement des phases cristallines liquides nématiques. La présence des phases dépend de l'hydratation du mucus, c'est à dire de la concentration en mucine. Pour ces auteurs, la mucine peut donc être assimilée à un chapelet de mésogènes

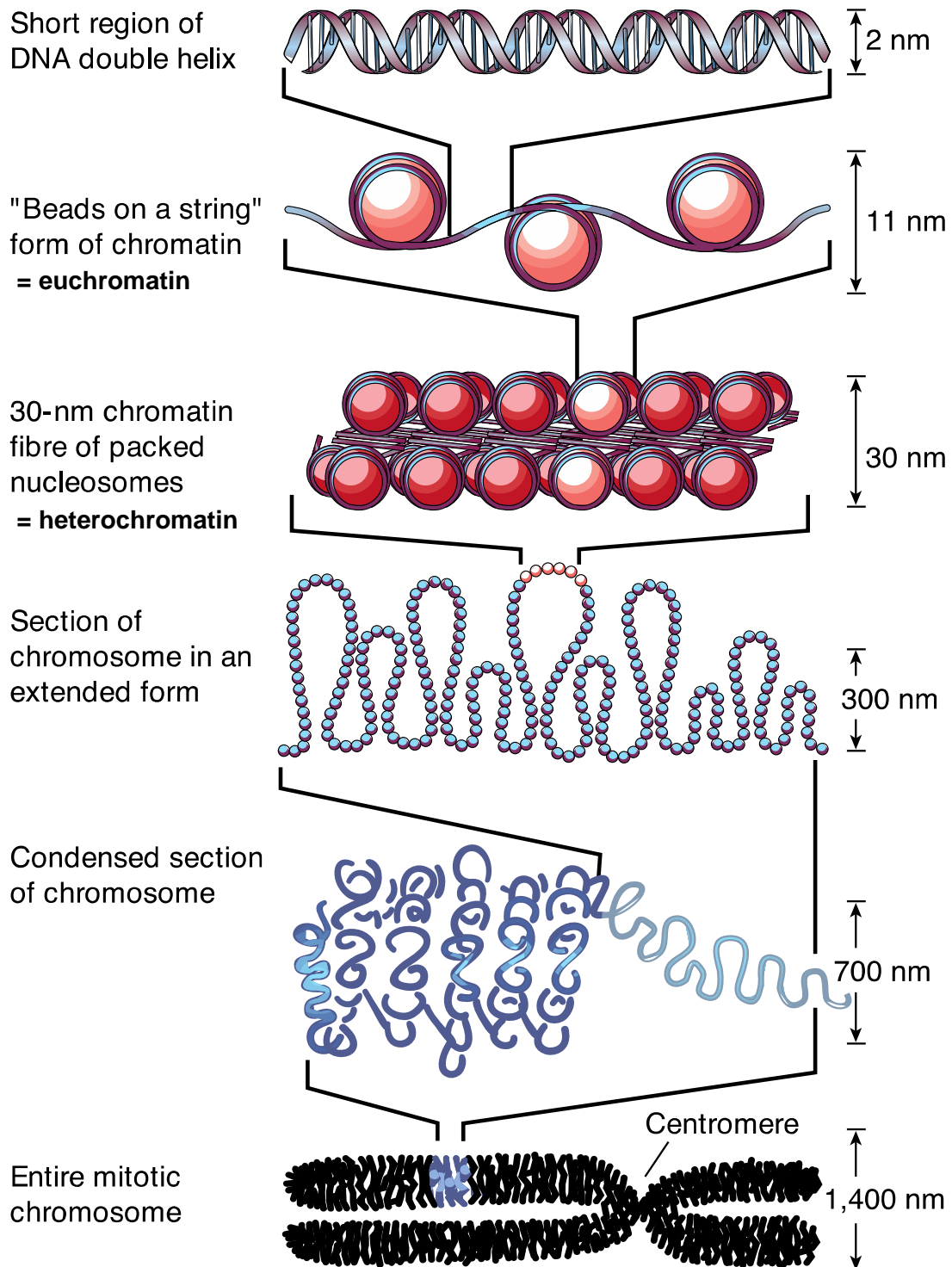
(segments glycosylés rigides) lyotropes. Les propriétés d'auto-association de la mucine ont plusieurs implications :

- Le mucus est produit et sécrété par des cellules exocrines spécialisées sous la forme de granules. Au sein de ces granules, les macromolécules sont condensées en présence d'une quantité élevée de  $\text{Ca}^{2+}$  [14]. Au cours de l'exocytose, le granule éclate et libère le mucus qui gonfle de manière dramatique (plus de cent fois son volume original) en quelques secondes. Une expansion aussi rapide de la mucine ne peut s'expliquer que si la mucine condensée est organisée au sein du granule [15].
- Une limace se déplace en glissant sur le mucus qu'elle produit. Au repos, le mucus se comporte comme un hydrogel visco-élastique dont la réticulation est dû à l'enchevêtrement de la mucine. La déformation induite par le déplacement de l'animal modifie le comportement rhéologique du mucus : il devient alors un liquide visqueux sur lequel la limace peut glisser. Entre les mouvements de cisaillement, le mucus se comporte à nouveau comme un solide, assurant l'adhésion de l'animal. Denny *et al.* ont montré qu'il suffit d'une seconde pour observer le retour à un comportement solide [16]. En absence de contrainte, la formation locale de mésophases pourrait expliquer ce changement rapide de comportement.
- Les gastéropodes bougent très peu au cours d'une journée. Ils peuvent rester plus de 12h accrochés à une paroi verticale sans bouger. Toutefois, sous l'effet d'une contrainte constante, le mucus relaxe bien plus rapidement (1 à 2h). Par conséquent, la limace devrait théoriquement glisser et tomber de la paroi sous l'effet de la gravité ! Si on observe ce mucus « d'ancrage » en microscopie à lumière polarisée, on distingue alors un réseau fibrillaire biréfringent de mucine. La formation de ce réseau augmente dramatiquement le module élastique du mucus ainsi que son temps de relaxation sous contrainte. Selon Viney *et al.*, la fibrillation de la mucine pourrait être facilitée par son association préalable en mésophase.

Pour conclure, la formation de phases cristallines liquides de mucine semble donc être un phénomène crucial pour permettre le déplacement et l'adhésion de la limace.

Dernier exemple de mésogène biologique : l'ADN. Dans le noyau eucaryote, l'ADN est lié à des protéines spécifiques, les histones, pour former la chromatine. Initialement, quatre paires d'histones s'associent pour créer un complexe cylindrique nommé nucléosome. La double hélice d'ADN s'enroule ensuite autour des nucléosomes, constituant ainsi la fibre nucléosomique.

Le degré de compaction de la fibre étant assez faible, c'est à ce niveau qu'ont lieu la transcription et la réplication de l'ADN. On parle d'ailleurs de chromatine active ou encore d'euchromatine. A l'inverse, l'hétérochromatine désigne la partie dense, métaboliquement inactive, de la chromatine. L'hétérochromatine est constitué d'agrégats de nucléosomes (entourés d'ADN) appelés solénoïdes (voir figure 15).

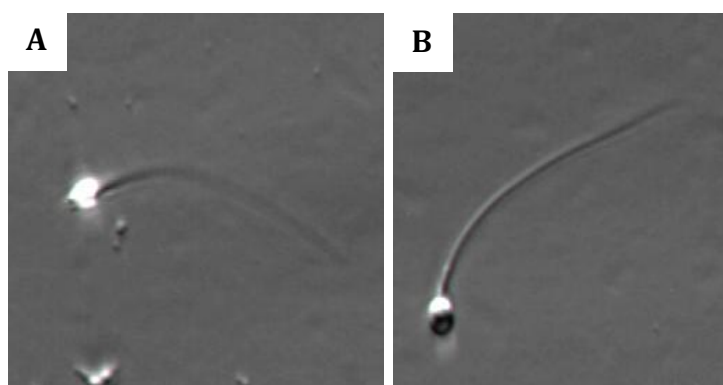


**Figure 15:** L'organisation de l'ADN au sein de la chromatine d'une cellule eucaryote somatique (d'après [22]).

Les phénomènes de compaction/décompaction de la chromatine font partie intégrante des mécanismes de régulation de la transcription d'un gène. En effet, le degré de compaction de la chromatine est finement régulé par plusieurs facteurs (la méthylation de l'ADN, la méthylation et l'acétylation des histones, etc.).

Cependant, chez certaines cellules dont le matériel génétique n'est peu ou pas utilisé, la chromatine peut présenter un degré de compaction bien plus élevée. C'est le cas du spermatozoïde mature. Au cours de la spermiogenèse, l'ADN est compacté progressivement sous la forme d'une mésophase. La structure de ces phases cristallines liquides d'ADN varie en fonction des espèces (voir tableau 1), allant de la phase cholestérique à l'hexagonale compacte [18]. Contrairement aux cellules eucaryotes classiques, l'ADN n'est plus associé aux histones mais à de petites protéines s'insérant dans le petit sillon de la double hélice : les protamines. Ainsi, l'ADN garde une structure linéaire à l'origine de ses propriétés de mésogène. La formation d'une mésophase d'ADN permet de stocker l'intégralité du matériel génétique dans un espace extrêmement réduit tout en conservant son intégrité.

En effet, le spermatozoïde est la cellule humaine dont le volume cytoplasmique est le plus faible (sans compter le flagelle). A titre de comparaison, la chromatine d'un spermatozoïde est six fois plus compacte qu'un chromosome d'une cellule somatique [19]. Aujourd'hui, l'étude de la biréfringence du noyau du spermatozoïde est devenue un critère de sélection pour la fécondation *in vitro*. Elle permet tout d'abord de détecter les spermatozoïdes ayant perdu leur acrosome (voir figure 16). De plus, elle augmente significativement la probabilité de sélectionner un gamète avec un ADN intact [20, 21].



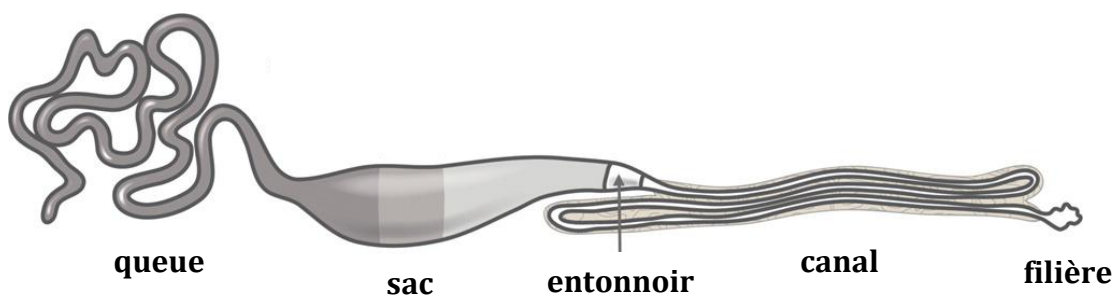
**Figure 16 :** Fécondation *in vitro* et biréfringence des têtes de spermatozoïdes. En utilisant un microscope optique inversé équipé de polariseurs, il est possible de sélectionner les spermatozoïdes en fonction de leur biréfringence. En A, on observe un spermatozoïde dont la totalité de la tête est biréfringente. Ce spermatozoïde possède donc encore son acrosome. En B, seule la partie basse de la tête présente une biréfringence. Ce spermatozoïde a perdu son acrosome et possède un noyau viable dont l'ADN est correctement compacté (d'après [21]).

2 – Des mésophases biologiques aux matériaux organisés.

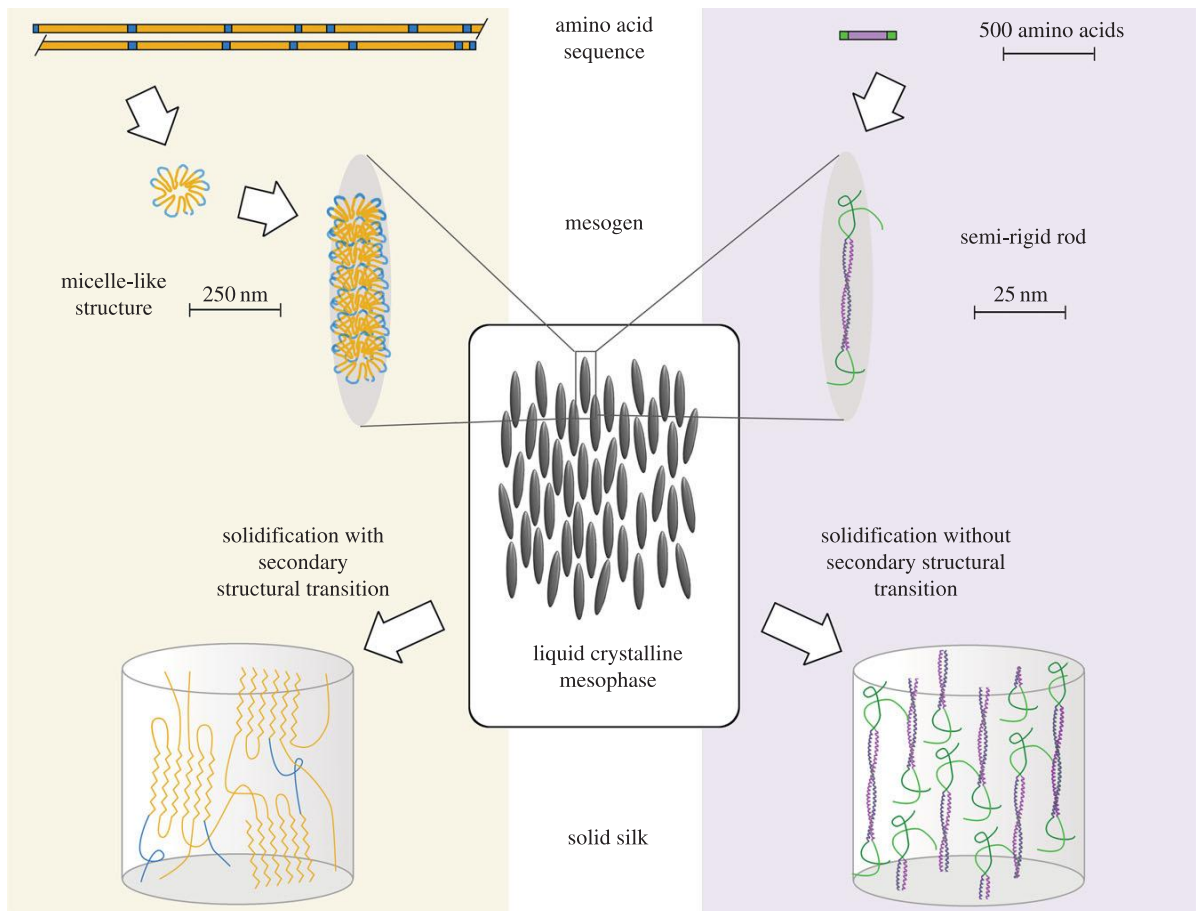
Certains organismes tirent profit de mésophases transitoires afin de produire des matériaux hiérarchiquement organisés.

Pour tisser une toile résistante capable d'arrêter des insectes en plein vol, une araignée doit extruder des fils de soie dense et structurée. Ces fils de soie sont constitués majoritairement de deux protéines, les spidroïnes I et II. Ces protéines de haut poids moléculaire (250 kDa) ont une séquence primaire assez similaire : elles sont composées de longs domaines hydrophobes (polyalanine) séparés par de petits espaceurs hydrophiles et flexibles (séquence riche en glycine) [23]. Au sein de la fibre de soie, les domaines hydrophobes des spidroïnes sont associés en feuillets  $\beta$  étendus qui forment de véritables cristallites. Ces cristallites, dispersés dans une matrice amorphe constituée des espaceurs hydrophiles, sont alignés le long de l'axe de la fibre [9, 23, 24]. C'est cette structuration des protéines à plusieurs échelles qui donne à la soie ses propriétés mécaniques exceptionnelles [23, 24].

Cependant, afin de produire ses fils, une araignée doit extruder une solution dense (environ 50% de protéines) et très visqueuse (de l'ordre du kPa.s) de spidroïne à travers un canal de quelques dizaines de microns de diamètre. Si la mise en forme d'un tel matériau représente un véritable challenge [25], l'araignée a adopté une stratégie originale et énergétiquement avantageuse : elle se place dans des conditions physico-chimiques où la spidroïne forme une phase nématique. L'alignement relatif des protéines permet de diminuer grandement leur friction au cours de l'extrusion. La mésophase de spidroïne se comporte alors comme un matériau rhéofluidifiant [26]. Holland *et al.* [27] ont d'ailleurs comparé le travail à fournir pour créer, par cisaillement, des structures fibrillaires à partir d'une mésophase de soie et d'un fondu isotrope de polymère synthétique (polyéthylène haute densité). Ils ont estimé que la formation de fibre de soie requiert une énergie mille fois moindre que celle du PEHD !



**Figure 17 :** Schéma de la glande ampulacée majeure de l'araignée. La glande est composée de 5 parties. Les cellules épithéliales de la queue et du sac sécrètent les protéines séricigènes. Dans le sac, la solution dense de spidroïne se comporte comme une phase nématique. Cette solution est ensuite expulsée à travers l'entonnoir et le canal où les domaines hydrophobes de la spidroïne sont étirés et alignés sous la contrainte élongationnelle. Dans la partie finale du canal, la mésophase préalignée est stabilisée sous la forme d'une fibre de soie solide. La fibre est finalement expulsée à travers la filière (d'après [28]).



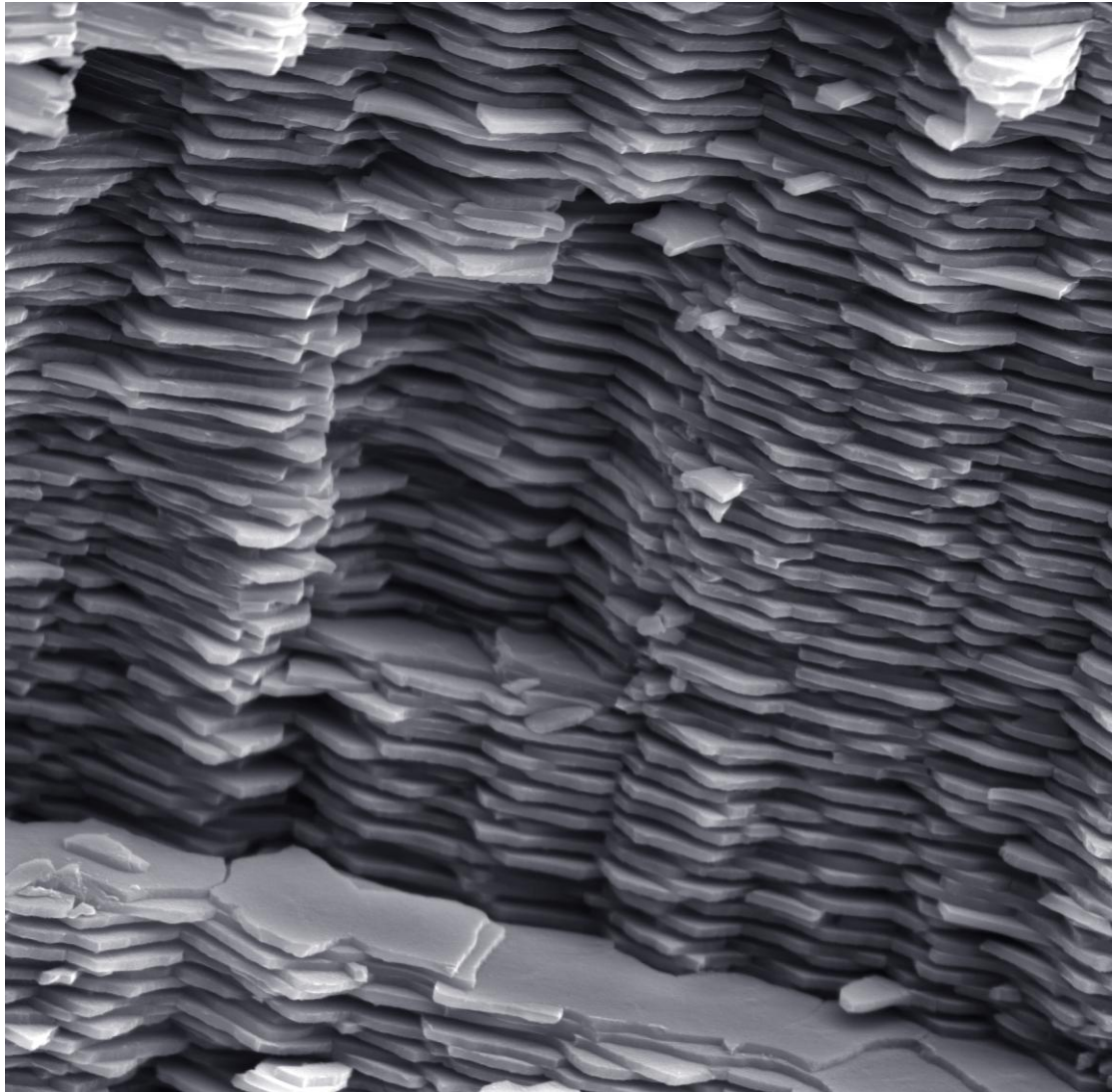
**Figure 18 :** Mise en forme de la soie à partir de mésophases de protéines séricigènes. A gauche, les longues protéines amphiphiles (ex : spidroïne, fibroïne de ver à soie.) se replient sous la forme de micelles capable de s'associer en mésophase. Soumises à une contrainte élongationnelle et après une modification progressive des conditions physico-chimiques (pH, concentration en ions, degré d'hydratation, etc.), les micelles se déplient et les protéines adoptent une conformation en feuillet  $\beta$  étendu. A droite, la structure en bâtonnet des petites protéines (ex : fibroïne d'abeille.) leur confèrent directement un caractère de mésogène. Comme pour les micelles, la formation d'une mésophase permet de fluidifier et d'orienter les protéines séricigènes (d'après [25]).

L'utilisation d'une mésophase de spidroïne, sous contrainte élongationnelle, contribue également à la formation des cristallites de feuillets  $\beta$  [ref]. Chez l'araignée, la spidroïne des fils de trame est sécrétée par les cellules épithéliales de la queue et du sac de la glande ampulacée majeure (voir figure 17). Comme nous l'avons vu précédemment, cette solution de spidroïne est dense et se comporte comme une phase nématique. La conformation de la spidroïne dans cette solution n'est pas clairement comprise mais elle diffère grandement de celle observée dans le fil de soie [23]. Jin *et al.* [29] ainsi que Walker *et al.* [25] suppose que la spidroïne se replie tout d'abord sous la forme de micelles (voir figure 18). Dans le sac de la glande, les micelles concentrées formeraient des agrégats ; agrégats organisés sous la forme d'une phase nématique. En passant à travers le canal, sous une contrainte élongationnelle, les micelles se déplient progressivement et les domaines hydrophobes des



spidroïnes s'étirent et s'alignent, favorisant la formation de futurs cristallites. Dans la partie finale du canal, la mésophase, ainsi pré-alignée, est stabilisée sous la forme d'une fibre solide, la fibre de soie.

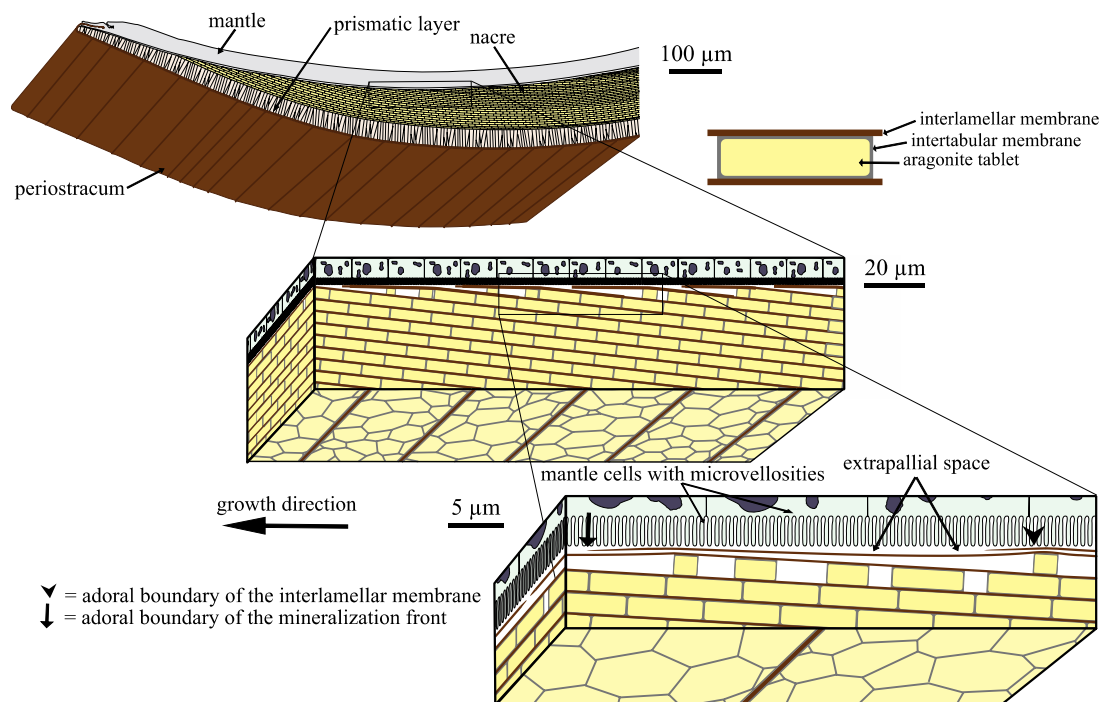
De nombreux organismes (abeille, ver à soie, mite, etc.) sont capables de produire de la soie. La composition de ces soies et la structure des cristallites qui les constituent varient assez fortement d'une espèce à autre. Toutefois, le passage par une mésophase de protéine séricigène, afin de fluidifier et organiser le matériau final, est une stratégie commune à tous ces organismes (voir figure 18). Cette stratégie semble donc présenter un avantage évolutif [25].



*Figure 19 : Nacre d'abalone observée au microscope électronique à balayage. Les plaquettes d'aragonite, d'épaisseur contrôlée, sont empilées régulièrement en une structure dite en « mur de brique ». La matrice organique n'est pas observable sur ce cliché (d'après [30]).*

Mon second exemple de mésophase biologique transitoire concerne la synthèse de la nacre. La nacre est un matériau hautement organisé constitué de plaquettes d'aragonite (95%) dont la disposition est dite en « mur de brique » (voir figure 19). Les plaquettes sont « cimentés » par une matrice organique (5%) comprenant des cristallites de chitine et des protéines.

La structure de ce « mur », chez les mollusques bivalves (ex : moules, huitres, etc.), est représentée sur la figure 20. La particularité de ce « mur » de nacre se situe dans sa mise en forme : c'est le mortier, ici, qui est disposé au préalable avant de combler les espaces vacants par des briques !



**Figure 20 :** Représentation schématique de la structure de la nacre chez les mollusques bivalves (d'après [31]).

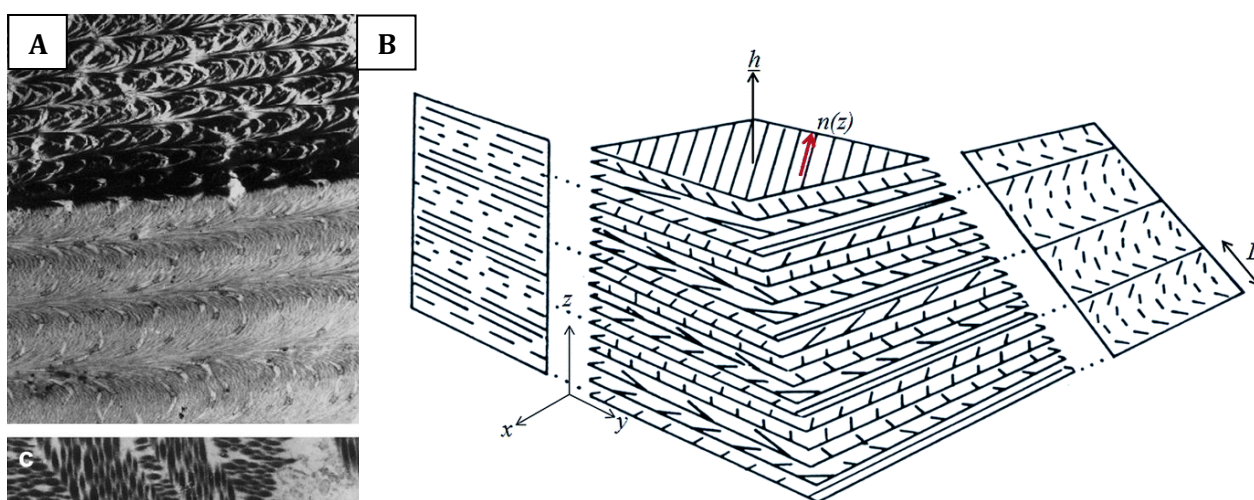
Premièrement, dans l'espace extrapalléal, les cellules épithéliales du manteau sécrètent un mélange de cristallites de chitine, de protéines et de précurseurs inorganiques. Les cristallites de chitine, bâtonnets polyosidiques rigides de vingt nanomètres de diamètre pour quelques centaines de nanomètres de longueur, s'associent alors en une phase cholestérique. L'espace extrapalléal étant très étroit, les cristallites ne peuvent former qu'une seule couche de cristal liquide. Par ce procédé de déposition de mésophase de type « layer by layer », les mollusques bivalves forment de nouvelles membranes interlamellaires tout en contrôlant la distance entre ces dernières. Les précurseurs inorganiques, en présence de protéines acides, polymérisent ensuite dans le nouvel espace interlamellaire pour donner des plaquettes d'aragonite de taille et de forme contrôlée [31]. La mésophase de chitine est finalement « solidifiée » par l'incorporation de protéines supplémentaires [32].

Au cours de la synthèse *in vivo* de la nacre, les mollusques bivalves utilisent donc la déposition de couches de mésophase afin de créer un réseau tridimensionnel bien défini au sein duquel la composante inorganique peut ensuite cristalliser. Cette démarche biomimétique qui consiste à tirer profit de l'organisation d'une phase cristalline liquide afin de réaliser un matériau hautement structuré est celle que nous souhaitons utiliser pour recréer des tissus à base de collagène.

### 3 – Mésophases biologiques *in vitro* et morphogénèse.

Au cours des années 1960, Yves Bouligand a établi un parallèle intéressant entre la structure de certains tissus biologiques organisés (ex : os

humain, carapace de crabe, paroi de poire, etc.) et les phases cristallines liquides [33]. Il a démontré que les motifs en arceaux observés dans ces tissus correspondent en fait à une coupe oblique d'une structure en contre-plaqué « twisté » (voir figure 21). Or, cette structure ressemble fortement à une phase cholestérique stabilisée. Yves Bouligand a émis l'hypothèse que la formation de nombreux tissus biologiques (ou morphogénèse) passe par l'établissement d'une phase cristalline liquide qui serait ensuite « solidifiée ». Comme nous l'avons vu ci-dessus, ce type de stratégie est effectivement impliqué dans la synthèse de la soie ou encore de la nacre. Afin de vérifier cette hypothèse, de nombreuses équipes ont étudié *in vitro* la structure des phases denses de polysaccharide, de protéines structurales et même de virus [9, 34] ! Les nanocristaux de cellulose ou de chitine ainsi que la triple hélice de collagène ont ainsi été identifiés comme des mésogènes capables de former des phases cholestériques [35-37].



**Figure 21 :** La structure de Bouligand. En A, coupe d'une carapace de crabe déminéralisée observée en MET [33]. La chitine, molécule majoritaire de la matrice organique du crabe, semble former des arceaux. En B, ces motifs en arceaux sont en fait la projection d'une structure en contre-plaqué « twisté », encore appelée « structure de Bouligand ». Cette structure ressemble fortement à une phase cholestérique [49].

Au LCMCP, nous nous sommes plus particulièrement intéressé aux mésophases de collagène dans des solutions aqueuses à pH acide [37-39]. Trois thématiques liées aux phases cristallines liquides de collagène *in vitro* coexistent depuis au laboratoire :

- **Une thématique « os »** (Nadine Nassif, Marie-Madeleine Giraud-Guille) où des solutions de collagène sont concentrées pour obtenir une phase cholestérique puis fibrillées en présence de précurseurs inorganiques. Ce type de stratégie a permis d'obtenir des matériaux dont la structure est proche de l'os primaire [40] et qui ont été implanté avec succès chez le petit (rat) et le grand animal (brebis) [41]. Ce projet est maintenant suivi depuis quelques années par la SATT-Lutech en vu d'une valorisation [42].
- **Une thématique « tendon »** (Léa Trichet, Gervaise Mosser) Des conditions permettant de reproduire *in vitro* la structure en « crimp » observée au sein du tendon ont été identifiées au laboratoire. Dans le

cadre de la thèse de Lise Picaut, en codirection avec Tristan Baumberger de l'INSP (UPMC, Paris), des travaux sont actuellement menés afin de développer un dispositif permettant d'extruder et de fibriller des mésophases de collagène tout en générant et figeant une structure de type « crimp ». En parallèle, dans le cadre de son doctorat, Clément Rieu étudie des mélanges concentrés collagène-fibrine dans le but de recréer la jonction musculo-tendineuse.

- **Une thématique « cornée »** (Gervaise Mosser). Ces dernières années, Paulo De Sa Peixoto et Franck Wendel ont identifié plusieurs conditions physico-chimiques donnant des phases cristallines liquides de collagène de type contre-plaqué [38]. Après fibrillation, certaines de ces phases permettent d'obtenir des matériaux mimant à la fois la structure et la transparence de la cornée. Au cours de ces trois dernières années, Aurélien Tidu a consacré sa thèse à développer et caractériser des substituts cornéens à partir de mésophases de collagène [43]. Il a également cherché à incorporer des cellules cornéennes au sein de ces matrices. L'ensemble des travaux sur la cornée est actuellement suivi par la SATT-Lutech.

Le projet de ma thèse s'inscrit dans la thématique cornée. J'ai essayé, au cours de ces trois dernières années, de répondre aux questions suivantes :

- Peut-on substituer partiellement le collagène par de la gélatine sans perdre la structure en contre-plaqué ?
- Quel est le ratio limite à partir duquel on perd la structure en contre-plaqué ?
- Après fibrillation, les mélanges collagène/gélatine reste-t-il transparent ?

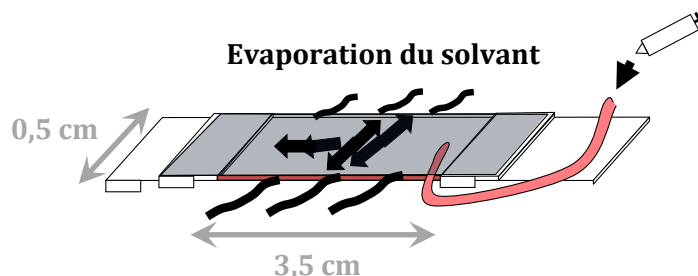
Avant d'étudier les mélanges collagène/gélatine, je me suis tout d'abord intéressé à la structure des solutions concentrées de gélatine A.

### III – Etude structurale des phases denses de gélatine et de collagène/gélatine.

#### 1 – Description du dispositif d'étude : la microcellule.

Pour étudier les solutions denses de collagène et de gélatine, nous avons eu recours à un dispositif mis au point en 2005 [39] par Gervaise Mosser, la microcellule. Une microcellule est un espace confiné de 300 microns d'épaisseur ouvert latéralement pour permettre une évaporation naturelle du solvant (voir figure 24). Elle est constituée de deux lamelles de verre séparées aux deux extrémités par des espaceurs. Une solution diluée de protéines (de l'ordre du mg/mL) y est injectée en continu via un capillaire. La vitesse d'injection est réglée de manière à compenser l'évaporation du solvant. Par conséquent, le volume de solution dans la microcellule est considéré comme constant au cours du temps. La concentration en protéines augmente petit à petit au niveau de l'interface eau/air, créant ainsi un gradient de concentration entre le bord et le centre de la microcellule. La microcellule est donc un dispositif qui permet

d'observer des solutions de protéines sur plusieurs décades de concentration (entre 1 et 1000 mg/mL). La microcellule présente également l'avantage d'être directement observable en microscopie photonique (ex : microscopie à lumière polarisée, microscopie multiphoton). En moyenne, les microcellules sont observées après quatre jours d'injection continue.



**Figure 22 :** Représentation schématique d'une microcellule (d'après [5]). Le volume en rouge correspond à l'espace occupé par la solution de protéines. Les flèches indiquent la direction du gradient de concentration en protéines (pointe de la flèche = zone de concentration élevée).

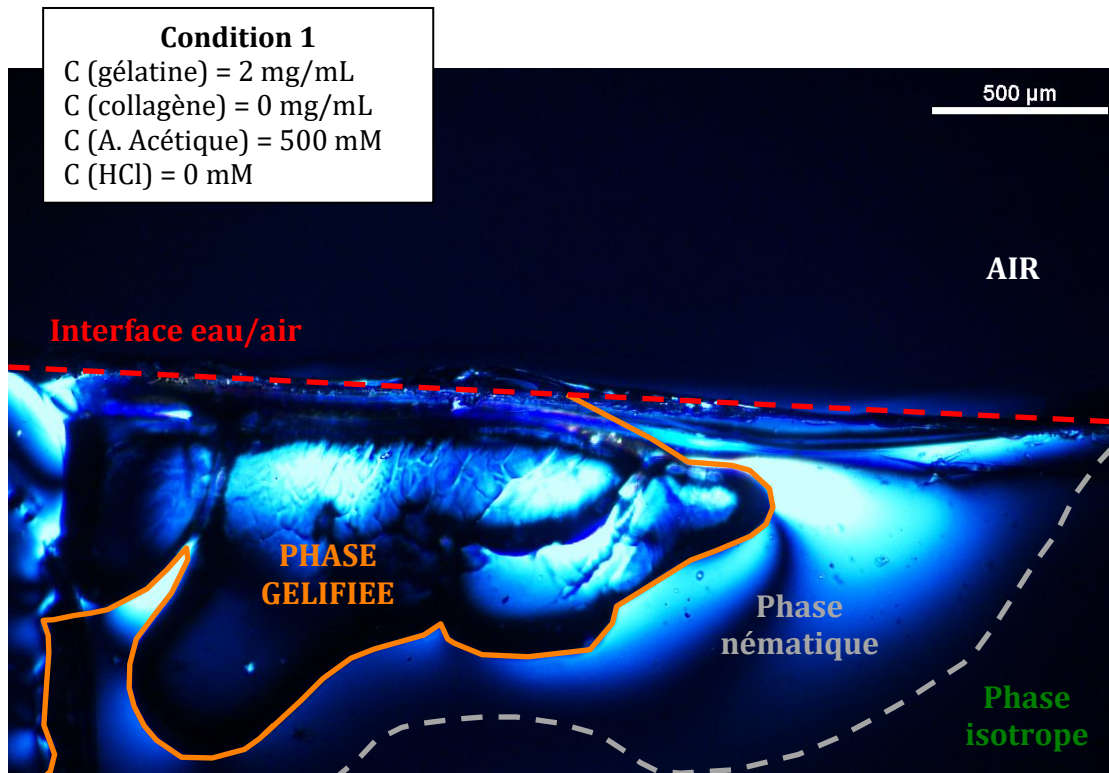
## 2 – Etude des phases denses de gélatine pure de type A.

### a – Observations des microcellules en microscopie à lumière polarisée (MOP).

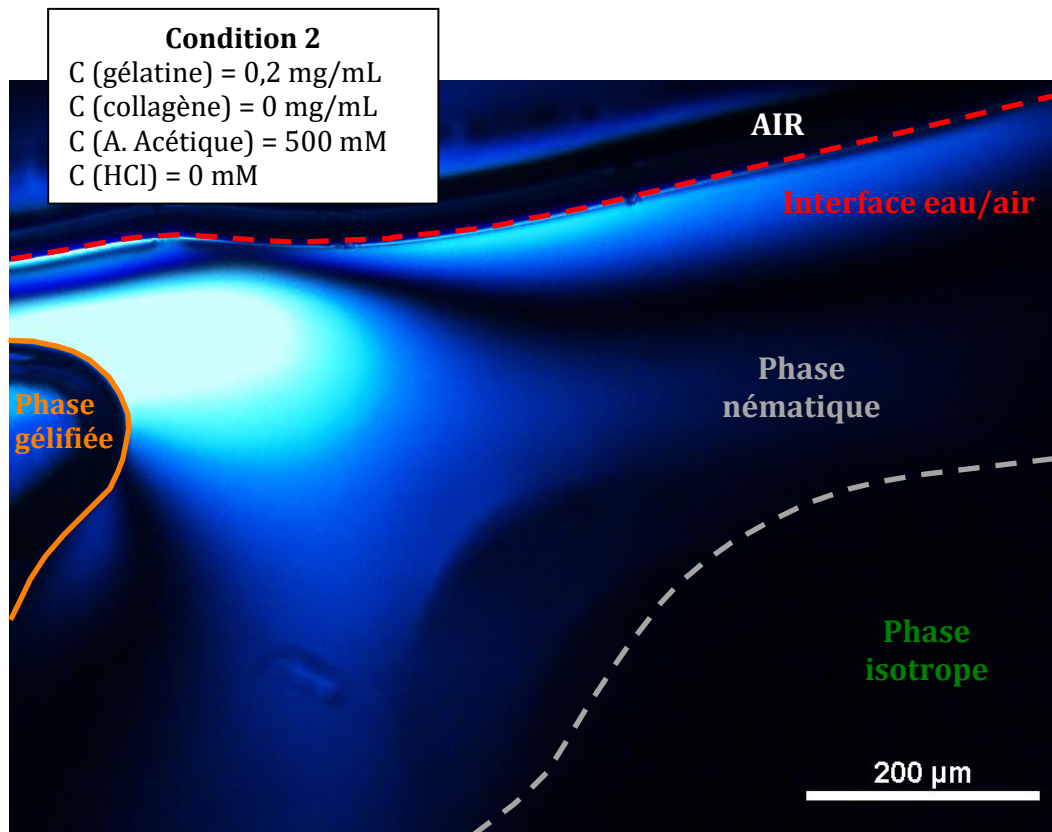
Condition	[gélatine] <sub>initiale</sub> (mg/mL)	[CH <sub>3</sub> COOH] <sub>initiale</sub> (mM)	[HCl] <sub>initiale</sub> (mM)	pH <sub>initiale</sub>
Condition 1	2	500	0	2,5
Condition 2	0,2	500	0	2,5
Condition 3	0,2	5	0	3,5
Condition 4	0,2	0	3	2,5
Condition 5	0,2	0	0,3	3,5
Condition 6	0,2	2,5	0,15	3,5

**Tableau 1 :** Liste des solutions de gélatine pure observées en microcellules.

Le protocole suivi pour préparer les solutions de gélatine de type A est indiqué en annexe. La liste des conditions étudiées en gélatine pure est indiquée dans le tableau 1. Nous avons débuté notre étude par une solution de gélatine à 2 mg/mL dans l'acide acétique 500 mM. Cette condition est connue pour donner une phase cholestérique dans le cas du collagène [37, 38] et c'est la condition qui a été la plus étudiée au laboratoire.



*Figure 23 : Microcellule observée au MOP entre polariseurs croisés. La solution injectée est une solution de gélatine à 2 mg/mL dans 500 mM d'acide acétique. A l'interface eau/air, on distingue une phase gélifiée (orange) et une phase nématique (grise).*



*Figure 24 : Microcellule observée au MOP entre polariseurs croisés. La solution injectée est une solution de gélatine à 0,2 mg/mL dans 500 mM d'acide acétique. A l'interface eau/air, on distingue une phase gélifiée (orange) et une phase nématique (grise).*

Après quatre jours d'injection, on observe deux phases à l'interface eau/air (voir figure 23) :

- Une phase liquide et présentant une biréfringence homogène. En faisant varier l'angle entre les polariseurs, la biréfringence disparaît totalement. Nous avons donc identifié cette phase comme étant une phase cristalline liquide nématique.
- Une phase gélifiée qui se rétracte en séchant.

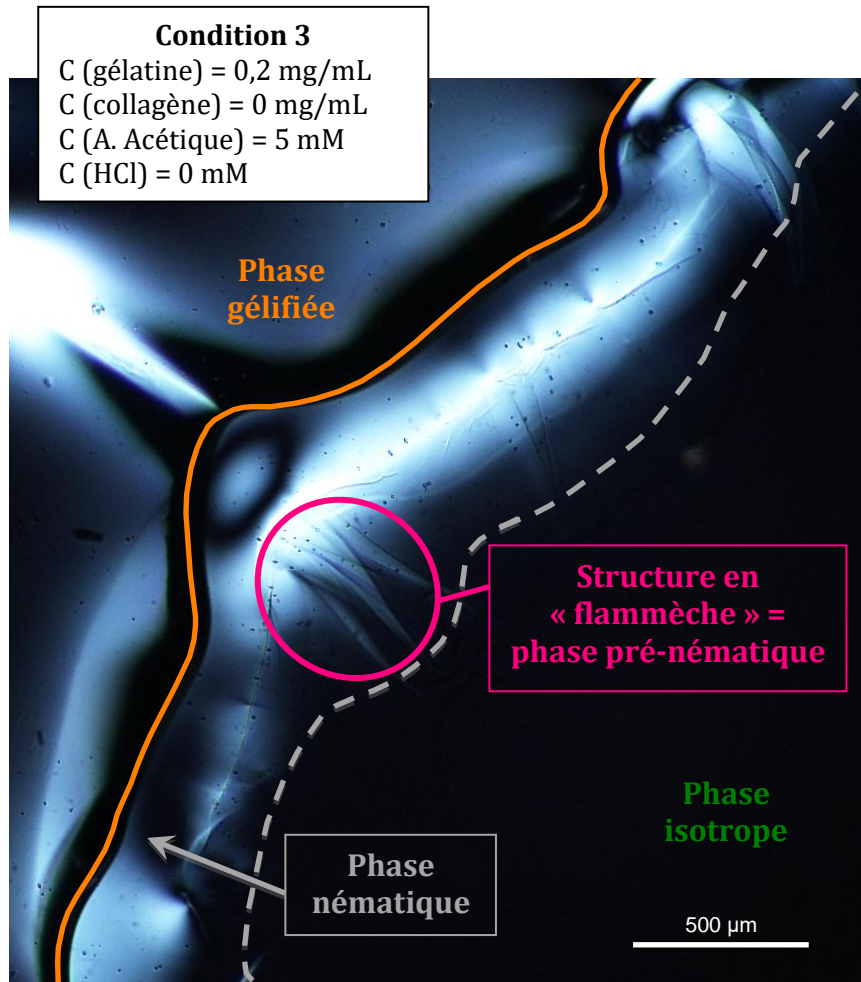
La formation du gel de gélatine correspond à l'établissement d'un réseau macromoléculaire « infini » réticulé par des portions de triples hélices. La renaturation des chaînes de gélatine en triple hélice est un phénomène qui dépend de la concentration en gélatine (voir chapitre précédent) : plus une solution de gélatine est concentrée et plus la probabilité de former une triple hélice est élevée. Nous avons donc, dans un second temps, diminué la concentration initiale en gélatine afin de réduire la quantité de chaînes de gélatine associée par des triples hélices. De plus, nous avons observé auparavant, dans le cas du collagène, qu'une concentration initiale très faible en protéine ( $C = 0,2 \text{ mg/mL}$ ) permet d'obtenir des domaines cristal liquides plus grands et mieux définis.

La concentration initiale en gélatine étant plus faible ( $C (\text{gélatine}) = 0,2 \text{ mg/mL}$ ), la condition 2 a été observée après deux semaines d'injection (voir figure 24). Cette dernière comprend également une zone gélifiée mais bien plus réduite que pour la condition 1. Comme pour la condition 1, on observe une phase nématique présentant une biréfringence homogène sur plus de  $200 \mu\text{m}$  de profondeur.

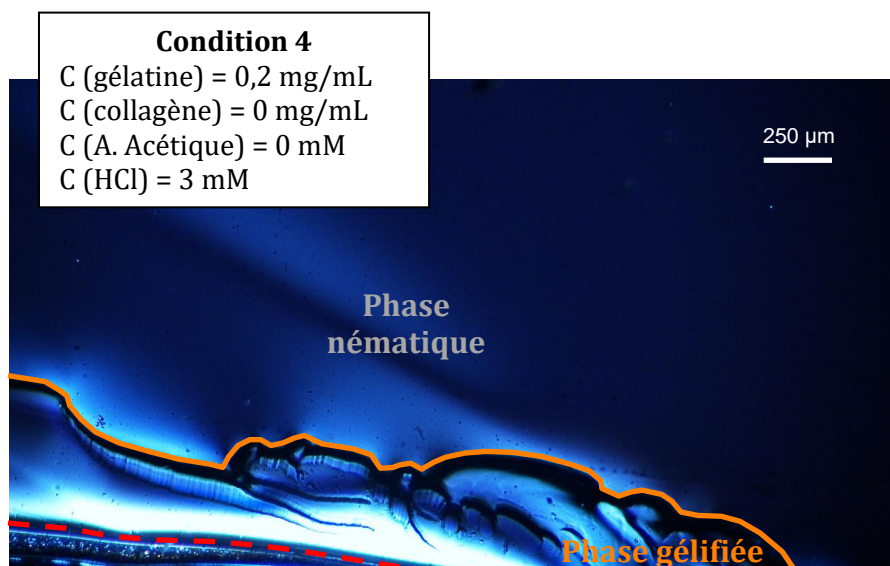
La structure de la mésophase de gélatine ne semble pas dépendre du pH ni du type d'acide. En effet, pour les conditions 3 à 6 on observe également la formation d'une phase nématique ainsi que la présence d'une zone gélifiée (voir figures 25 à 28). Dans le cas de la condition 3, nous avons également observé des protrusions biréfringentes ou zones « en flammèche » (voir figure 26). Ces zones correspondent à des domaines pré-nématiques.

Au sein de la phase nématique de la condition 5, on distingue une striation périodique à plusieurs échelles (voir figure 27). Cette striation ne ressemble toutefois pas aux motifs caractéristiques d'une phase cholestérique ou contre-plaqué (voir contre-plaqué sur la figure 33).

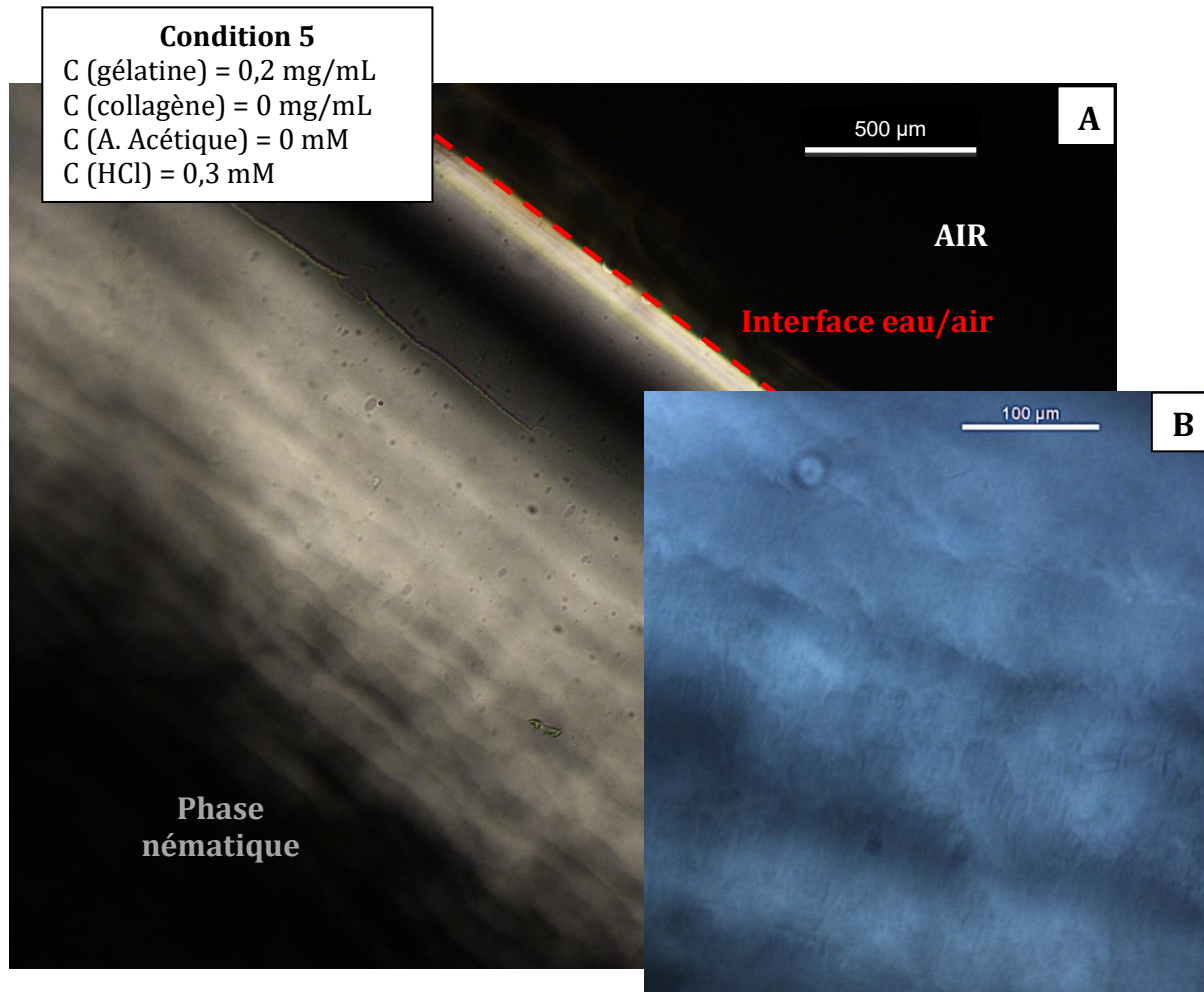




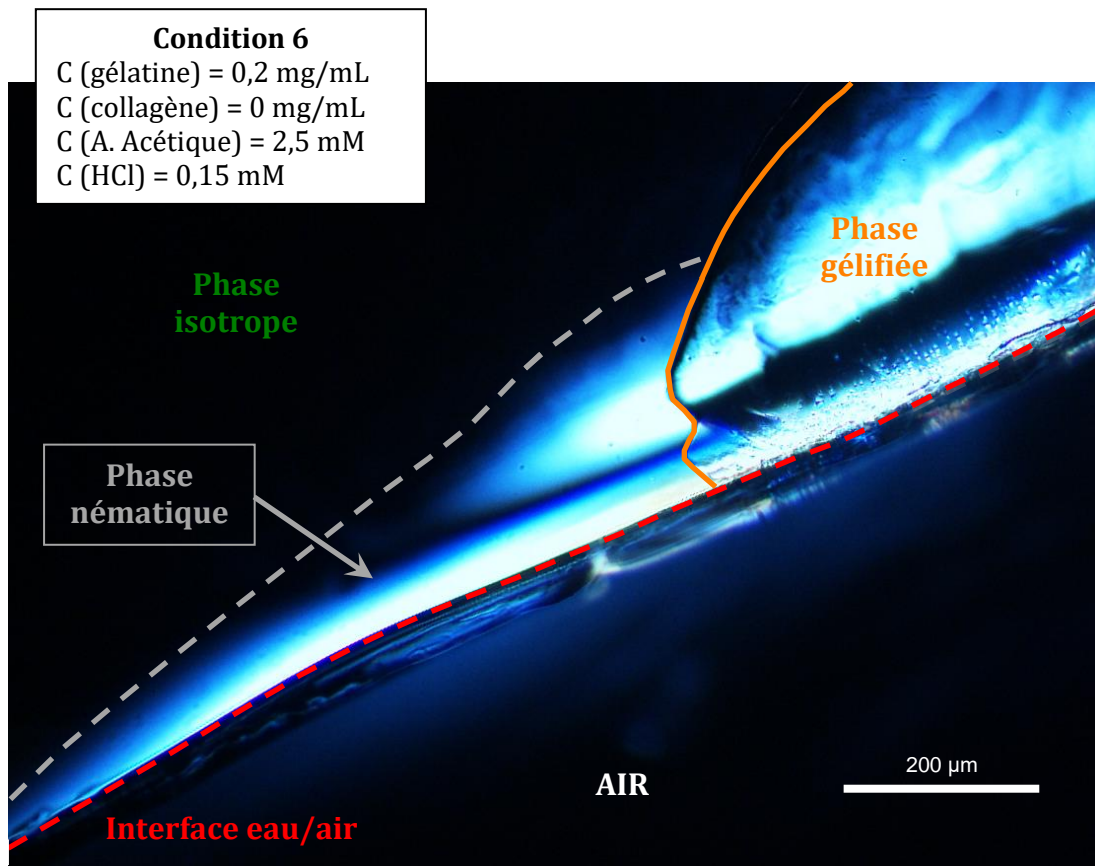
*Figure 25 : Microcellule observée au MOP entre polariseurs croisés. La solution injectée est une solution de gélatine à 0,2 mg/mL dans 5 mM d'acide acétique. On distingue une phase gélifiée (orange) et une phase nématique (grise) comportant des zones en « flammèche » (rose) identifiées comme des phases pré-nématiques.*



*Figure 26 : Microcellule observée au MOP entre polariseurs croisés. La solution injectée est une solution de gélatine à 0,2 mg/mL dans 3 mM d'acide chlorhydrique. A l'interface eau/air, on distingue une phase gélifiée (orange) et une phase nématique (grise).*



*Figure 27 : Microcellule observée au MOP entre polariseurs croisés. La solution injectée est une solution de gélatine à 0,2 mg/mL dans 0,3 mM d'acide chlorhydrique. En A, on distingue, près de l'interface eau/air, une phase nématique présentant une striation périodique à plusieurs échelles (A et B). En B, observation de la phase nématique à un plus fort grossissement.*

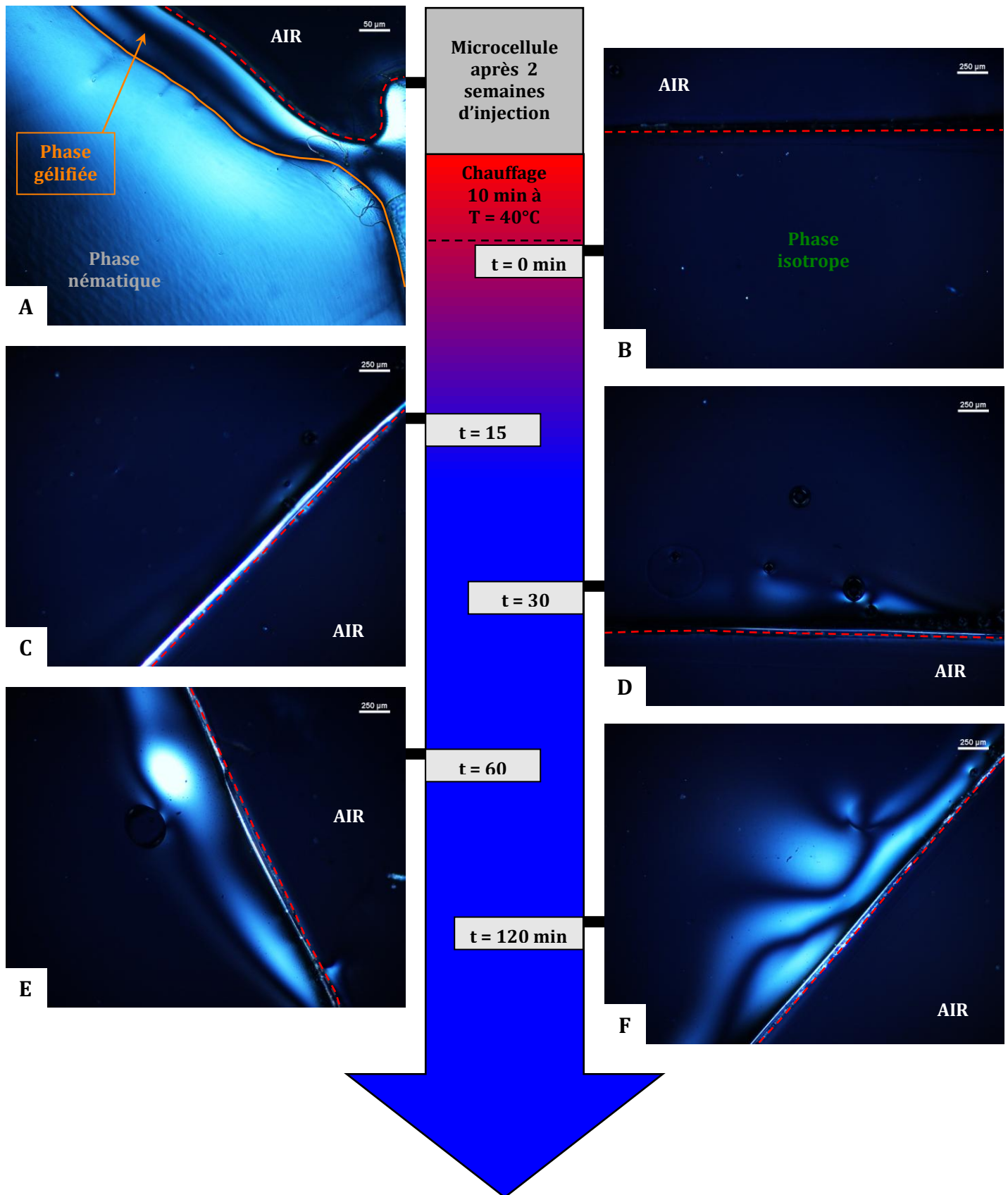


*Figure 28 : Microcellule observée au MOP entre polariseurs croisés. La solution injectée est une solution de gélatine à 0,2 mg/mL dans 0,15 mM d'acide chlorhydrique et 2,5 mM d'acide acétique. A l'interface eau/air, on distingue une phase gélifiée (orange) et une phase nématique (grise).*

b – Etude des mésophases de gélatine à  $T > T_{\text{dénaturation}}$ .

Afin d'obtenir des informations sur la nature du mésogène, nous avons étudié le comportement des mésophases de gélatine lorsqu'elles sont chauffées au dessus de la température de dénaturation de la triple hélice. Le protocole de notre expérience est le suivant : après deux semaines d'injection continue (condition 5), nous avons vérifié la présence d'une mésophase au sein de la microcellule à l'aide du MOP. Nous avons ensuite placé la microcellule sur une platine chauffante ( $T = 40^{\circ}\text{C}$ ) pendant 10 minutes. La microcellule a alors été replacé dans une pièce à  $20^{\circ}\text{C}$  et observée régulièrement au MOP pendant 2 heures (voir figure 29).

Juste après le traitement thermique, la solution de gélatine ne présente plus de biréfringence. Les zones gélifiées ont quant à elles été resolubilisées. A partir de  $t = 15$  min, à l'interface eau/air, on observe la réapparition progressive de la biréfringence. La zone biréfringente s'étend petit à petit au cours du temps et présente la structure nématique observée avant le traitement thermique.



**Figure 29 :** Etude de mésophase de gélatine après dénaturation thermique des segments de triples hélices. La microcellule est observée au MOP entre polariseurs croisés. La solution injectée est une solution de gélatine à 0,2 mg/mL dans 0,3 mM d'acide chlorhydrique. La microcellule est observée après deux semaines d'injection continue (A) avant d'être dénaturée thermiquement sur une plaque chauffante (10 minutes à 40°C). Suite au traitement thermique, la solution concentrée de gélatine ne présente plus de biréfringence (B). Le retour de la biréfringence est ensuite suivi pendant deux heures (C, D, E, F). Après deux heures, la mésophase présente une structure nématique similaire à celle observée avant la dénaturation. Sur chaque photo, l'interface eau/air est symbolisée par une ligne en pointillé rouge.

### c – Discussion.

La gélatine, en solution acide, forme des mésophases nématiques lorsqu'elle est concentrée dans une microcellule. A ma connaissance, la gélatine n'a jamais été décrite auparavant comme étant un mésogène lyotrope. Alors que la structure des mésophases de collagène dépend fortement du pH (phase contre-plaqué pour un  $\text{pH} > 3$  ; phase cholestérique pour  $2 < \text{pH} < 3$ ), toutes les mésophases de gélatine étudiées présentent une biréfringence homogène caractéristique d'une phase nématique. De plus, on observe aussi la présence de phase de gélatine gélifiée au niveau des zones de haute concentration (à l'interface eau/air, dans la partie la plus éloignée de la zone d'injection. Voir figure 22). Ces observations ont fait émerger plusieurs questions :

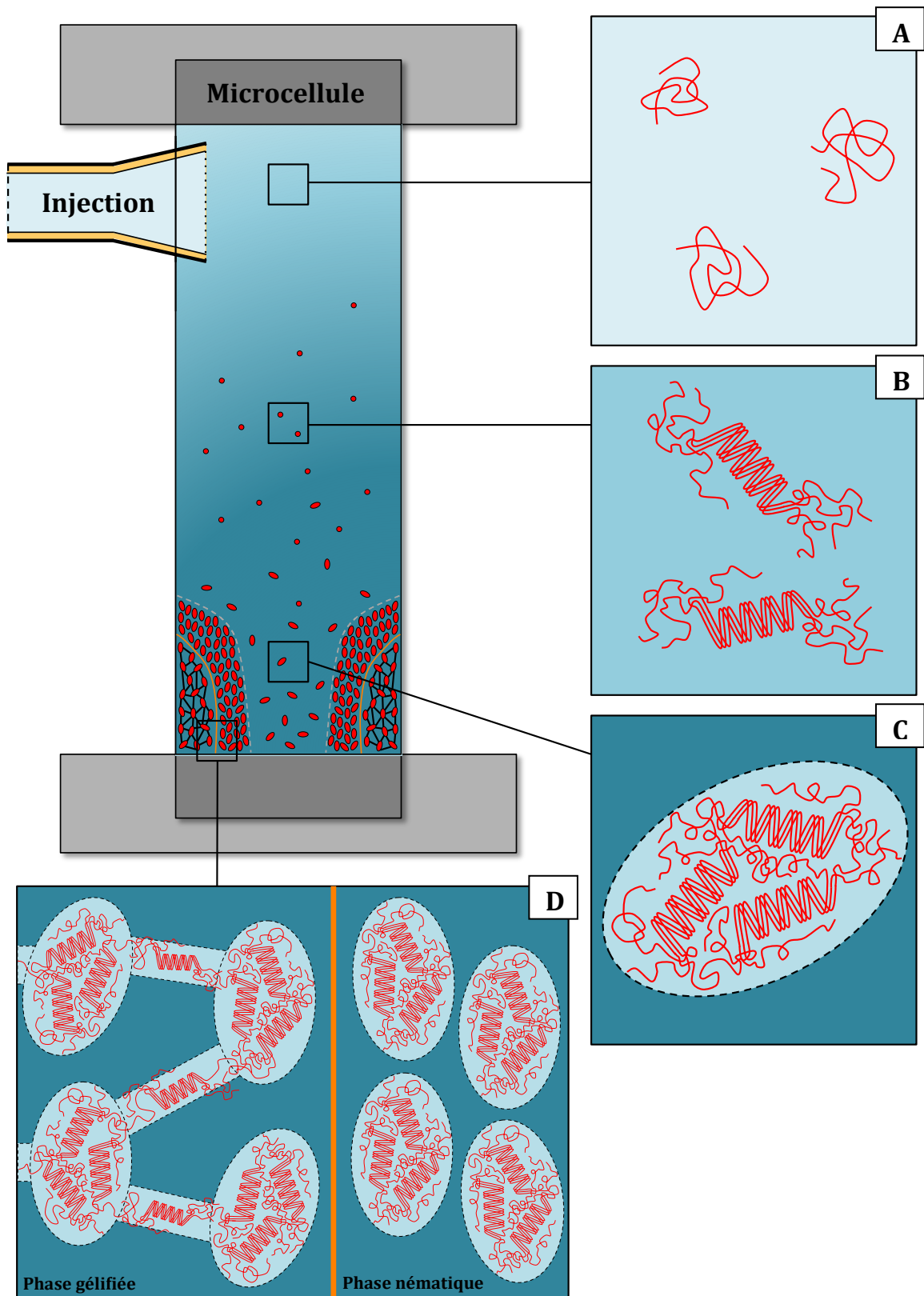
- Pourquoi la gélatine, une molécule chirale, forme-t-elle des mésophases nématiques et non des phases nématiques chirales (cholestérique, contre-plaqué) ?
- Existe-t-il nécessairement une transition de phase mésophase/gel lorsque l'on augmente la concentration en gélatine ? Ou bien la mise en forme de la gélatine et sa gélification sont deux phénomènes indépendants ?

Ces deux questions sont directement liées à la nature du mésogène. Le mésogène le plus simple est la chaîne  $\alpha$  de gélatine, une chaîne assez flexible. Toutefois, quand la concentration en gélatine augmente, Harrington *et al.* ont démontré la formation d'agrégats liés à l'association des chaînes  $\alpha$  sous forme de triple hélice [45]. Nous supposons par conséquent que le mésogène n'est pas une chaîne unique de gélatine mais un segment de triple hélice ou une particule de gélatine.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons étudié le comportement des mésophases de gélatine lorsqu'elles sont chauffées au dessus de la température de dénaturation des triples hélices (voir figure 29). Le traitement thermique provoque tout d'abord une perte de la biréfringence. La formation des mésophases de gélatine est donc liée à l'association des chaînes sous forme de triples hélices. Un retour de la biréfringence est d'ailleurs progressivement observé lorsque la microcellule est refroidie à  $20^\circ\text{C}$  ( $T < T_{\text{dénaturation}}$ ).

La formation de phases nématiques semble indiquer que le mésogène est un objet achiral [48]. Il est donc peu probable que le mésogène soit un segment de triple hélice. Par conséquent, le mésogène est, selon moi, une particule de gélatine de forme anisotrope. La cohésion de ces particules est assurée par la formation de triples hélices intercaténaires. En chauffant une telle mésophase de particules au dessus de la température de dénaturation des triples hélices, on dissous en fait les mésogènes et on induit une transition de phase nématique/isotrope.

L'hypothèse de la particule de gélatine permet également d'expliquer la présence de phases gélifiées à l'interface avec les mésophases. Un gel de gélatine est un réseau infini de chaînes de gélatine réticulé par des segments de triple hélice. La formation préalable de particules et leur concentration dans un volume réduit entraîne une agrégation des particules et augmente fortement la probabilité d'établir un réseau infini (voir figure 30).



**Figure 30 :** Formation des mésophases de gélatine au sein d'une microcellule. Une solution acide et diluée de gélatine (0,2 mg/mL) est injectée dans la microcellule. Au niveau de l'injection, la gélatine n'est pas associée en triple hélice et se présente sous la forme d'une pelote statistique (cadran A). En s'éloignant de l'injection, la concentration en gélatine augmente graduellement, favorisant ainsi la formation de triple hélices (cadran B) puis de particules de gélatine (cadran C) et enfin de mésophase nématique de particules (cadran D). A plus haute concentration, les particules s'associent entre elles pour former un réseau infini : le gel de gélatine.

Cette hypothèse peut aussi expliquer pourquoi la mésophase ne couvre pas des zones plus étendues lorsque l'on augmente la durée d'injection. En effet, en augmentant la concentration en mésogène, ces derniers risquent inévitablement d'être piégé cinétiquement en formant un gel. Par conséquent, on observe une mise en forme des particules de gélatine à l'interface isotrope/nématique tandis que dans les zones les plus concentrées, les particules s'associent en une phase gélifiée. Le volume des mésophases de gélatine est donc limité par la formation du gel (voir figure 30).

#### d - Conclusions et perspectives.

En utilisant des microcellules, nous avons démontré que la gélatine est susceptible de former des mésophases nématiques. La formation de ces mésophases passe au préalable par l'association des chaînes de gélatine sous la forme de triple hélice. Concernant la nature du mésogène, nous supposons qu'il s'agit de particules de gélatine dont la cohésion est assurée par des segments de triples hélices. L'existence de ces particules n'a pu toutefois être démontrée. Nous avons également établi que le domaine d'existence des mésophases est limité par la gélification de la gélatine : en augmentant progressivement la concentration en gélatine, les chaînes s'associent et forment des particules, particules qui s'alignent ensuite en phase nématique avant d'être cinétiquement piéger au sein d'un réseau macromoléculaire. Ce type de comportement rappelle celui des spidroïnes, les protéines de soie d'araignée (voir II-2). Conjugué à une contrainte mécanique, le passage par une mésophase de gélatine pourrait permettre d'organiser des hydrogels de gélatine.

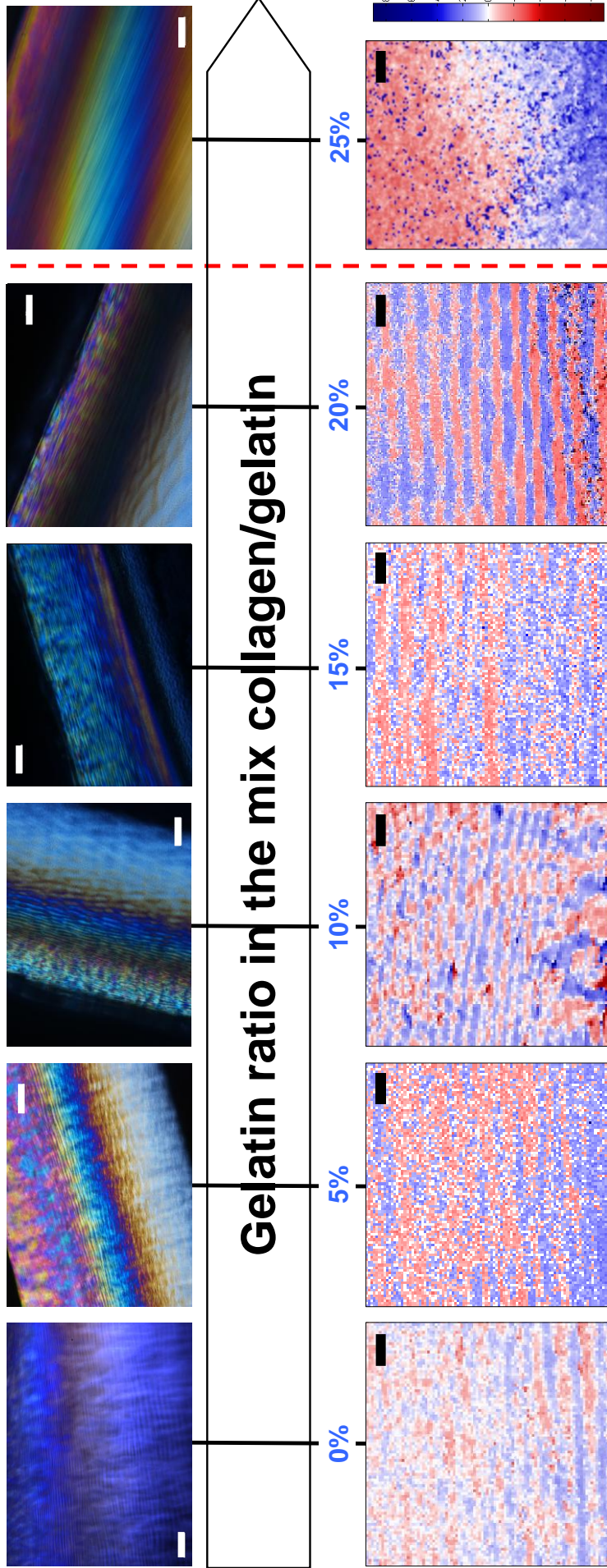
La gélatine ne donnant pas de phase contre-plaqué, je n'ai pas poussé plus loin mes expériences sur les mésophases de gélatine pure. Une étude plus approfondie de ces phases cristallines liquides, notamment de leurs propriétés rhéologiques, est cependant nécessaire. Il serait également important de déterminer les concentrations de mise en forme et de gélification pour chaque condition. Enfin, il serait intéressant d'étudier le comportement de solutions de gélatine B ou de gélatine A de moindre qualité (bloom plus faible) quand on les concentre en microcellule.

### 3 – Etude des phases denses de mélange collagène/gélatine.

#### a – Observations des microcellules au MOP et au P-SHG.

Le protocole suivi pour préparer les solutions collagène/gélatine est indiqué en annexe. Il est similaire au protocole utilisé pour préparer les solutions de gélatine pure. Afin d'étudier l'impact de l'ajout de gélatine sur la structure des mésophases de collagène, nous avons fixé la concentration initiale en protéines ( $C_{\text{protéine}} = 2 \text{ mg/mL}$ ) et fait varier le ratio collagène/gélatine. Nous avons sélectionné une condition physico-chimique (acide acétique 10 mM et acide chlorhydrique 0,3 mM) qui nous permet d'obtenir des gels de collagène transparent comportant une structure en contre-plaqué [46]. La liste des mélanges étudiés est indiquée dans le tableau 2.

Observations by Polarized Light Microscopy (PLM)

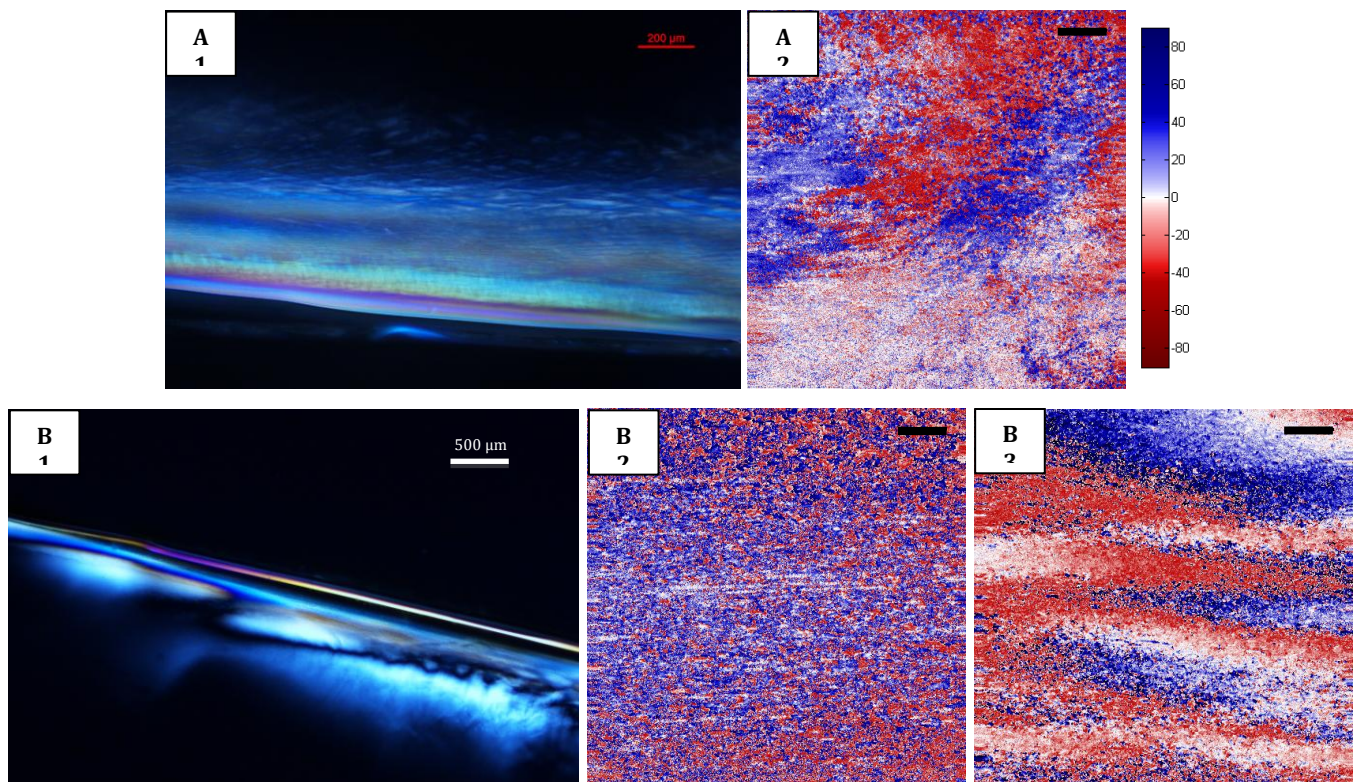


*Figure 31: Effet de l'ajout de gélatine sur une phase cristalline liquide de collagène. Après 4 jours d'injection, des microcellules contenant des phases denses collagène/gélatine à divers ratio (de 0 à 25% en gélatine) ont été observé au MOP entre polariseurs croisés (partie haute) et en P-SHG (partie basse). La striation caractéristique du contre-plaqué est observée en MOP et en P-SHG, à l'interface eau/air, jusqu'à un ratio de 20% en gélatine. Au delà, on observe toujours une phase biréfringente à l'interface eau/air mais les images en P-SHG indiquent une perte de la structure en contre-plaqué. Pour chaque ratio, six microcellules ont été réalisées. Sur les images de MOP, les barres d'échelles, en blanc, correspondent à 50 microns. Sur les images de P-SHG, les barres d'échelles, en noir, correspondent à 5,5 microns.*



Condition	% gélatine	% collagène	[Protéines] <sub>initiale</sub> (mg/mL)	CH <sub>3</sub> COOH/HCl (mM)
<b>g0%</b>	0	100	2	10/0,3
<b>g5%</b>	5	95	2	10/0,3
<b>g15%</b>	15	85	2	10/0,3
<b>g25%</b>	25	75	2	10/0,3
<b>g50%</b>	50	50	2	10/0,3
<b>g75%</b>	75	25	2	10/0,3
<b>g85%</b>	85	15	2	10/0,3
<b>g95%</b>	95	5	2	10/0,3
<b>g100%</b>	100	0	2	10/0,3

*Tableau 2 : Liste des mélanges collagène/gélatine observés en microcellules.*



*Figure 32 : Mélanges g25% (A) et g50% (B) observés au MOP et en P-SHG. A l'interface eau/air, les deux mélanges présentent une forte biréfringence synonyme d'une phase organisée (A1 et B1). Observée en P-SHG, le mélange g25% est constitué de domaines nématiques dont le directeur varie de manière aléatoire d'un domaine à un autre (A2). Pour le mélange g50%, on observe deux types de structures en P-SHG. Une première structure composée de grands domaines nématiques entrelacés (B3). La seconde structure est très localement organisée : elle est constituée d'une multitude de petits domaines nématiques (B2). Sur les images de P-SHG, on observe l'angle des triples hélices dans le plan de l'image. De plus, les barres d'échelle, en noir, correspondent à 10 microns.*

Pour chaque condition, nous avons réalisé au moins six microcellules. Les microcellules ont toutes été observées après 4 jours d'injection.

Pour **tous** les mélanges étudiés, nous avons observé la présence d'une phase dense biréfringente à l'interface eau/air. Cependant, à la différence des solutions de gélatine pure, on ne constate pas la présence de zone gélifiée.

Je me suis tout d'abord intéressé aux mélanges riches en collagène (voir figure 31). Pour les mélanges contenant moins de 25% de gélatine, nous avons observé la striation caractéristique d'un contre-plaqué en MOP. La structure en contre-plaqué a également été identifiée en P-SHG. Ces techniques de microscopie ne nous ont toutefois pas permis de déterminer où se situe la gélatine au sein du mélange.

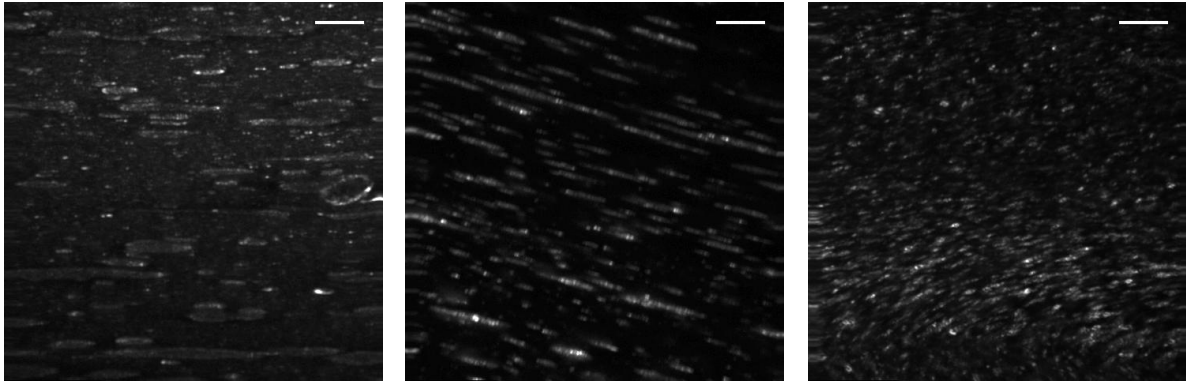
Au delà d'un ratio de 25% en gélatine, on constate une perte de la structure en contre-plaqué. En MOP, les mélanges **g25%** et **g50%** présentent une biréfringence intense et assez homogène semblable à une phase nématique. L'interprétation des images de P-SHG, pour ces mêmes microcellules, n'est toutefois pas aussi évidente (voir figure 32).

Pour le mélange **g25%**, la P-SHG permet de distinguer de grands domaines nématiques dont le directeur varie de manière aléatoire d'un domaine à un autre. Pour le mélange **g50%**, nous avons observé deux types de structures en P-SHG. Une première structure composée de grands domaines nématiques entrelacés. La seconde structure est très localement organisée : elle est constituée d'une multitude de petits domaines nématiques.

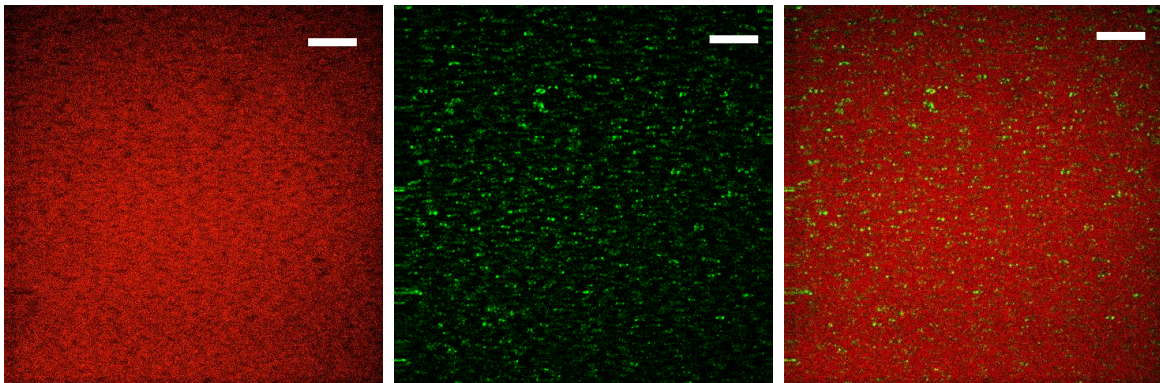
Enfin, pour les mélanges riches en gélatine (> 75%), la structure des phases denses est totalement différente (voir figure 33). En effet, en P-SHG, on observe des globules allongés émettant un fort signal SHG au sein d'une phase peu intense. Cependant, dans le champ de vue, le signal de fluorescence à 2 photons (2-PEF), qui est proportionnel à la concentration en protéine (cf chapitre 2), est homogène. Par conséquent, on observe ici une ségrégation de phase collagène/gélatine :

- Les globules constituent la phase riche en collagène. Au sein d'un globule, les triples hélices sont alignées et forment une phase nématique. L'organisation et la densité élevée en harmonophores sont à l'origine du fort signal SHG.
- La phase riche en gélatine est la phase continue qui entoure les globules. Cette phase est également une phase cristalline liquide comme le démontre la forte biréfringence observée en MOP.

Pour confirmer cette hypothèse de la ségrégation de phase, nous avons marqué la gélatine avec un fluorophore à haut rendement quantique, la fluorescéine. Nous avons choisi la fluorescéine car cette molécule peut-être exciter et visualiser sans avoir à modifier le dispositif de P-SHG du L.O.B. Le protocole suivi pour effectuer le marquage est adapté d'un article [44]. Il est indiqué en annexe. Un mélange collagène/gélatine-fluo (15%/85%) a ensuite été injecté dans une microcellule et observé après 4 jours en SHG et 2-PEF (voir figure 34). En SHG, on observe la structure décrite ci-dessus : des globules émettant un signal SHG intense inclus dans une matrice « noire ». En 2-PEF, le signal de fluorescence n'est plus homogène. Au sein d'un fond fortement fluorescent, on distingue des taches sphériques moins intenses. Ces taches coïncident avec les globules observés en SHG.



*Figure 33: Mélanges g75% (à gauche), g85% (au milieu) et g95% (à droite) observés en P-SHG. Sur les images ci-dessus, on observe l'intensité SHG moyenne (polarisation circulaire). Dans les trois cas, on distingue des globules produisant un intense signal SHG au sein d'une matrice « noire ». Les barres d'échelle, en blanc, correspondent à 10 microns.*



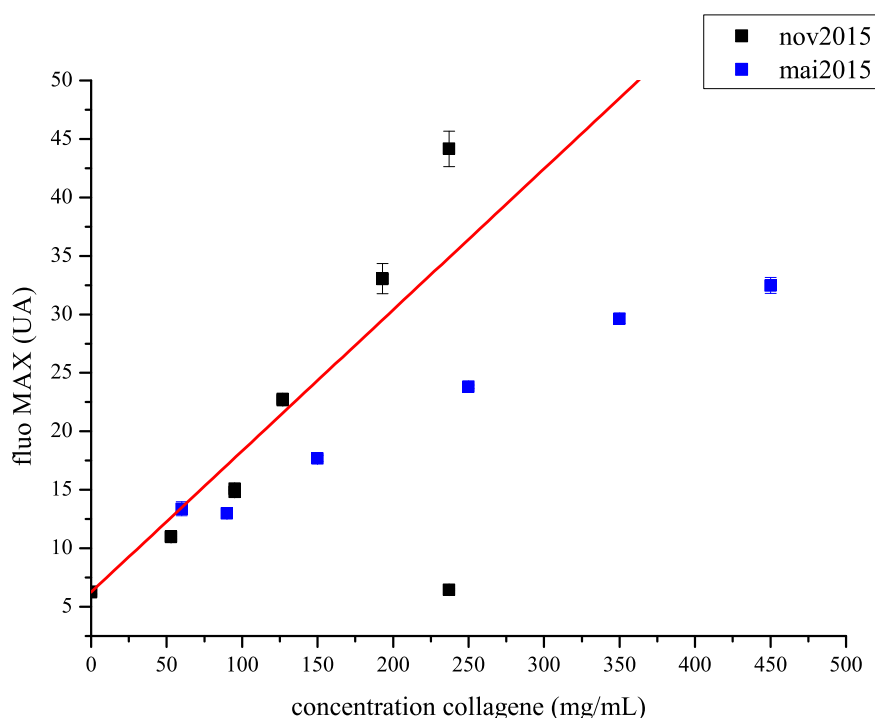
*Figure 34: Utilisation de gélatine marquée pour démontrer la ségrégation de phase collagène/gélatine. La gélatine a été marquée avec de la fluorescéine pour émettre un signal plus intense que le collagène. Un mélange collagène/gélatine fluo (15%/85%) a ensuite été injecté dans une microcellule et observé après 4 jours en P-SHG et 2-PEF. Au milieu, en P-SHG, on observe des globules émettant un signal SHG intense inclus dans une matrice « noire ». A droite, en 2-PEF, le signal de fluorescence n'est plus homogène. On distingue des taches rondes moins intenses au sein d'un fond fortement fluorescent. Ces tâches coïncident avec les globules observés en P-SHG (image de droite). Les barres d'échelle, en blanc, représentent 10 microns.*

b – Détermination de la concentration de mise en forme.

Paulo De Sa Peixoto et Arianne Deniset-Besseau ont précédemment démontré qu'il est possible de déterminer la concentration de mise en forme de mésophases de collagène à partir de son signal 2-PEF [38]. Nous avons à nouveau suivi cette méthode. Au préalable, nous avons établi la courbe d'étalonnage  $I_{2-PEF} = f(C_{\text{collagène}})$  pour la condition acide acétique 10 mM et acide chlorhydrique 0,3 mM (condition contre-plaqué). La courbe a été réalisée en mesurant l'intensité 2-PEF de solutions de collagène de concentration connue. Claire Teulon a démontré que la gélatine possède les mêmes propriétés, en

terme de fluorescence, que le collagène. La courbe d'étalonnage est donc également utilisable pour les mélanges collagène/gélatine.

La courbe obtenue est représentée en figure 35. Pour des concentrations inférieures à 250 mg/mL, l'intensité de fluorescence est une fonction affine de la concentration. Au dessus de 250 mg/mL, elle semble atteindre un plateau. Nous avons montré, pour d'autres conditions physico-chimiques, que la concentration de mise en forme du collagène se situe entre 40 et 100 mg/mL [38]. Le domaine de linéarité de notre courbe d'étalonnage semble donc suffisamment étendu pour pouvoir déterminer la concentration de mise en forme de la condition contre-plaqué.



**Figure 35 :** Courbe d'étalonnage  $I_{2-PEF} = f(C_{Collagène})$  pour la condition contre-plaqué. Deux séries de mesure ont été effectuées avec deux batchs de collagène différents. La courbe en rouge est une régression linéaire effectuée sur l'ensemble des mesures. Pour des concentrations inférieures à 250 mg/mL, l'intensité de fluorescence est une fonction affine de la concentration. Au dessus de 250 mg/mL, la courbe semble atteindre un plateau.

Dans un second temps, nous avons placé, sur les images SHG, la frontière isotrope/mésophase en utilisant les profils SHG : on considère que la frontière est la zone où l'intensité SHG atteint sa valeur minimale. A l'aide de la courbe d'étalonnage, l'intensité 2-PEF à la frontière est ensuite reliée à la concentration en collagène. On obtient ainsi la concentration de transition isotrope/anisotrope du collagène.

Nous avons déterminé la concentration de transition pour 4 microcellules contenant seulement du collagène. Pour certaines microcellules, plusieurs zones ont été observées et la concentration de transition a été moyennée sur l'ensemble. Les résultats sont reportés dans le tableau 3. On remarque tout de suite que cette concentration de transition varie très fortement d'une

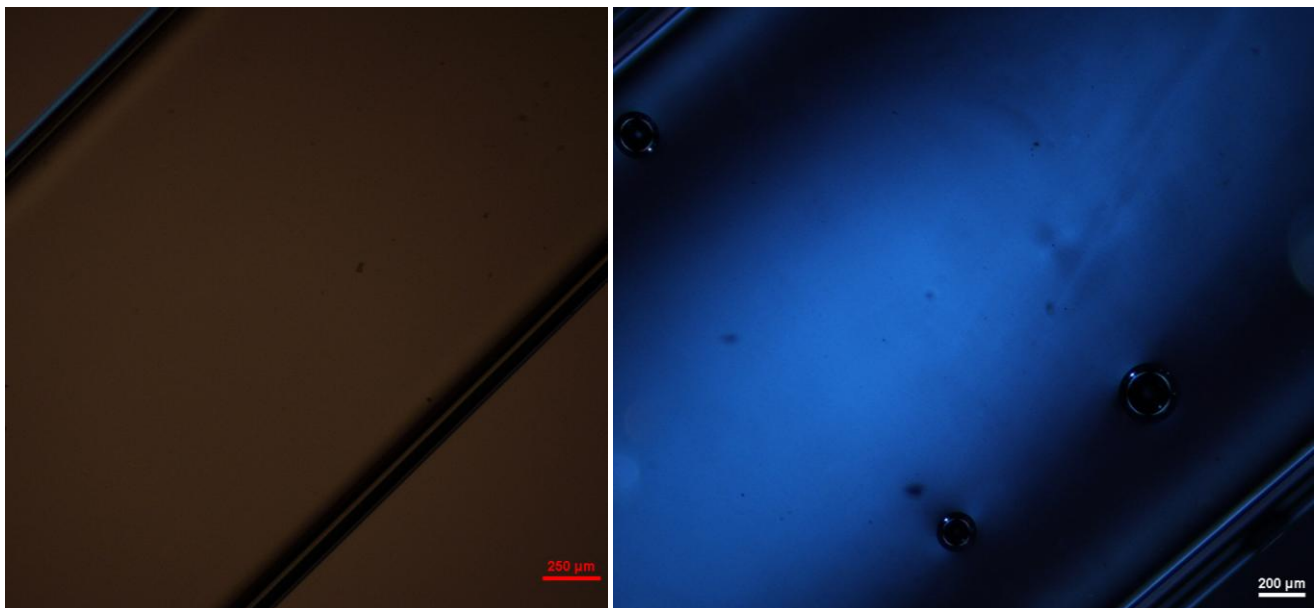
microcellule à une autre. Notre mesure ne semble donc pas se révéler très fiable. Nous sommes actuellement en train de rechercher où se situe le problème avec cette mesure.

Microcellule	Zone	Concentration de transition (mg/mL)	Ecart type
A	B1	15	
	B2	20	
	B3	20	
	B4	25	
	B5	40	
	B6	35	
<b>Moyenne A</b>		<b>25,8</b>	<b>9,7</b>
B	B1	10	
	B2	15	
	B3	25	
	B4	12	
<b>Moyenne B</b>		<b>15,5</b>	<b>6,7</b>
C	C1	80	
	C2	100	
	C3	90	
	C4	100	
<b>Moyenne C</b>		<b>92,5</b>	<b>9,6</b>
D	D1	125	
<b>Moyenne microcellules</b>		<b>64,7</b>	<b>52,7</b>

*Tableau 3 : Détermination de la concentration de transition isotrope/anisotrope pour la solution g0%. Les concentrations sont déterminées à partir de l'intensité de fluorescence à deux photons enregistrée en microscopie multiphoton (voir description de la méthode ci-dessus). Nous avons déterminé la concentration de transition pour 4 microcellules (A, B, C, D) en observant un nombre variable de zones pour chacune.*

J'ai récemment employé une seconde méthode, adaptée de Gobeaux *et al.*, [47] pour déterminer la concentration de mise en forme. Après avoir concentré des solutions de collagène à diverses concentrations, je les ai transféré dans des capillaires plats que j'ai ensuite scellés à la cire. Ces capillaires ont été observés deux jours plus tard au MOP, entre polariseurs croisés, afin de détecter une biréfringence. Nous avons pu ainsi « encadrer » la concentration de transition isotrope/mésophase qui se situe entre 32 et 35 mg/mL (voir figure 36).

Nous devons toutefois reproduire cette expérience avec une nouvelle solution de collagène afin de s'assurer de sa fiabilité. Nous pourrions ensuite essayer de déterminer la concentration de transition pour les mélanges collagène/gélatine.



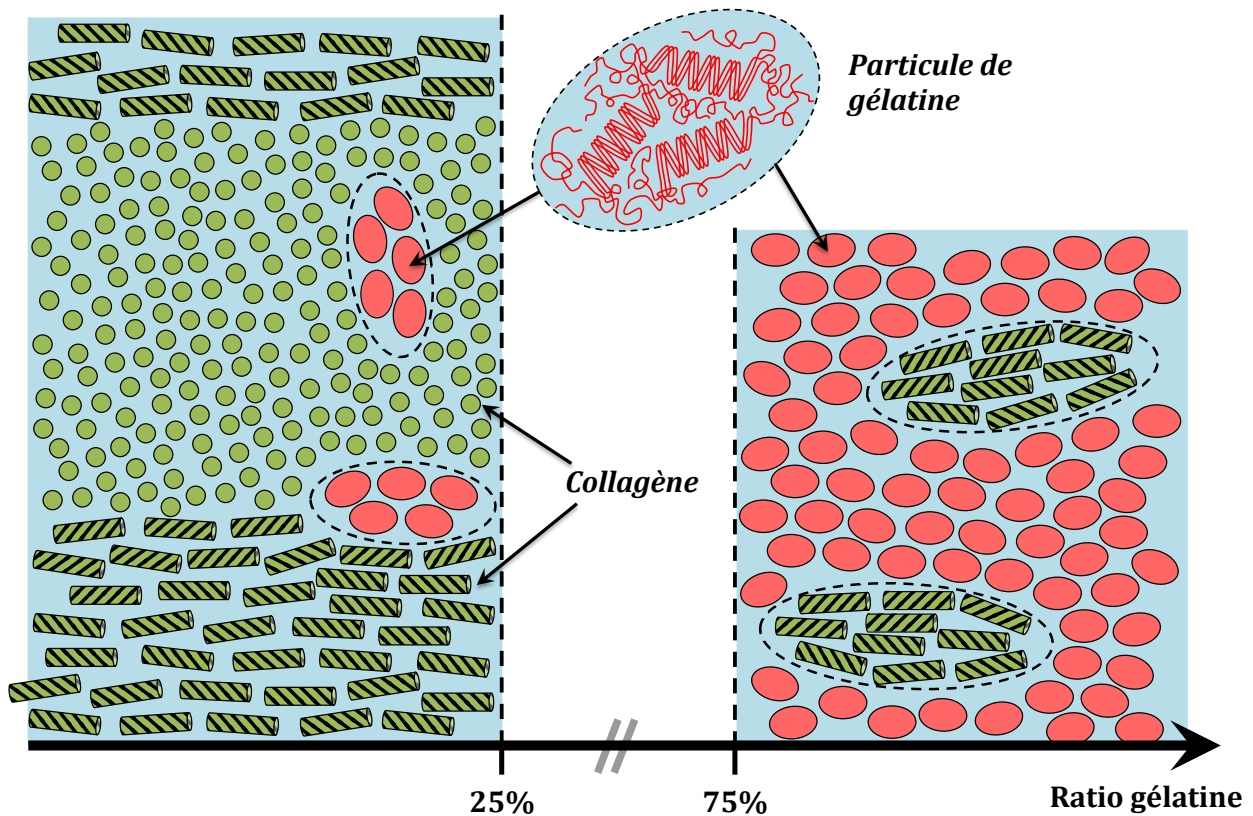
*Figure 36 : Détermination de la concentration de mise en forme. Une solution diluée de collagène, solubilisée dans 10 mM d'acide acétique et 0,3 mM d'acide chlorhydrique, a été concentrée à diverses concentrations. Les solutions concentrées ont ensuite été aspirées dans des capillaires plats afin de détecter la présence d'une biréfringence. A gauche, on observe l'absence de biréfringence pour la solution à 32 mg/mL. A droite, par contre, la solution à 35 mg/mL présente une biréfringence homogène.*

### c – Discussion.

En balayant l'ensemble des ratios collagène/gélatine, nous avons essayé de construire le diagramme de phase des mélanges concentrés collagène/gélatine (voir figure 37). Si nous avons pu clairement identifier les structures observées à chaque extrémité du diagramme, les mélanges compris entre 25% et 75% de gélatine semblent moins bien définis. Toutefois, tous ces mélanges présentent une forte biréfringence en MOP ce qui indique un certain degré d'organisation.

La complexité de ces systèmes provient, selon moi, de la ségrégation de phase inattendue entre le collagène et la gélatine. La gélatine A est la forme dénaturée et partiellement hydrolysée du collagène dont la composition chimique n'a toutefois pas été modifiée par les procédés d'extraction (cf Partie B - chapitre 1). La gélatine est donc chimiquement très proche du collagène et l'on n'observe d'ailleurs pas de ségrégation au sein des mélanges dilués ( $C_{\text{protéines}} = 2$  mg/mL) collagène/gélatine.

L'observation, en P-SHG, des mélanges riches en gélatine (> 75%) semble indiquer que la ségrégation de phase coïncide avec la transition de phase isotrope/nématique du collagène. En effet, on n'observe pas la présence d'une phase intermédiaire entre le mélange biphasique à l'interface eau/air (tactoides de collagène/mésophase continue de gélatine) et la solution isotrope et diluée au centre de la microcellule. La mésophase de gélatine n'émettant pas de signal SHG, nous ne pouvons pas toutefois pas déterminer si la ségrégation de phase coïncide également avec la transition isotrope/anisotrope de la gélatine.



*Figure 37 : Diagramme de phase des mélanges collagène-gélatine. Notre étude des mélanges concentrés collagène/gélatine en microcellule nous a permis de caractériser la structure des mélanges riches en collagène ( $r_{\text{gélatine}} < 25\%$ ) ainsi que des mélanges riches en gélatine ( $r_{\text{gélatine}} > 75\%$ ). L'organisation des mélanges intermédiaire n'est cependant pas encore bien comprise ( $25\% > r_{\text{gélatine}} > 75\%$ ).*

Une nouvelle question émerge alors : pourquoi la transition isotrope/anisotrope du collagène entraînerait une ségrégation de phase ? Il a été démontré, pour des mélanges de mésogènes thermotropes chimiquement similaires, qu'une ségrégation de phase peut s'opérer lors de la formation des mésophases si ces mésophases ont une structure différente. En fait, l'incompatibilité de symétrie entre les deux mésophases entraîne leur ségrégation [48]. Nous avons cependant démontré que les mésophases de collagène et de gélatine possèdent, séparément, la même symétrie. En effet, la gélatine seule forme une mésophase nématique (cf III-2) alors que le collagène s'organise en une phase contre-plaqué, c'est à dire en une phase nématique chirale. Le critère de symétrie ne semble donc pas être à l'origine de la ségrégation de phase.

Une autre hypothèse s'est alors imposée : la ségrégation est l'origine de la formation des tactoïdes de collagène et non l'inverse. Au delà d'une concentration critique, que nous appellerons  $C_{\text{ségrégation}}$ , le collagène et la gélatine se séparent et c'est le confinement du collagène au sein de gouttelettes qui permet alors la formation de mésophases nématiques chirales. Ce mécanisme reste compatible avec les observations faites en P-SHG. Il n'explique cependant pas pourquoi le collagène et la gélatine se séparent.

Pour moi, la réponse se situe au niveau de la gélatine. La gélatine peut former des mésophases mais la transition isotrope/anisotrope de cette macromolécule semble au préalable passer par un changement de conformation et une association en particules mésogènes (cf III-2-c). L'existence de ces particules n'a pas été prouvée mais elle permettrait d'expliquer la séparation entre le collagène et la gélatine. En s'agrégeant en particules, la gélatine peut adopter une conformation différente de la triple hélice de collagène. Le changement de conformation peut entraîner une variation de la chimie de surface des mésogènes puisque les acides aminés présentés à la surface des particules sont potentiellement différents de ceux qui décorent la triple hélice native. Cette modification des résidus exhibés à la surface des particules de gélatine serait alors à l'origine de la ségrégation entre le collagène et la gélatine.

Concernant les mésophases de gélatine, on peut noter un phénomène intéressant : ces dernières n'émettent pas de signal SHG. Le groupement harmonophore du collagène est la liaison peptidique. Toutefois, pour que le collagène génère un signal SHG, plusieurs conditions sont nécessaires (cf Partie A - chapitre 2) :

- Les chaînes  $\alpha$  doivent être associées sous la forme de triples hélices.
- La densité en triples hélices doit être élevée
- L'organisation adoptée par les triples hélices doit être non-centrosymétrique.

Nous avons démontré que la formation des mésophases de gélatine passe par au préalable par la formation de triples hélices. Le mésogène peut donc être un segment de triple hélice ou une particule stabilisée par des triples hélices.

Considérons que le mésogène soit un segment de triple hélice. La mésophase de gélatine est alors constituée de zones denses de triples hélices qui sont alignés dans la même direction. Par conséquent, ces zones remplissent tous les critères pour permettre la génération d'un signal SHG et devraient être observable en P-SHG. Le fait que les mésophases de gélatine ne génèrent pas de signal SHG est donc un argument supplémentaire en faveur de l'existence des particules de gélatine. En poussant le raisonnement plus loin, on peut même émettre quelques hypothèses sur la structure de ces particules. En effet, l'absence de signal SHG peut alors avoir deux origines :

- La densité de triples hélices au sein des particules est faible et les harmonophores ne peuvent donc pas diffuser un signal cohérent/et le signal SHG diffusé ne peut pas être efficacement amplifié.
- L'orientation des segments de triples hélices, au sein des particules, est totalement aléatoire et la particule est par conséquent un objet centrosymétrique. Cette hypothèse expliquerait également pourquoi la particule n'est pas un objet chiral.

#### d – Conclusions et perspectives.

Nous avons démontré qu'il est possible d'ajouter de la gélatine dans une phase dense de collagène sans toutefois en modifier la structure. En effet, pour



un ratio de gélatine inférieur à 25%, les mélanges concentrés présentent une structure en contre-plaqué similaire à une phase dense de collagène pure. Cette structure en contre-plaqué a été identifiée à la fois par MOP et par P-SHG. A l'échelle de la microscopie optique, nous n'avons pas observé de ségrégation de phase collagène/gélatine. J'ai ainsi répondu à l'une des problématiques de notre projet initial.

L'ajout de gélatine nous a également permis d'accéder à des organisations originales. Pour les mélanges contenant une proportion élevée de gélatine ( $r_{\text{gélatine}} > 75\%$ ), nous obtenons des mélanges biphasiques composées de tactoïdes nématiques riches en collagène au sein d'une mésophase riche en gélatine. La ségrégation de phase a été confirmée en marquant la gélatine avec un fluorophore et en observant sa relative absence dans les tactoïdes. L'origine de la ségrégation de phase n'a pas pu être déterminée de manière certaine mais nous supposons qu'elle est liée à la formation des particules de gélatine qui présentent une surface chimiquement différente de la triple hélice native.

Cette première étude de mélanges concentrés collagène/gélatine laisse entrevoir de nombreuses perspectives :

- Une étude approfondie de la structure de ces mélanges à l'aide de la diffraction aux rayons X et en particulier des mélanges intermédiaires ( $25\% < r_{\text{gélatine}} < 75\%$ ) qui semblent être constitués de deux phases continues. La diffraction aux rayons X pourrait également mettre en évidence l'existence de particules de gélatine.
- La détermination des concentrations de transition isotrope/anisotrope et des concentrations de ségrégation pour chaque mélange.
- L'établissement d'un diagramme ternaire collagène/gélatine/solvant.
- L'étude de mélanges collagène/gélatine dans le cas d'une condition physico-chimique différente (condition cholestérique).
- L'étude de mélange collagène/gélatine B
- etc.

Pour ma part, j'ai décidé de stabiliser ces mélanges concentrés par fibrillogenèse afin d'obtenir des nouveaux biomatériaux organisés.

## Bibliographie :

- [1] – The pitch drop experiment. In : *The university of Queensland, Australia* (en ligne). Consulté le 30/05/2016. Disponible à l'adresse : <http://www.thetenthwatch.com/feed/#>
- [2] – The pitch drop experiment. In : *Atlas Obscura* (en ligne). Consulté le 31/08/2016. Disponible à l'adresse : <http://www.atlasobscura.com/places/pitch-drop-experiment>
- [3] – Liquid crystals. In : *BeautifulChemistry.net* (en ligne). Consulté le 29/04/2016. Disponible à l'adresse : <http://www.beautifulchemistry.net/structure/#/liquid-crystals/>
- [4] – MITOV M. Cholesteric liquid crystals with a broad light reflection band. *Advanced Materials*, 2012, vol 424, p 6260-6276.

- [5] – TEULON C. *Imagerie quantitative du collagène par microscopie par génération de seconde harmonique résolue en polarisation*. Thèse de doctorat : Biophysique. Ecole Polytechnique : 2016.
- [6] – LEHMANN M., SELTMANN J. Low temperature enantiotropic nematic phases from V-shaped, shape-persistent molecules. *Beilstein Journal of organic chemistry*, 2009, vol 5, n° 73. DOI : 10.3762/bjoc.5.73
- [7] – Introduction to liquid crystal. In : *Barret Group – MacGill* (en ligne). Consulté le 15/06/2016. Disponible à l'adresse : [http://barrett-group.mcgill.ca/tutorials/liquid\\_crystal/LC03.htm](http://barrett-group.mcgill.ca/tutorials/liquid_crystal/LC03.htm)
- [8] – BAEZ J. The butterfly, the gyroid and the neutrino (en ligne). Consulté le 24/06/2016. Disponible à l'adresse : <http://math.ucr.edu/home/baez/butterfly.html>
- [9] – HAMLEY I.W. Liquid crystal phase formation by biopolymers. *Soft Matter*, 2010, vol 6, p 1863-1871. DOI : 10.1039/b923942a
- [10] – CAU P., SEITE R. La membrane plasmique. In : CAU P. SEITE R. (dir.). *Cours de biologie cellulaire (4 édition)*. Paris : Ellipses, 2007, chapitre 4, p. 104-166. ISBN : 978-2-7298-3080-9.
- [11] – MYERS A. M., MORELL M.K., JAMES M.G., BALL S.G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Starch*, 2010, vol 62, p 389-420. DOI : 10.1002/star.201000013.
- [12] – PEREZ S., BERTOFT E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules : a comprehensive review. *Starch*, 2010, vol 62, p 389-420. DOI : 10.1002/star.201000013.
- [13] – WAIGH T.A., PERRY P., RIEKEL C., GIDLEY M.J., DONALD A.M. Chiral side-chain liquid-crystalline polymeric properties of starch. *Plant physiology*, 2000, vol 122, p 989-997. DOI : 10.1104/pp.122.4.989.
- [14] – VERDUGO P. Mucin exocytosis. *American review of respiratory diseases*, 1991, vol 144, Supplement Airway Mucin, p S33-S37. DOI : 10.1164/ajrccm/144.3\_pt\_2.S33.
- [15] – VINEY C., HUBER A.E., VERDUGO P. Liquid crystalline order in mucus. *Macromolecules*, 1993, vol 26, p 852-855. DOI : 10.1021/ma00056a044
- [16] – DENNY M.W., GOSLINE M. The physical properties of the pedal mucus of the terrestrial slug, *Ariolimax Columbianus*. *The journal of experimental biology*, 1980, vol 88, p 375-393.
- [17] – Mikrocopia.com (en ligne). Consulté le 30/06/2016. Disponible à l'adresse : <http://forum.mikrocopia.com/topic/6803-amidon-pomme-de-terre/?hl=%2Bamidon+%2Bpomme+%2Bde+%2Bterre>
- [18] – LIVOLANT F. Ordered phases of DNA in vivo and in vitro. *Physica A*, 1991, vol 176, p 117-137.
- [19] – WARD W.S., COFFEY D.S. DNA packing and organisation in mammalian spermatozoa : comparaison with somatic cells. *Biology of reproduction*, 1991, vol 44, p 569-574.
- [20] – VERMEY B.G., CHAPMAN M.G., COOKE S., KILANI S. The relationship between sperm head retardance using polarized light microscopy and clinical outcomes. *Reproductive biomedecine online*, 2015, vol 30, p 67-73.

- [21] – GIANAROLI L., MAGLI M.C., FERRARETTI A.P., CRIPPA A., LAPPI M., CAPITANI S., BACCETTI B. Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 2010, vol 93, n°93, p 807-813.
- [22] – FELSENFELD G., GROUDINE M. Controlling the double helix. *Nature*, 2003, vol 421, p 448-453.
- [23] – WOJCIESZAK M. *La soie, « modèle » de polymères naturels fibreux : analyse vibrationnelle et nano/micromécanique, de la fibre au composite*. Thèse de doctorat : Chimie. Paris : UPMC, 2014.
- [24] – KNIGHT D.P., VOLLRATH F. Biological liquid crystal elastomers. *Philosophical transactions of the royal society B*, 2002, vol 357, p 155-163.
- [25] – WALKER A.A., HOLLAND C., SUTHERLAND T.D. More than one way to spin a crystallite : multiple trajectories through liquid crystallinity to solid silk. *Proceedings of the royal society B*, 2015, vol 282. DOI : 10.1098/rspb.2015.0259
- [26] – VOLLRATH F., KNIGHT D. P. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature*, 2001, vol 410. DOI : 10.1038/35069000.
- [27] – HOLLAND C., VOLLRATH F., RYAN A.J., MYKHAYYK O.O. Silk and synthetic polymers reconciling 100 degrees of separation. *Advanced Materials*, 2012, vol 24, p 105-109. DOI : 10.1002/adma.201103664.
- [28] – ANDERSSON M., HOLM L., RIDDERSTRALE Y., JOHANSSON J., RISING A. Morphology and composition of the spider major ampullate gland. *Biomacromolecules*, 2013, vol 14, p 2945-2952. DOI : 10.1021/bm400898t.
- [29] – JIN H.J., KAPLAN D.L. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature*, 2003, vol 424, p 1057-1061. DOI : 10.1038/nature01809.
- [30] – DEVILLE S. The making of a paper – A praise for slow Science (en ligne). Mise en ligne en mars 2014. Consulté le 15/05/2016. Disponible à l'adresse : <https://sylvaindeville.net/2014/03/>.
- [31] – CARTWRIGHT J.H.E., CHECA A.G., ESCRIBANO B., SAINZ-DIAZ I. Spiral and target patterns in bivalve nacre manifest a natural excitable medium from layer growth of a biological liquid crystal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, vol 106, n° 26, p 10499-10504. DOI : 10.1073 pnas.0900867106.
- [32] – CARTWRIGHT J.H.E., CHECA A.G. The dynamics of nacre self-assembly. *Journal of the royal society interface*, 2007, vol 4, p 491-504. DOI : 10.1098/rsif.2006.0188.
- [33] – BOULIGAND Y. Liquid crystals and biological morphogenesis : Ancient and new questions. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences - Chimie*, 2007, p 1-16. DOI : 10.1016/j.crci.2007.10.001.
- [34] – CHUNG W.J., OH J.W., KWAK K., LEE B.Y., MEYER J., WANG E., HEXEMER A., LEE S.W. Biomimetic self-templating supramolecular structures. *Nature*, 2011, vol 478, p 364-368. DOI : 10.1038/nature.10513.
- [35] – GILBERT R.D., PATTON P.A. Liquid crystal formation in cellulose and cellulose derivatives. *Progress in polymer science*, 1983, vol 9, p 115-131.

- [36] – BELAMIE E., DAVIDSON P., GIRAUD-GUILLE M.M. Structure and chirality of the nematic phase in  $\alpha$ -chitin suspensions. *The journal of physical chemistry B*, 2004, vol 108, issue 39, p 14991-15000. DOI : 10.1021/jp048152u.
- [37] – GIRAUD-GUILLE M.M., MOSSER G., BELAMIE E. Liquid cristallinity in collagen systems in vitro and in vivo. *Current opinion in colloid and interface science*, 2008, vol 13, p 303-313. DOI : 10.1016/j.cocis.2008.03.002.
- [38] – DE SA PEIXOTO P., DENISET-BESSEAU A., SCHMUTZ M., ANGLO A., ILLOUL C., SCHANNE-KLEIN M.-C., MOSSER G. Achievement of cornea-like organizations in dense collagen I solutions: clues to the physico-chemistry of cornea morphogenesis. *Soft Matter*, 2013, vol 9, p 11241-11248. DOI : 10.1039/C3SM52097H.
- [39] – MOSSER G., ANGLO A., HELARY C., BOULIGAND Y., GIRAUD-GUILLE M.-M. Dense tissue-like collagen matrices formed in cell-free conditions. *Matrix Biology*, 2006, vol 25, p 3-13. DOI : 10.1016/j.matbio.2005.09.002.
- [40] – NASSIF N., GOBEAUX F., SETO J., BELAMIE E., DAVIDSON P., PANINE P., MOSSER G., FRATZL P., GIRAUD-GUILLE M.-M. Self-assembled collagen-apatite matrix with bone-like hierarchy. *Chemistry of materials*, 2010, vol 22, p 3307-3309. DOI : 10.1021/cm903594n.
- [41] – NASSIF N. Nouveaux composites hybrides à bases de collagène : une passerelle vers « l'os artificiel » (vidéo). In : *Collège de France* (en ligne). Mise en ligne : 11/2013. Consulté le 20/01/2014. Disponible à l'adresse : <http://www.college-de-france.fr/site/clement-sanchez/seminar-2013-11-20-17h00.htm>
- [42] – UPMC, CNRS, EPHE. *Bone substitute et method for the preparation thereof*. Inventeurs : Nadine NASSIF, Frederic GOBEAUX, Marie-Madeleine GIRAUD-GUILLE, Gervaise MOSSER. USA, brevet : US8859008 (B2). 2014-10-14. Disponible à l'adresse : <http://www.google.com.ar/patents/US8859008>
- [43] – TIDU A., GHOUBAY-BENALLAOUA D., LYNCH B., HAYE B., ILLOUL C., ALLAIN J.-M., BORDERIE V.M., MOSSER G. Development of human corneal epithelium on organized fibrillated transparent collagen matrices synthesized at high concentration. *Acta Biomaterialia*, 2015, vol 22, p 50-58. DOI : 10.1016/j.actbio.2015.04.018.
- [44] – .
- [45] – HARRINGTON W.F., VENKATESWARA RAO N. Collagen structure in solution. I. Kinetics of helix regeneration in single-chain gelatins. *Biochemistry*, 1970, vol 9, n°19 p. 3714-3724.
- [46] – TIDU A. *Synthèse d'une cornée artificielle à base de collagène I. De la conception des matrices à l'intégration des cellules*. Thèse de doctorat : Physique et chimie des matériaux. Paris : UPMC, 2016.
- [47] – GOBEAUX F. *Phases denses de collagène de type I : transition isotrope/cholestérique, fibrillogenèse et minéralisation*. Thèse de doctorat : Biophysique moléculaire. Paris : UPMC, 2007.
- [48] – DE GENNES P.G., PROST J. *The physics of liquid crystals ( 2<sup>nd</sup> edition)*. Oxford University Press, International series of monographs on physics, 1993. ISBN : 0-19852024-7.

- [49] – AGUILAR GUTIERREZ O.F., REY A.D. Structure characterisation method for ideal et non-ideal twisted plywoods. *Soft matter*, 2014, vol 10, p 9946-9453. DOI : 10.1039/C4SM01803F.
- [50] – LEE D.B.N., JAMGOTCHIAN N., ALLEN S.G., ABELES M.B., WARD H.J. A lipid-protein hybrid model for tight junction. *American journal of physiology – Renal physiology*, 2008, vol 295, n°6, p 1601-1612. DOI : 10.1152/ajprenal.00097.2008.

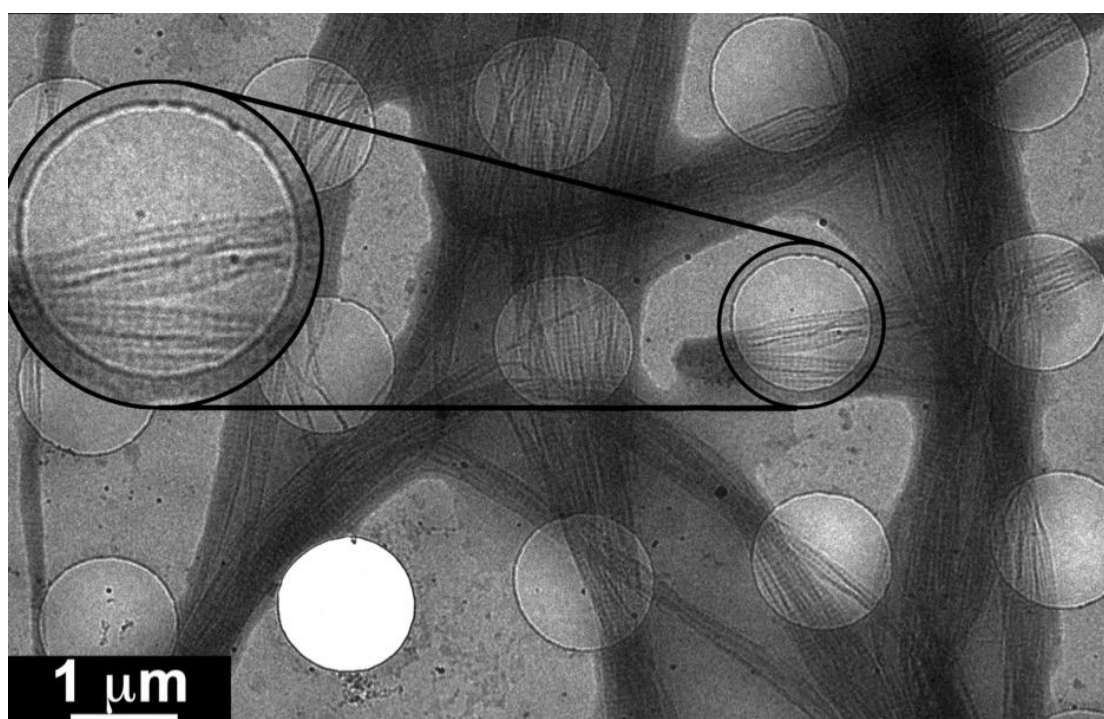


## Partie II – Chapitre 3 : Des phases cristallines-liquides aux matériaux organisés.

I – Le collagène de type I, une protéine fibrillaire.

1 – Structure des fibrilles de collagène.

La fibrille de collagène est un assemblage unidirectionnel de tropocollagène pouvant atteindre 1 cm de longueur et dont le diamètre excède rarement 500  $\mu\text{m}$  [1]. Elle se distingue de toutes les autres fibrilles biologiques par sa périodicité axiale caractéristique de 67 nm encore appelée période D (voir figure 1 – fibrille en cryoTEM). Cette périodicité peut être observée par AFM, diffraction aux rayons X ou encore en microscopie électronique [2].



*Figure 1 : Fibrilles de collagène de type I observées au cryo-TEM. Sur chaque fibrille, on distingue une striation périodique, la période D de 67 nm (voir zoom).*

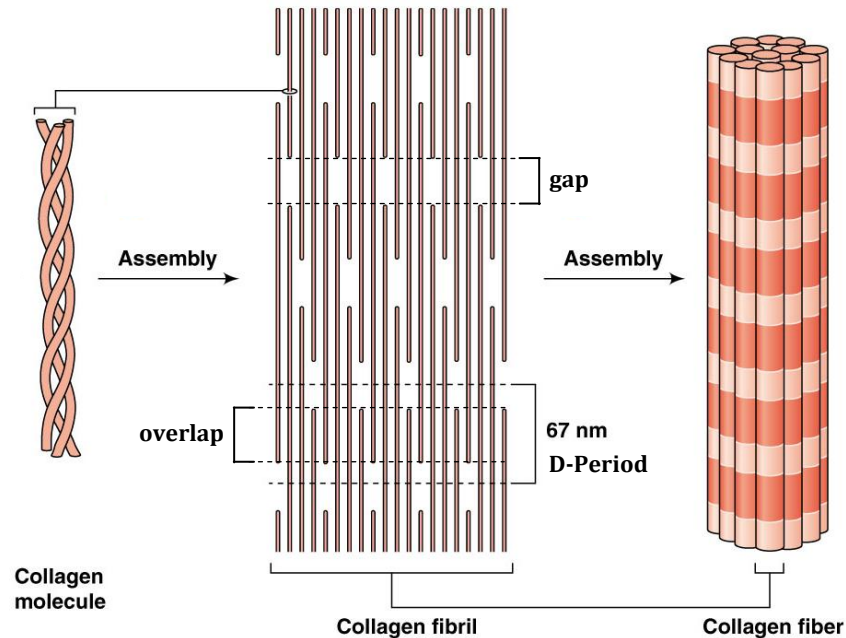
Ce « motif » particulier découle directement de la disposition axiale du collagène au sein de la fibrille. Selon le modèle proposé par Petruska *et al.* [3], les molécules de collagène sont alignées le long de l'axe de la fibrille avec un décalage périodique  $\delta$  tel que :

$$\delta = k \times 67\text{nm}$$

avec  $k$ , un entier naturel non-nul (voir figure 2).

La molécule de collagène mesurant 4,4 période D (300 nm), il existe donc un espace ou « gap » entre deux molécules de collagène consécutive. En projetant cette structure, on distingue alors deux types de régions :

- Les régions pauvres en électrons qui correspondent à la projection de portions de fibrille comprenant des « gaps ».
- Les régions riches en électrons qui correspondent à la projection de portions de fibrille ne comprenant que des morceaux de tropocollagène.

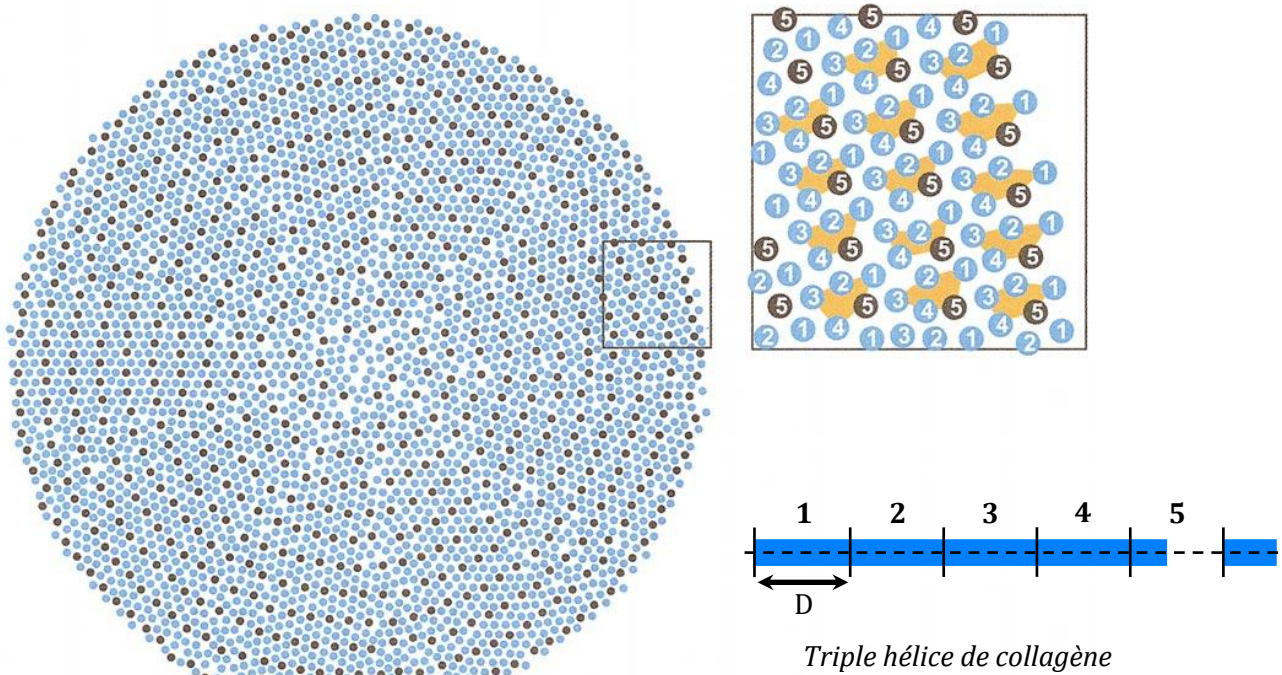


**Figure 2 :** Organisation axiale des fibrilles de collagène selon le modèle de Petruska et al. Les molécules de collagène, alignées le long de l'axe de la fibrille, sont périodiquement décalées d'une distance  $\delta$  multiple de 67 nm. La présence d'un « gap », entre deux molécules de collagène consécutives, est l'origine de régions riche (overlap) et pauvre (gap) en électrons. C'est l'alternance de ces régions que l'on observe en microscopie électronique ou en diffraction aux rayons X (d'après [4]).

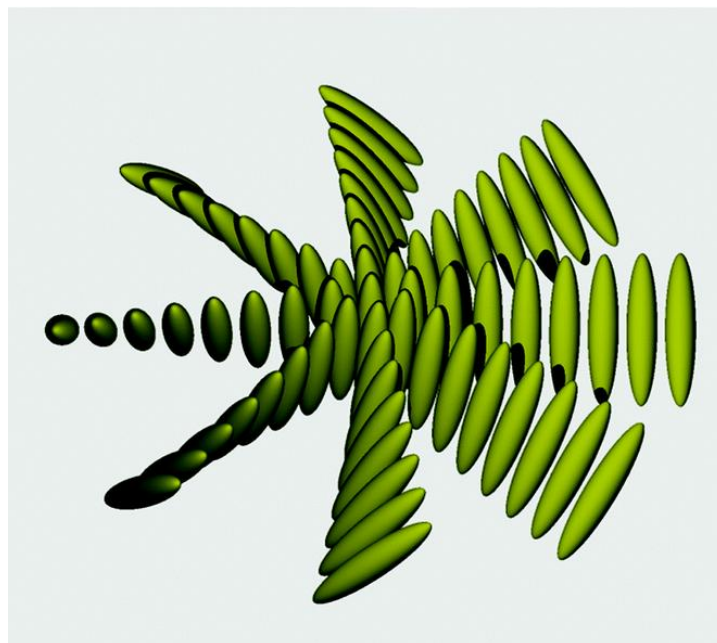
L'organisation transverse de la fibrille est un sujet qui fait encore débat. Actuellement, le modèle accepté correspond à une disposition des molécules de tropocollagène au sein d'un réseau quasi-hexagonal. Ce modèle a été raffiné par Hulmes *et al.* afin de concilier cette structure cristalline avec la forme cylindrique de la fibrille [5]. Pour Hulmes *et al.*, des zones parfaitement organisées et disposées radialement sont séparées par des régions amorphes (voir figure 3). La proportion de zones cristallines et de zones amorphes varie d'ailleurs fortement d'un tissu à un autre sans qu'aucune explication n'ait été apportée [2].

Enfin, Orgel et al. [17] ont depuis apporté des précisions sur une sous-structure de la fibrille : la microfibrille. Selon le modèle d'Orgel, les molécules de tropocollagène s'associent par cinq en une super-hélice droite. C'est cet assemblage torsadé que l'on nomme microfibrille et qui serait en fait disposé au sein du réseau quasi-hexagonal. La continuité de la fibrille et l'impossibilité d'isoler une microfibrille à partir d'un tissu s'explique par l'interdigitation de ces dernières.





**Figure 3.** La molécule de collagène est considérée comme étant constituée de cinq segments de longueur  $D$  (67 nm). Le cinquième segment est par conséquent plus court. Les microfibrilles, une sous structure de la fibrille composée de cinq molécule de collagène, sont représentés en orange. Pour décrire l'organisation transverse des fibrilles de collagène, Hulmes et al. ont proposé un modèle comprenant des régions cristallines séparées par des zones amorphes. La présence de zones désorganisées permet de concilier une structure cristalline avec la forme cylindrique de la fibrille. Dans l'encart à droite, le tropocollagène est disposé au sein d'un réseau quasi-hexagonal. (d'après [8]).



**Figure 4:** Structure « Double twist » proposée par Bouligand et al. pour décrire l'organisation transversale des fibrilles. Cette structure est également employée pour décrire un type particulier de mésophases : les phases bleues (d'après [9]).  
 Un autre modèle, décrit par Bouligand et al. [6] et récemment repris par Brown et al. [7], permet de lier la formation des fibrilles au comportement de

mésogène du collagène. L'arrangement transversal des molécules de collagène serait en fait similaire à une configuration dite en « double twist » (voir figure 4). Ce type de configuration est également utilisé pour décrire certaines mésophases : les phases bleues. D'une manière similaire aux mésophases de collagène produites *in vitro*, la forme et la taille des fibrilles dépend des conditions physico-chimiques rencontrées dans chaque tissu [1, 7].

## 2 – Quelques généralités sur la fibrillogenèse.

Une des particularités du collagène de type I est sa capacité à former spontanément des fibrilles en condition physiologique. Après avoir été excrété de la cellule, les macromolécules de tropocollagène, débarassées de leurs propeptides, sont incorporées aux fibrilles préexistantes de la matrice extracellulaire. *In vivo*, la fibrillation du collagène est donc contrôlée par l'action d'enzymes (cf Partie I – Chapitre 1). Toutefois, la forme sous laquelle ces molécules sont associées à la matrice extracellulaire fait encore débat.

Canty et *al.* [10] ont observé la présence de fibrilles de collagène au sein même de fibroblastes d'embryon, démontrant que le clivage des propeptides et la fibrillogenèse peut débiter lors du transport entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique. Ils ont également identifié une nouvelle structure cellulaire : le « fibripositor ». Cette extrusion de la membrane plasmique permettrait à la cellule d'orienter et placer les nouvelles fibrilles de collagène qu'elle contient avant de les sécréter dans l'espace extracellulaire. La fibrillogenèse intracellulaire et les « fibripositor » n'ont cependant été observés qu'au niveau du tendon d'embryon de poulet, jamais dans un tissu adulte [11].

*In vitro*, la fibrillogenèse peut-être induite en modifiant le pH ou encore la force ionique. En partant d'une solution acide de triple hélice de collagène, il est possible de déclencher la fibrillogenèse en augmentant le pH de la solution vers des valeurs comprises entre pH=6 et pH=10. Dans cette gamme de pH, la charge nette du collagène est quasiment nulle ( $\text{pH} = \text{pI}$ ). La solubilité du collagène dans l'eau devient alors très faible et les molécules s'associent par cinq pour former des agrégats : les microfibrilles. Ce sont ces microfibrilles qui s'associent par la suite pour donner la fibrille de collagène [1, 2].

La fibrillogenèse est un procédé essentiellement d'origine entropique puisque l'association des molécules de collagène permet de libérer une quantité importante de molécules d'eau de structure [12]. La formation des fibrilles est également facilitée par l'établissement de liaisons hydrogènes entre les résidus polaires [13] et de liaisons de Van der Waals entre les résidus hydrophobes du collagène [14].

La fibrillogenèse reste toutefois encore mal comprise [2]. Par exemple, il a été démontré que les télépeptides catalysent l'alignement du collagène et la nucléation des microfibrilles [15]. Cependant, ce rôle des télépeptides n'a toujours pas été expliqué.

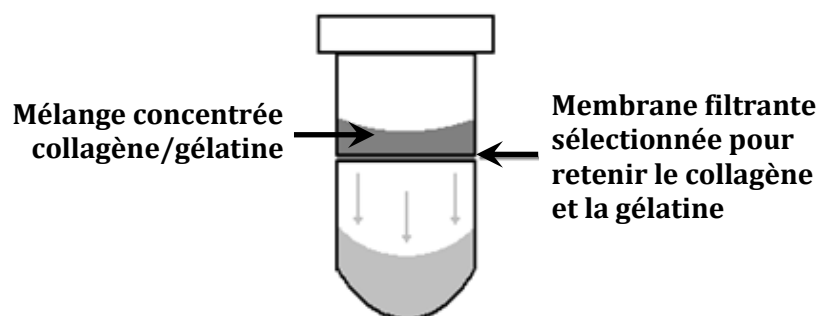
## II - Fibrillation de mélanges concentrées collagène/gélatine.

## 1 – Préparation des mélanges concentrés collagène/gélatine.

Les mélanges denses ont été préparés en concentrant des solutions diluées par centrifugation-filtration. Le procédé consiste à centrifuger une solution au travers d'un filtre de porosité adaptée (30 kDa) afin de permettre la rétention et la concentration du collagène et de la gélatine. Les dispositifs commerciaux utilisés sont des tubes constitués de deux compartiments séparés par un filtre (voir figure 5). A la différence de l'évaporation souvent utilisée, cette méthode nous permet de conserver les mêmes conditions chimiques (température, quantité d'acides, de sels, etc.) quelque soit la concentration en protéines. On évite également le phénomène de « croutage » du collagène observé à l'interface eau/air au cours de la concentration par évaporation. Enfin, on élimine les éventuels petits contaminants résiduels et on minimise les risques de contamination par des bactéries, algues et autres champignons...

Le principal désavantage de la centrifugation-filtration réside dans l'utilisation de la centrifugation. A la fin d'un « run » de centrifugation, les phases denses produites présentent souvent un gradient de concentration. Les phases denses étant très visqueuses, le gradient a tendance à se dissiper très lentement. Notons que le phénomène de mise en place du gradient de concentration est commun quelque soit la méthode de concentration utilisée dans le cas du collagène (dialyse, évaporation, injection et couplage des méthodes). Comme les autres techniques, la centrifugation peut également influencer l'organisation modifier l'organisation et/ou la répartition des entités présentes dans nos mélanges. Cela sera d'autant plus critique pour des systèmes biphasiques.

Pour la préparation de nos matériaux, nous avons décidé de nous placer à une concentration totale en protéines de 100 mg/mL. La concentration de transition isotrope/mésophase étant d'environ 35 mg/mL pour le collagène (cf Partie II chapitre 2), nous nous sommes ainsi assurés de travailler avec des phases cristallines liquides de collagène et de gélatine.



**Figure 5:** Schéma d'un tube de centrifugation-filtration. Le tube est composé de deux compartiments séparés par une membrane filtrante qui permet la rétention et la concentration des objets d'intérêt. Les deux compartiments peuvent être séparés ce qui permet une concentration de l'échantillon sur plusieurs décades (figure de F. Wendel).

## 2 – Fibrillogenèse sous vapeur d'ammoniac.

Afin d'augmenter le pH au sein d'une solution de collagène, de nombreux procédés ont été reportés dans la littérature. Toutefois, la plupart d'entre eux passe par une dilution des solutions de collagène. Nous avons par conséquent opté pour la fibrillogénèse sous vapeur d'ammoniac. Le procédé consiste à placer les échantillons dans une enceinte hermétique saturée en ammoniac. La solubilisation de ce gaz basique au sein des mélanges concentrés entraîne la neutralisation des acides et l'augmentation du pH. Besseau & Giraud-Guille [16] ont montré que cette méthode permet une fibrillation du collagène tout en conservant la structure préexistante des mésophases.

Le protocole relatif à la préparation des mélanges concentrés collagène/gélatine et à leur fibrillation est indiqué de manière détaillée en annexe.

### III – Etude structurale de matrices denses et organisées collagène/gélatine.

#### 1 – Conditions étudiées.

La liste des conditions étudiées est indiquée dans le tableau 1. Pour simplifier la nomenclature, les solutions denses (avant fibrillation) portent le préfixe « **s** » et les matrices le préfixe « **m** ».

Par manque de temps, nous n'avons pas pu observer l'ensemble de ces conditions en IRM et au MET. Nous avons, en particulier, rencontré de grosses difficultés au cours de la préparation des échantillons pour le MET. La nature hétérogène de nos échantillons semble être à l'origine des échecs que nous avons essuyés (voir ci-dessous). Nous nous sommes toutefois efforcés de couvrir l'ensemble du diagramme de phase afin d'obtenir une vue globale de ce système.

Condition	% gélatine	% collagène	C <sub>protéine</sub> (mg/mL)	CH <sub>3</sub> COOH/HCl (mM)	DSC	IRM	TEM
<b>m0%</b>	0	100	100	10/0,3			
<b>m5%</b>	5	95	100	10/0,3			
<b>m15%</b>	15	85	100	10/0,3			
<b>m25%</b>	25	75	100	10/0,3			
<b>m50%</b>	50	50	100	10/0,3			
<b>m75%</b>	75	25	100	10/0,3			
<b>m85%</b>	85	15	100	10/0,3			
<b>m95%</b>	95	5	100	10/0,3			
<b>m100%</b>	100	0	100	10/0,3			

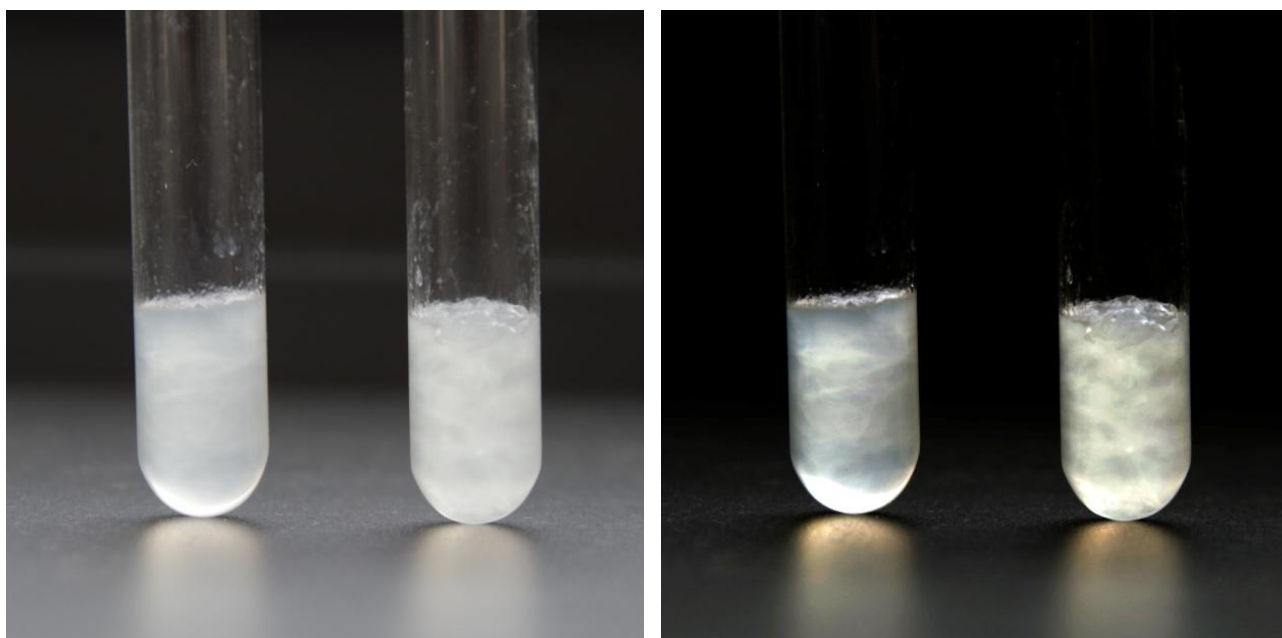
**Tableau 1 :** Liste des matrices réalisées et étudiées par DSC, IRM et TEM. Les cases vertes correspondent aux échantillons qui ont pu être analysés/observés par la technique indiquée.

#### 2 – Aspect des matrices.

Après avoir été concentré, les solutions denses de collagène (**s0%**) et de gélatine (**s100%**) sont toutes les deux transparentes et homogènes alors que les mélanges collagène/gélatine (**s5%** à **s95%**) sont tous plus ou moins turbides et hétérogènes. En effet, au sein des mélanges on distingue des « volutes » qui restent présentes même après plusieurs jours de relaxation (voir figure 6). De plus, à l'exception de la gélatine (**s100%**), toutes les solutions polarisent la lumière.

Après avoir été fibrillé, les gels de collagène (**m0%**) et de gélatine (**m100%**) restent transparents. Les mélanges collagène/gélatine (**m5%** à **m95%**) deviennent quant à eux des gels blancs qui conservent un aspect hétérogène. Ces matériaux ne peuvent donc malheureusement pas être utilisés comme des implants cornéens...

Certains gels (**m50%**, **m75%**) présentent toutefois un aspect intéressant (en tous les cas d'un point de vue esthétique) puisqu'ils semblent être constitués de plaquettes nacrées noyées dans une matrice blanche.



**Figure 6 :** Mélanges concentrés collagène/gélatine préparés pour les expériences d'IRM. Le diamètre externe du tube est de 10 mm. Les solutions s25% (tube de gauche) et s50% (tube de droite) sont turbides et ont un aspect hétérogène (« volutes »). Photographie originale et après optimisation de l'histogramme d'intensité permettant de faire ressortir les hétérogénéités au sein de solutions (resp. gauche et droite).

### 3 – Caractérisation des matrices par DSC.

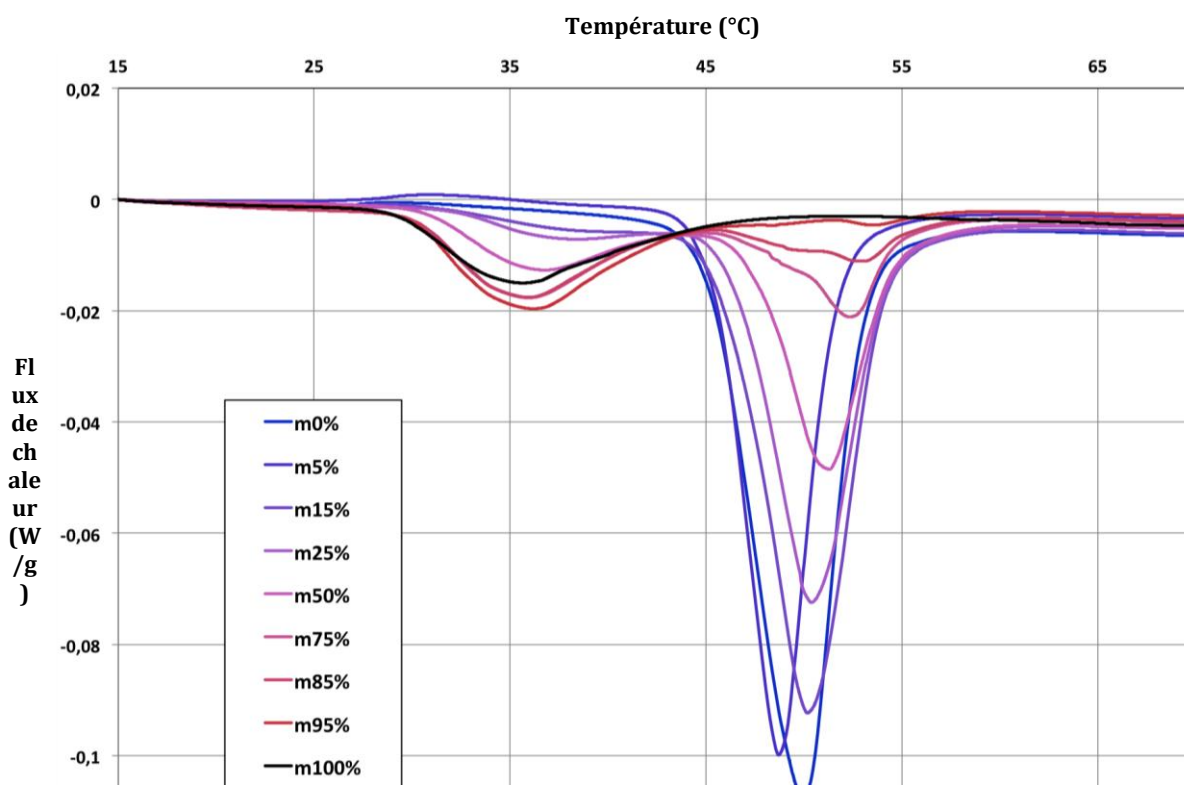
#### a – Protocole expérimental.

Les thermogrammes des matrices ont été enregistrés à l'aide d'un appareil DSC Q20 (ThermoAnalytic). La dénaturation du collagène étant un procédé irréversible, les matrices n'ont subi qu'un seul cycle de montée et

descente en température. Avant chaque mesure, les matrices sont restées 3 jours dans l'eau déionisée à 4°C. Les échantillons ont été découpés peu de temps avant la mesure et placés dans des capsules hermétiques en aluminium. Ils sont ensuite transférés dans l'appareil et stabilisés pendant 5 minutes à 5°C. Les échantillons subissent ensuite une montée en température jusqu'à 70°C puis une descente jusqu'à 5°C avec une vitesse de 5°C/min. Pour chaque condition, 4 échantillons ont été analysés. Chaque échantillon a été préalablement pesé afin de déterminer l'enthalpie massique de dénaturation.

## b – Résultats.

Comme indiqué dans la littérature [19], les thermogrammes de la gélatine (**m100%**) et du collagène fibrillé (**m0%**) se résument à un unique pic endothermique entre 5°C et 70°C (voir figure 7). Ce pic correspond à la transition pelote/triple hélice.



*Figure 7 : Thermogrammes des matrices collagène/gélatine enregistrés par DSC entre 5°C et 70°C. Au cours de la montée en température, on observe successivement la dénaturation des triples hélices de gélatine (pics larges centrés sur 35°C) puis de collagène fibrillé (pics étroits et intenses centrés sur 50°C). Chaque thermogramme correspond à la moyenne sur les thermogrammes de 4 échantillons.*

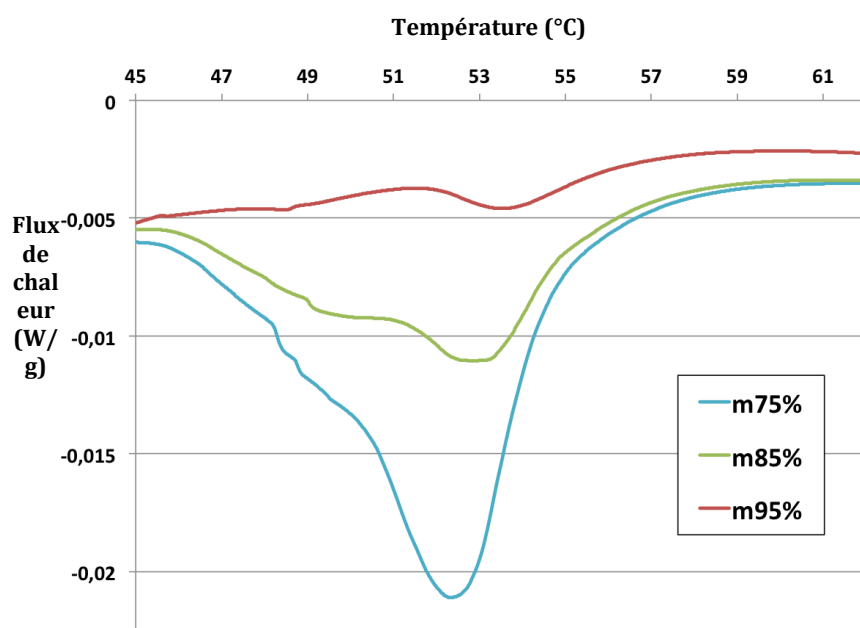
Pour la gélatine, ce pic est plus large car les segments de triples hélices sont de taille variable. De plus, la température de transition pelote/hélice est

bien plus faible pour la gélatine ( $T_{m100\%} = 30^{\circ}\text{C}$ ) que pour le collagène fibrillé ( $T_{m0\%} = 49^{\circ}\text{C}$ ). Cette différence à deux origines :

- Les chaînes  $\alpha$  de la gélatine ne peuvent pas reformer une triple hélice entière de collagène car la dénaturation est un procédé irréversible.
- La fibrillation stabilise la structure en triple hélice du collagène [ref]. En effet, la température de dénaturation d'une solution acide de collagène est d'environ  $37^{\circ}\text{C}$  (cf Partie III).

Sans réelle surprise, le thermogramme des matrices collagène/gélatine (m15% à m95%) comprend deux pics de transition pelote/hélice. Au cours de la montée en température, on observe successivement la dénaturation des triples hélices de gélatine (pics larges centrés sur  $35^{\circ}\text{C}$ ) puis de collagène (pics étroits et intenses centrés sur  $50^{\circ}\text{C}$ ). Pour les trois matrices les plus riches en gélatine (**m75%**, **m85%** et **m95%**), on observe même deux pics de dénaturation pour le collagène (voir figure 8).

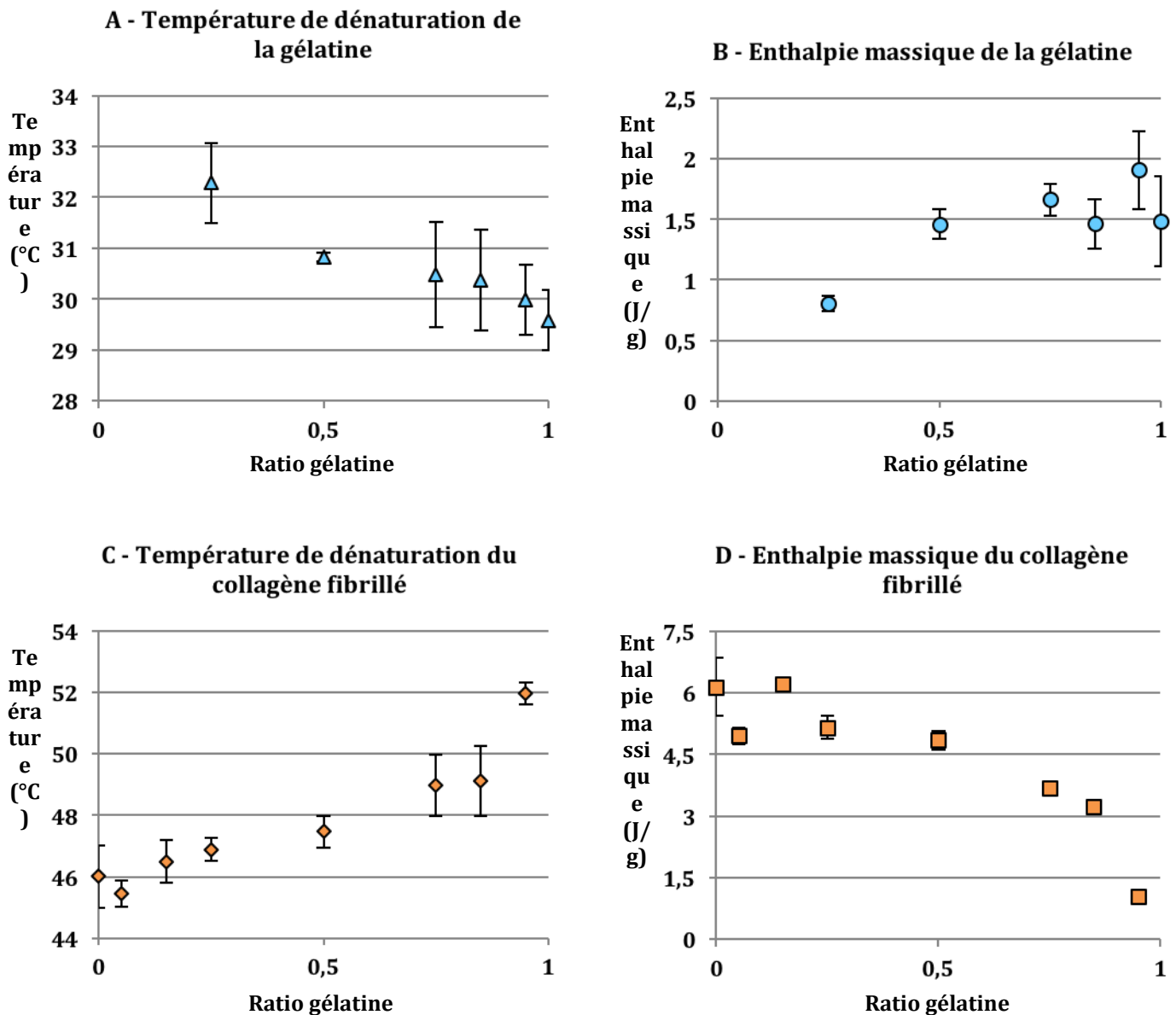
D'un point de vue quantitatif, les températures et les enthalpies massiques des transitions pelote/hélice ont été déterminées à l'aide du software de TA (voir figure 9). Les enthalpies ont été corrigées pour tenir compte des proportions de collagène et de gélatine au sein de chaque matrice.



**Figure 8 :** Thermogrammes des matrices collagène/gélatine enregistrés par DSC entre  $5^{\circ}\text{C}$  et  $70^{\circ}\text{C}$ . Agrandissement sur les pics de dénaturation du collagène fibrillé pour les échantillons m75%, m85% et m95%.

En augmentant la proportion en gélatine, on observe :

- Une augmentation de la température de transition pelote/hélice du collagène fibrillé. L'enthalpie de transition est constante pour des ratios de gélatine compris entre 0% et 50%. Au dessus de 50%, l'enthalpie diminue fortement.
- Une diminution de la température de transition pelote/hélice de la gélatine. L'enthalpie de transition est constante pour des ratios de gélatine compris entre 50% et 100%. En dessous de 50%, l'enthalpie diminue fortement.



*Figure 9 : Analyse de la dénaturation des matrices collagène/gélatine par DSC. En haut, température (A) et enthalpie massique (B) de la transition pelote/hélice du pic de la gélatine en fonction du ratio de gélatine. En bas, température (C) et enthalpie massique (D) de la transition pelote/hélice du pic de collagène fibrillé en fonction du ratio de gélatine. Chaque valeur correspond à la moyenne sur 4 échantillons (barre d'erreur = écart type).*



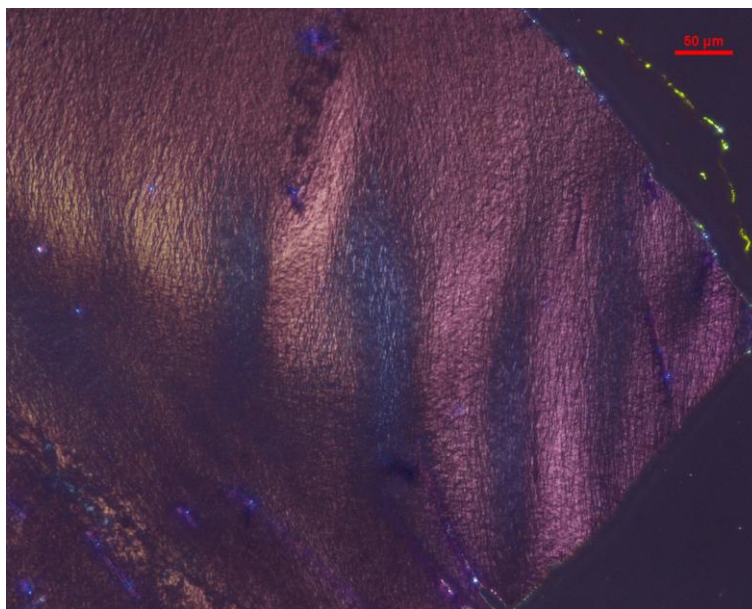
#### 4 – Observation des matrices au MET, en SHG et par IRM.

Dans cette section, nous avons utilisé les mêmes échantillons pour les analyser avec les différentes techniques. Pratiquement, ils ont été synthétisés pour l'observation en imagerie par résonance magnétique nucléaire (cf annexes) puis préparés pour les microscopies optiques et électroniques. L'idée était de corrélérer les données obtenues par les différentes techniques à différentes échelles pour améliorer notre compréhension de ces systèmes.

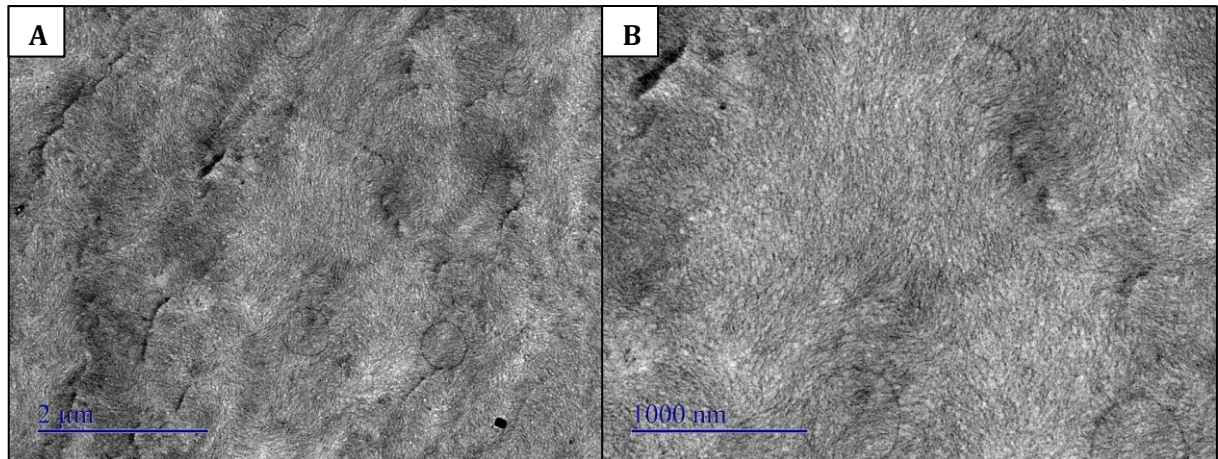
##### a – Matrice **m0%**.

Observée au MOP, la matrice de collagène présente une biréfringence rappelant plutôt les textures en bandes déjà décrites pour le collagène (voir figure 10). En utilisant une lame lambda, on révèle également l'alternance de grands domaines (d'environ 50 sur 30-500  $\mu\text{m}$ ) dont le directeur varie continument. Ces domaines semblent donc être constitués de fibrilles de collagène alignées sur quelques centaines de microns.

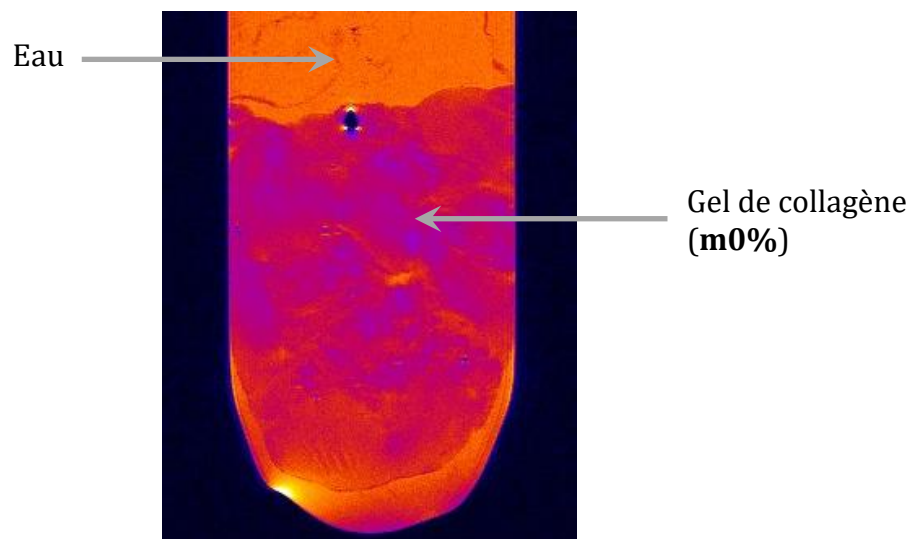
L'observation de coupes ultrafines au MET a permis de confirmer la présence d'un réseau dense de fines fibrilles (voir figure 11). Toutefois, à l'échelle du MET, ces fibrilles apparaissent alignées sur des distances d'environ 1  $\mu\text{m}$ . La structuration à l'origine de biréfringence de ce matériau à une échelle supérieure détectée par les méthodes optiques n'est donc pas mise en évidence par MET sur coupes ultrafines.



*Figure 10 : Observation au MOP (avec une lame lambda) de coupes semi-fines d'une matrice m0%. La coupe a été teinte avec de la toluidine pour marquer le collagène. L'ensemble de la coupe présente une biréfringence non-homogène rappelant plutôt une structure en bande [20]. La lame lambda permet d'observer les changements d'orientations moléculaires et révèle ici une alternance de grands domaines dont le directeur varie continument.*



*Figure 11 : Observation au MET de coupes ultrafines d'une matrice m0%. La matrice est constituée d'un réseau dense (A) de fines fibrilles alignées localement (B).*



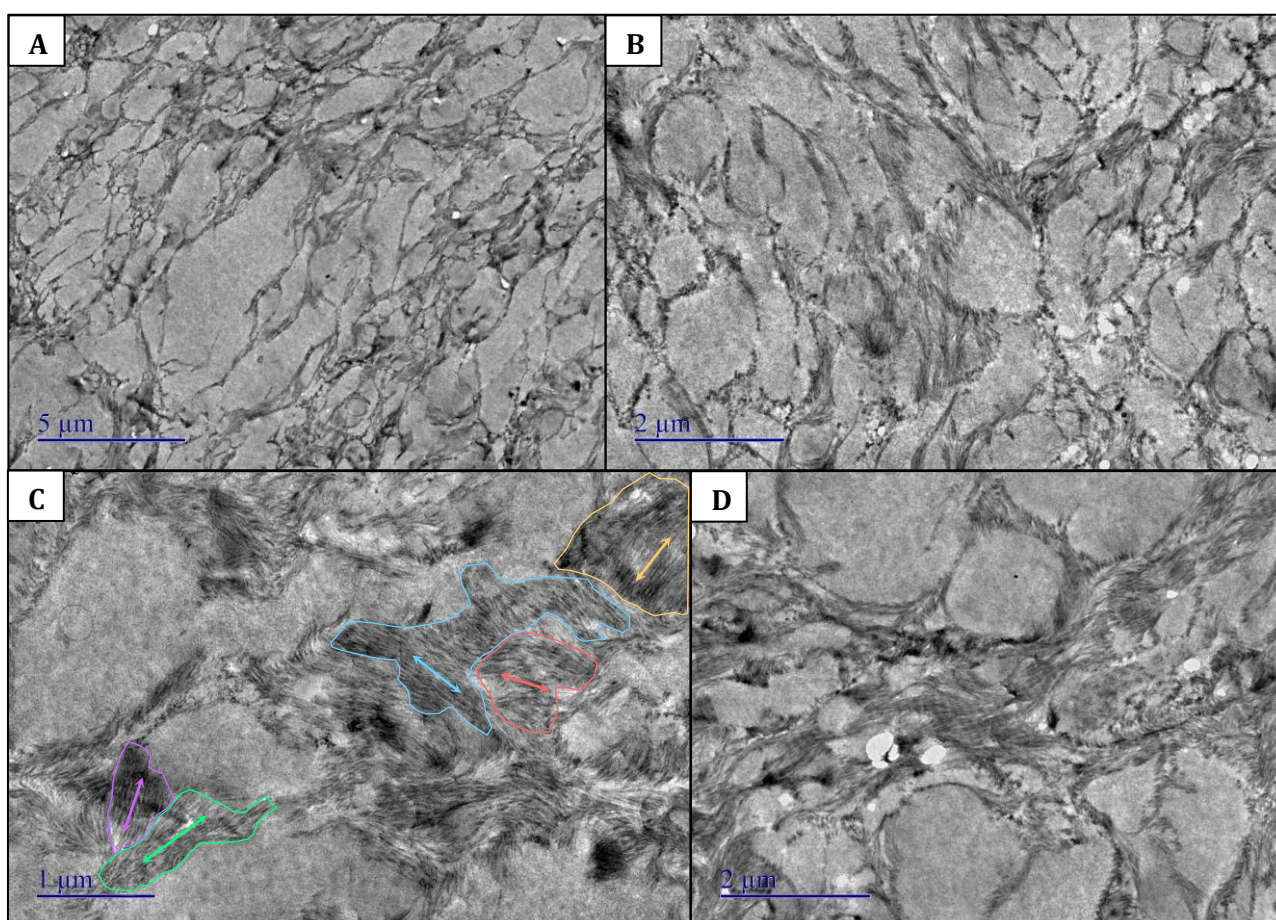
*Figure 12 : Matrice m0% imagée en IRM à l'aide de la séquence RARE. Pour éviter son dessèchement, la matrice est recouverte d'eau déionisé. A une échelle macroscopique, le matériau n'est pas homogène. Cependant, l'origine de ce contraste observé n'est pas encore bien comprise dans le cas de cette matrice. Le tube utilisé a un diamètre interne de 8,3 mm et l'échelle de couleur a été optimisé pour obtenir le meilleur contraste.*

En IRM, la matrice **m0%** a un aspect hétérogène lorsqu'elle est imagée à l'aide de la séquence RARE (voir figure 12). L'origine de ce contraste est cependant encore mal comprise pour ce matériau. Nous avons écarté l'hypothèse d'une hétérogénéité de concentration car la matrice apparaît comme uniforme lorsque nous utilisons une séquence pondérée en densité de protons (voir Partie A – Chapitre 2). Tidu et al. [18] ont montré pour la solution dense de collagène **s0%** se comporte comme un matériau vitreux mou. Selon eux, la solution **s0%** est composée de domaines organisés (mésophase) au sein d'une phase isotrope. La structure étant souvent conservée après fibrillation [16], le contraste observé en IRM pourrait être dû à une répartition hétérogène des domaines organisés.

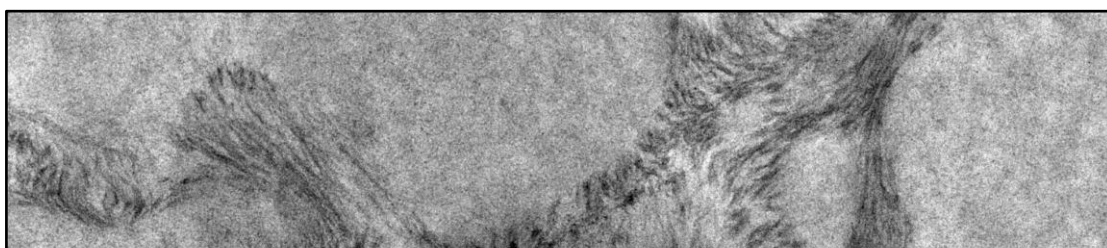
b – Matrice **m25%**.

La matrice **m25%** est un matériau hétérogène composé de deux phases continues. En MET, sur des coupes longitudinales (voir figure 13), on observe :

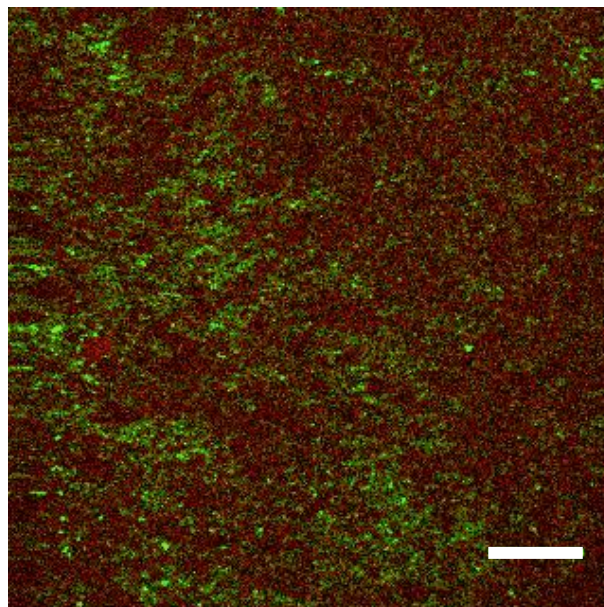
- une phase riche en gélatine (en gris clair) d'aspect granuleux
- une phase riche en collagène (en gris foncé) constitués de fines fibrilles. Ces fibrilles sont en registre au sein de microdomaines (figure 13-C) générant ainsi la striation caractéristique du collagène à l'échelle d'un microdomaine (figure 13-D). Au sein de la phase de collagène, autour des fibrilles, on distingue une matrice plus claire présentant un aspect semblable à celui de la gélatine (voir figure 14).



*Figure 13 : Observation au MET de coupes ultrafines d'une matrice m25%. Sur la plan large (A), on observe que la matrice est composée de deux phases continues : une phase riche en gélatine (gris clair) et une phase riche en collagène (gris foncé). La phase riche en collagène est constituée de fines fibrilles (B, C, D). Ces fibrilles sont alignées au sein de microdomaines structurés (C). Certains de ces domaines présentent la striation caractéristique du collagène (D). Les doubles flèches ajoutées sur la figure C représentent la direction des fibrilles au sein du domaine.*

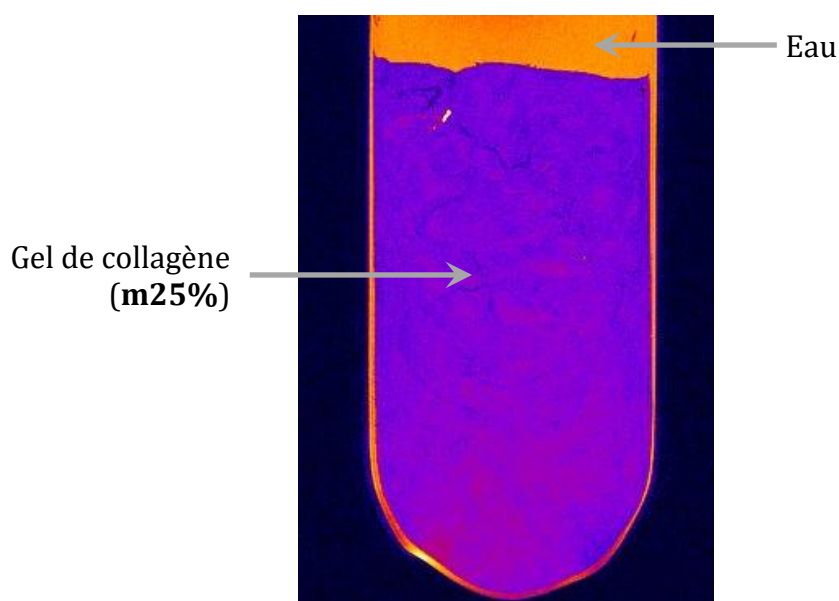


*Figure 14 : Observation au MET de coupes ultrafines d'une matrice m25%. A fort grossissement, dans la phase riche en collagène, on distingue une matrice de gélatine plus claire autour des fibrilles de collagène.*



*Figure 15 : Observation en SHG de coupes semi-fines d'une matrice m25%. En rouge, signal de fluorescence à deux photons (2-PEF) et en vert, signal SHG. Le fond uniforme en 2-PEF indique une répartition homogène des protéines dans la matrice. En SHG, on distingue des taches de quelques microns de diamètre qui correspondent aux microdomaines riches en collagène observés au MET. La répartition de ces microdomaines n'est cependant pas homogène. La barre d'échelle, en blanc, correspond à 75 microns.*

Les coupes de m25% (semi-fines) ont également été observées en SHG (voir figure 15) avec un champ de vue plus large ( $470 \times 470 \mu\text{m}^2$ ). Au milieu d'un fond homogène en 2-PEF (répartition homogène des protéines), on distingue des taches circulaires de quelques microns de diamètre en SHG. Ces taches correspondent aux microdomaines riches en collagène observés au MET. On note que la répartition de ces microdomaines, au sein de la matrice, n'est pas homogène. En effet, un niveau de structuration supérieur est également observé présentant des zones enrichies en microdomaines et des zones qui en sont appauvries. Cette structuration est plus visible en microscopie SHG ci-dessus (voir figure 15). Ces inhomogénéités sont vraisemblablement à l'origine du contraste observée sur les images d'IRM (voir figure 16).

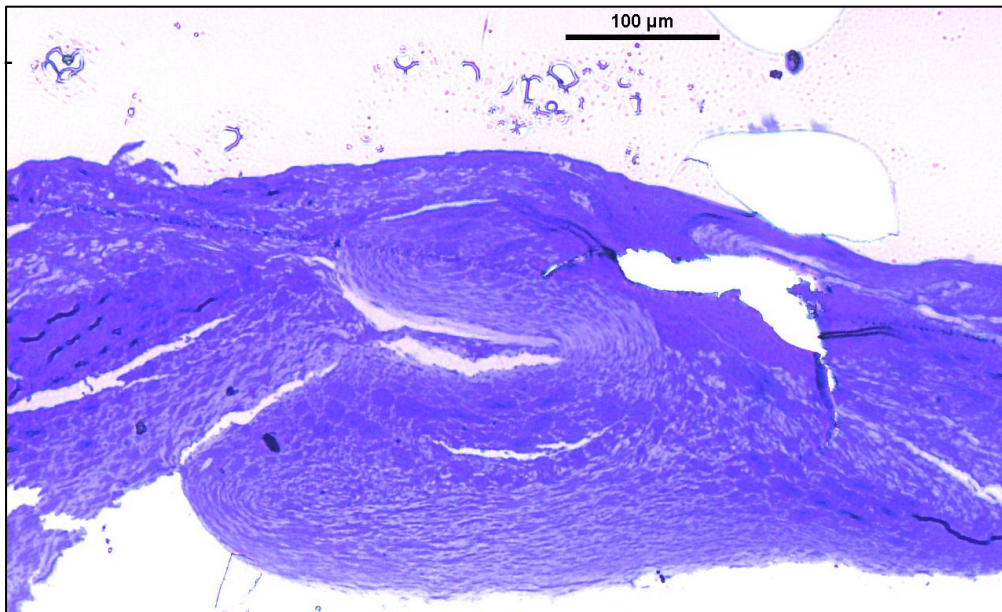


**Figure 16 :** Matrice m25% imagée en IRM à l'aide de la séquence RARE. Pour éviter son dessèchement, la matrice est recouverte d'eau déionisé. A une échelle macroscopique, le matériau apparaît hétérogène. Le contraste observé est probablement dû à la répartition non-uniforme des microdomaines de collagène. Le tube utilisé a un diamètre interne de 8,3 mm et l'échelle de couleur a été optimisé pour obtenir le meilleur contraste.

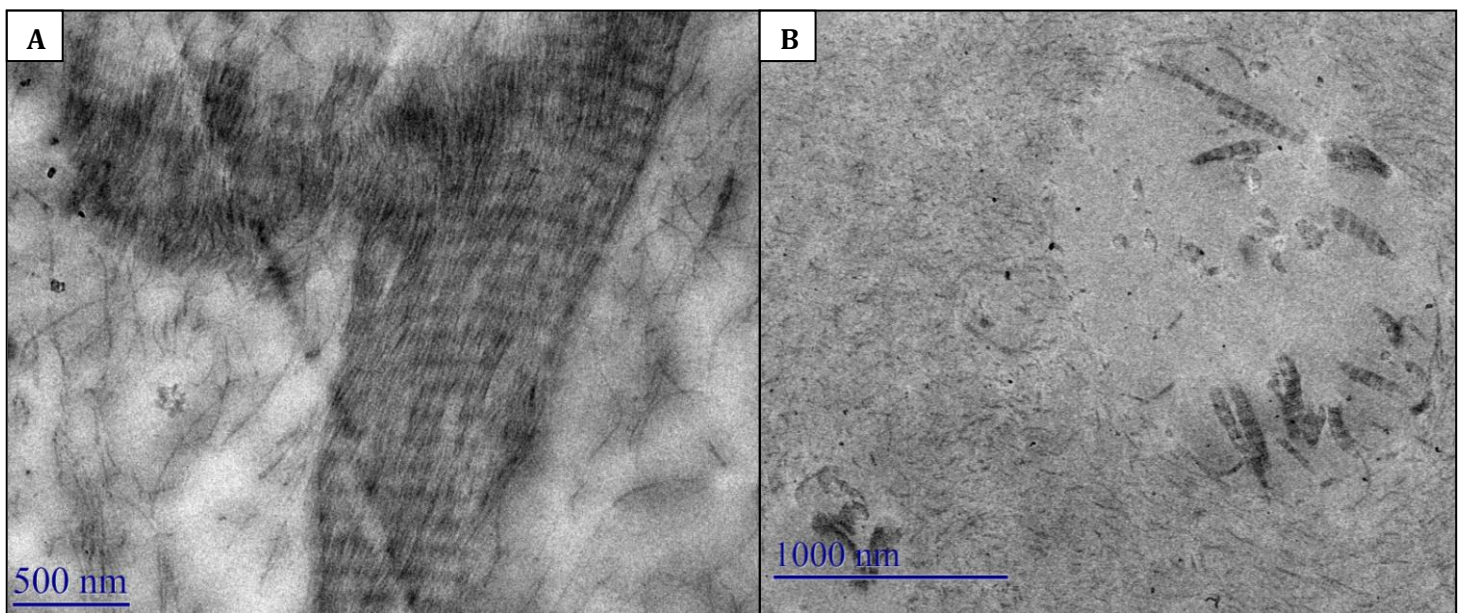
### c – Matrice **m50%**.

Tout comme **m25%**, la matrice **m50%** est un matériau hétérogène composé de deux phases continues (voir figure 17) et dont l'aspect de structuration supérieure est amplifié. Au MET, on observe cependant différentes structures au sein de la phase riche en collagène. On distingue à la fois :

- des zones peu denses constituées de fines fibrilles dispersées aléatoirement dans une matrice que nous associons à de la gélatine (voir figure 18-B).
- des microdomaines denses constitués de fines fibrilles alignées (voir figure 18-A). Certains des domaines possèdent la striation caractéristique du collagène.
- des zones comprenant les deux structures décrites ci-dessus.

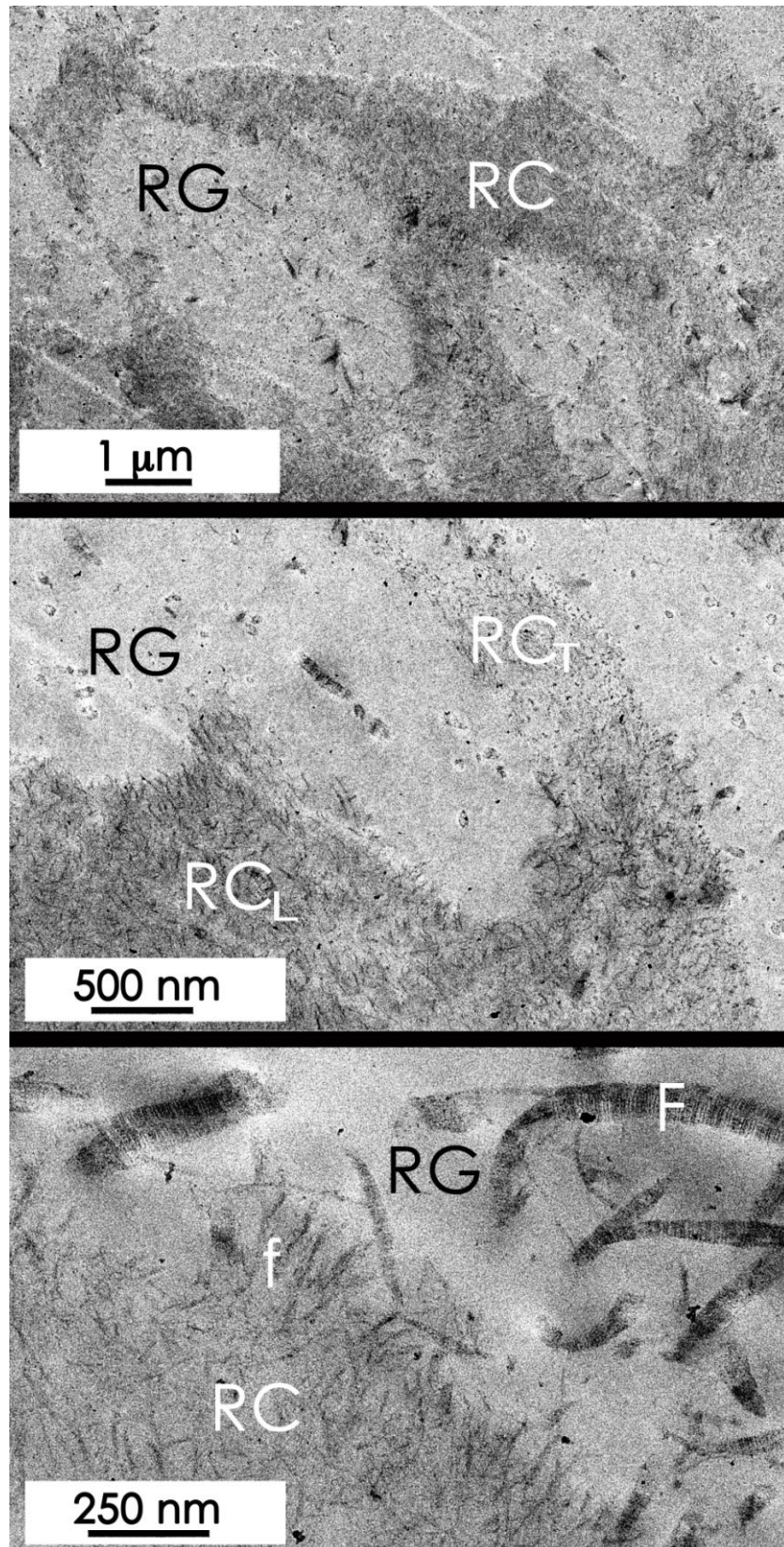


**Figure 17 :** Observation au MOP (sans polariseurs) de coupes semi-fines d'une matrice m50%. La coupe a été teinte avec de la toluidine pour marquer le collagène et la gélatine. Le matériau présente deux phases : une phase riche en collagène (violet foncé) et une phase riche en gélatine (violet clair).

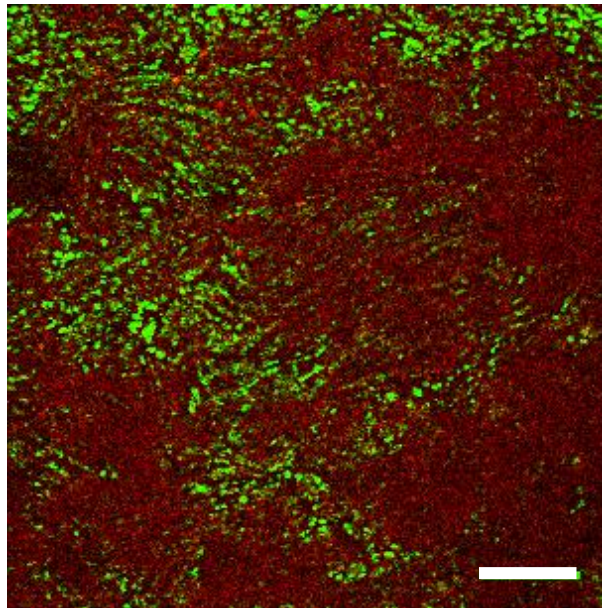


**Figure 18 :** Observation au MET de coupes ultrafines de matrice m50. Au sein de la phase riche en collagène, on observe deux types de structures. A gauche, la phase riche en collagène prend la forme de microdomaines denses constitués de fines fibrilles alignées. A droite, la phase riche en collagène est constituée de fines fibrilles de collagène plus ou moins compactées dans un fondu grisé que nous associons à la gélatine

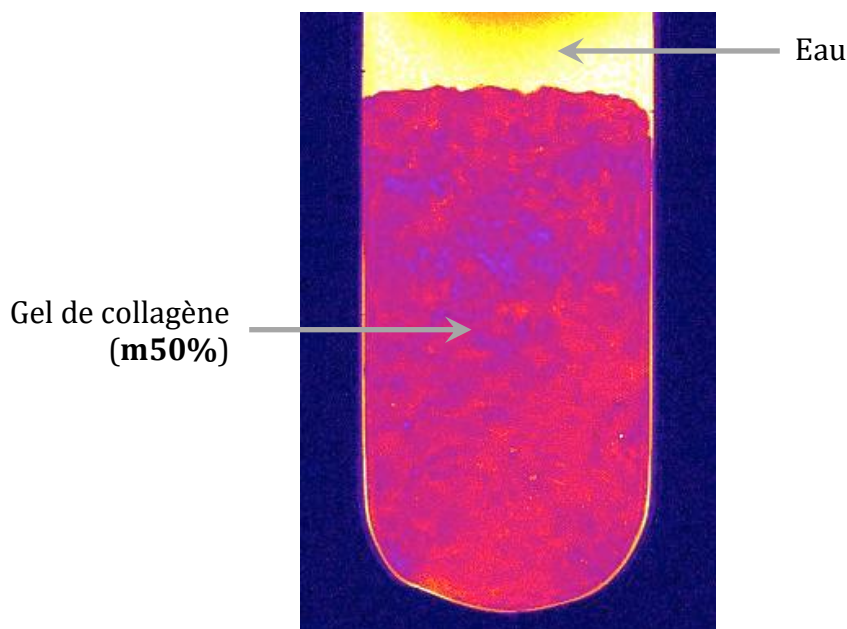
Les fibrilles de collagène sont également présentes au sein de la phase riche en gélatine. On observe à la fois des fibrilles de petit (voir figure 18-A) et de gros diamètre (voir figure 18-B et figure 19). Les fibrilles de gros diamètre présentent toutes une période D bien définis.



**Figure 19 :** Observation au MET de coupes ultrafines de matrice m50%. Comme pour m25%, on distingue une phase riche en gélatine (RG, gris clair) et une phase riche en collagène (RC, gris foncé). La phase riche en collagène est constituée de fibrilles (f) d'environ 20 nm de diamètre compacté dans un fondu ou la présence de gélatine n'est pas exclue. La phase riche en gélatine RG est constituée d'un fondu vaguement texturé au sein duquel on trouve des fibrilles classiques (F) de collagène de d'environ 200 nm de diamètre. La photo du milieu montre que les domaines riches en collagène présentent des orientations spécifiques. En effet nous observons un changement d'orientation des fibrilles qui sont, dans un même domaine coupées soit longitudinalement  $RC_L$ , soit transversalement  $RC_T$ . Ceci indique que la notion de twist est préservée au sein de ces domaines.



*Figure 20 : Observation en SHG de coupes semi-fines transverses d'une matrice m50% En rouge, signal de fluorescence à deux photons (2-PEF) et en vert, signal SHG. Le fond uniforme en 2-PEF indique une répartition homogène des protéines dans la matrice. En SHG, on distingue des taches de quelques microns de diamètre qui correspondent aux domaines riches en collagène observés au MET. La répartition de ces microdomaines n'est cependant pas homogène. Les domaines riches en collagène sont beaucoup plus marqués que dans la condition m25%. La barre d'échelle, en blanc, correspond à 75 microns.*

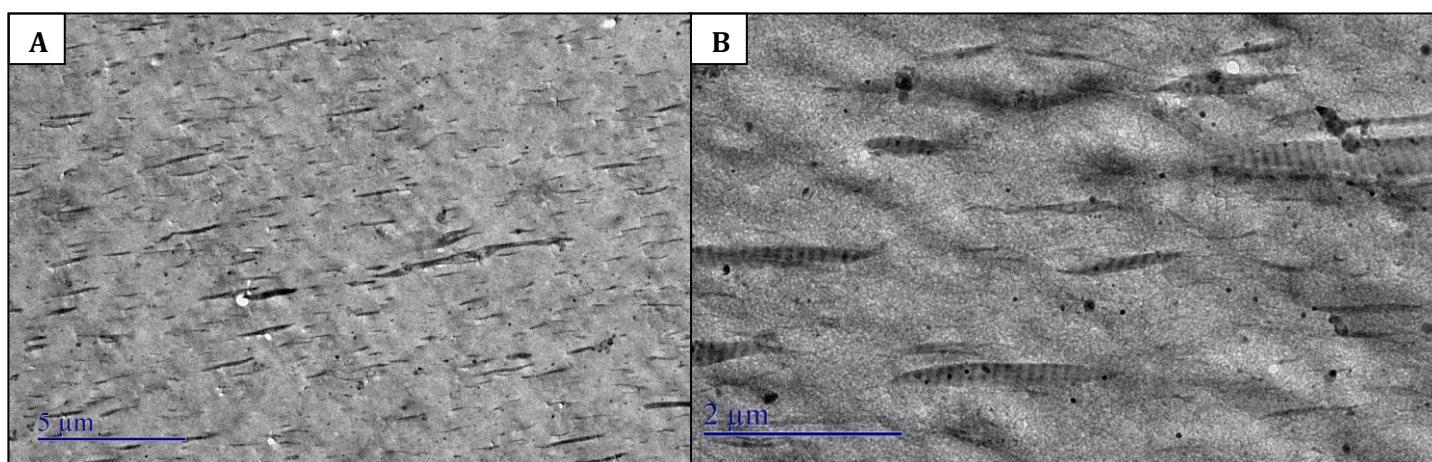


*Figure 21 : Matrice m50% imagée en IRM à l'aide de la séquence RARE. Pour éviter son dessèchement, la matrice est recouverte d'eau déionisé. A une échelle macroscopique, le matériau apparaît hétérogène. Le contraste observé est probablement dû à la répartition non-uniforme des microdomaines de collagène. On note d'ailleurs que le contraste est plus marqué pour m50% que pour m25%. Le tube utilisé a un diamètre interne de 8,3 mm et l'échelle de couleur a été optimisé pour obtenir le meilleur contraste.*



Comme pour **m25%**, l'observation des coupes en SHG démontre que les domaines enrichis en collagène ne sont pas répartis de manière homogène au sein de la matrice (voir figure 20). Ce sont là encore ces inhomogénéités qui sont fort probablement à l'origine du contraste observé sur les images d'IRM (voir figure 21).

d – Matrice **m75%**.

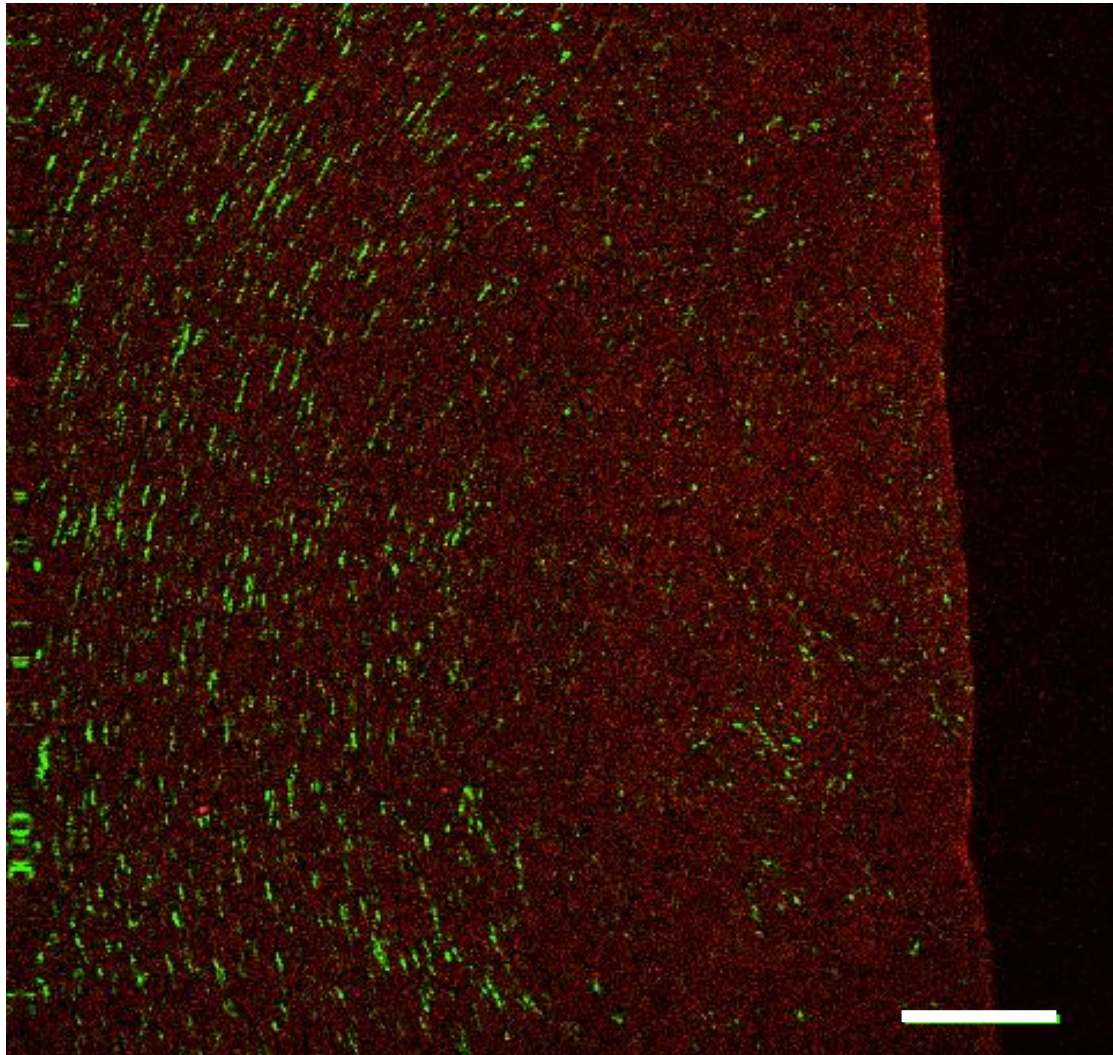


**Figure 22** : Observation au MET de coupes ultrafines de matrice **m75%**. A la différence **m25%** et **m50%**, la matrice **m75%** est composée d'une phase riche en collagène (microdomaines gris foncé de forme allongée) dispersée au sein d'une phase riche en gélatine (A). Les microdomaines sont constitués de fines fibrilles alignées et organisées en registre de telle sorte que la striation caractéristique du collagène en couvre la totalité. (B).

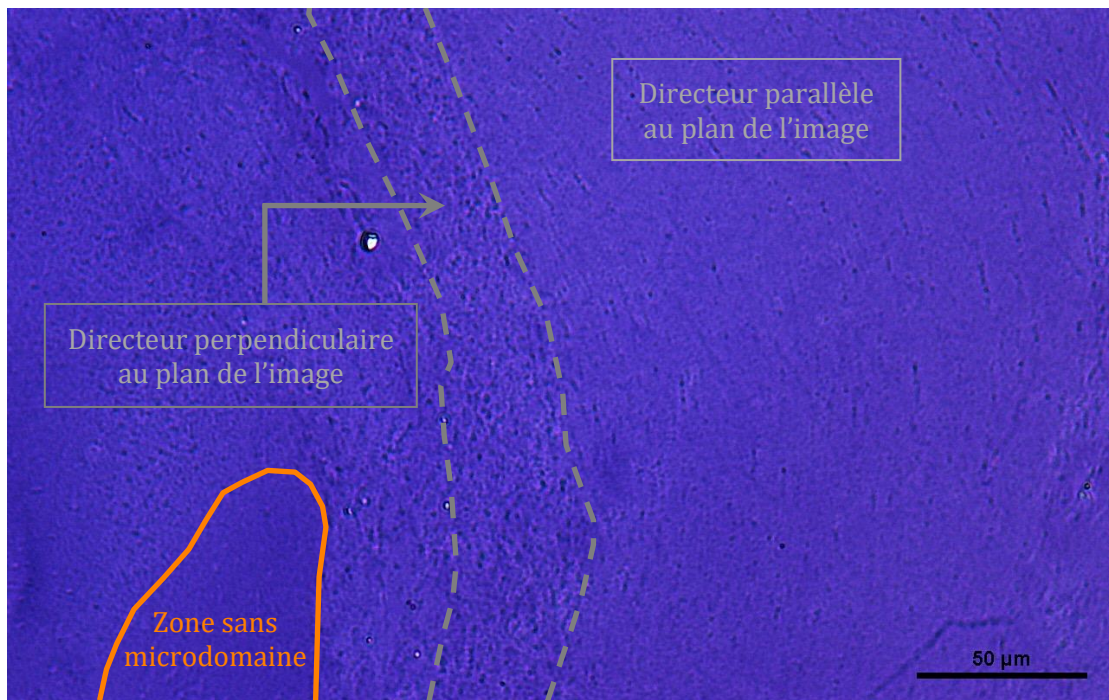
La matrice **m75%** est un matériau hétérogène composé de deux phases : une phase riche en gélatine (voir figure 22-A) dans laquelle on trouve des microdomaines de forme allongée riches en collagène. Ces microdomaines sont constitués de fines fibrilles alignées et présentent toute la striation caractéristique du collagène, la période D (voir figure 22-B).

Sur un champ de vue plus large, en SHG, on observe que les microdomaines de forme anisotrope sont alignés sur plusieurs centaines de microns, rappelant la structure des phases nématiques (voir figure 23). On peut ainsi définir des domaines au sein desquels tous les microdomaines sont alignés selon le même directeur. Sur l'ensemble du matériau, le directeur de ces domaines varie assez fortement, indiquant des changements d'orientation (voir figure 24). La comparaison des coupes transversales et longitudinales de **m75%** ne met pas en évidence de différence notable d'organisation entre les deux sens relevant le caractère globalement isotrope de l'organisation à grande échelle.

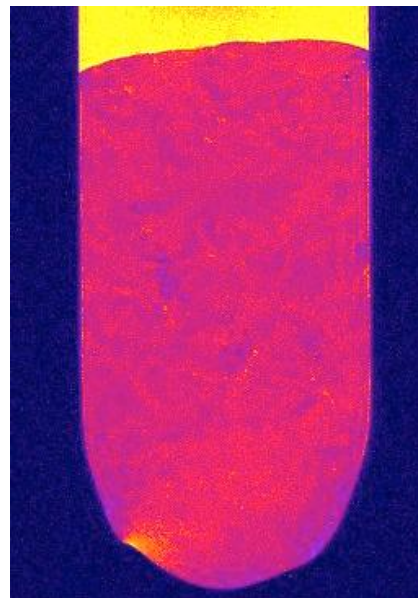
Sur les images de SHG, on observe également que la répartition des microdomaines n'est pas homogène. Les zones avec et sans microdomaines sont à l'origine du contraste observé sur les images d'IRM (voir figure 25).



*Figure 23 : Observation en SHG de coupes semi-fines d'une matrice m75%. En rouge, signal de fluorescence à deux photons (2-PEF) et en vert, signal SHG. Le fond uniforme en 2-PEF indique une répartition homogène des protéines dans la matrice. En SHG, on distingue des microdomaines de forme allongée de quelques microns de long qui correspondent aux domaines riches en collagène observés au MET. Ces microdomaines sont alignés sur plusieurs centaines de microns. On observe également que la répartition de microdomaines n'est pas homogène. Leur quantité semble être plus importante à gauche qu'à droite de l'image, bien que la différence pourrait être dû à une orientation perpendiculaire. La barre d'échelle, en blanc, correspond à 100 microns.*



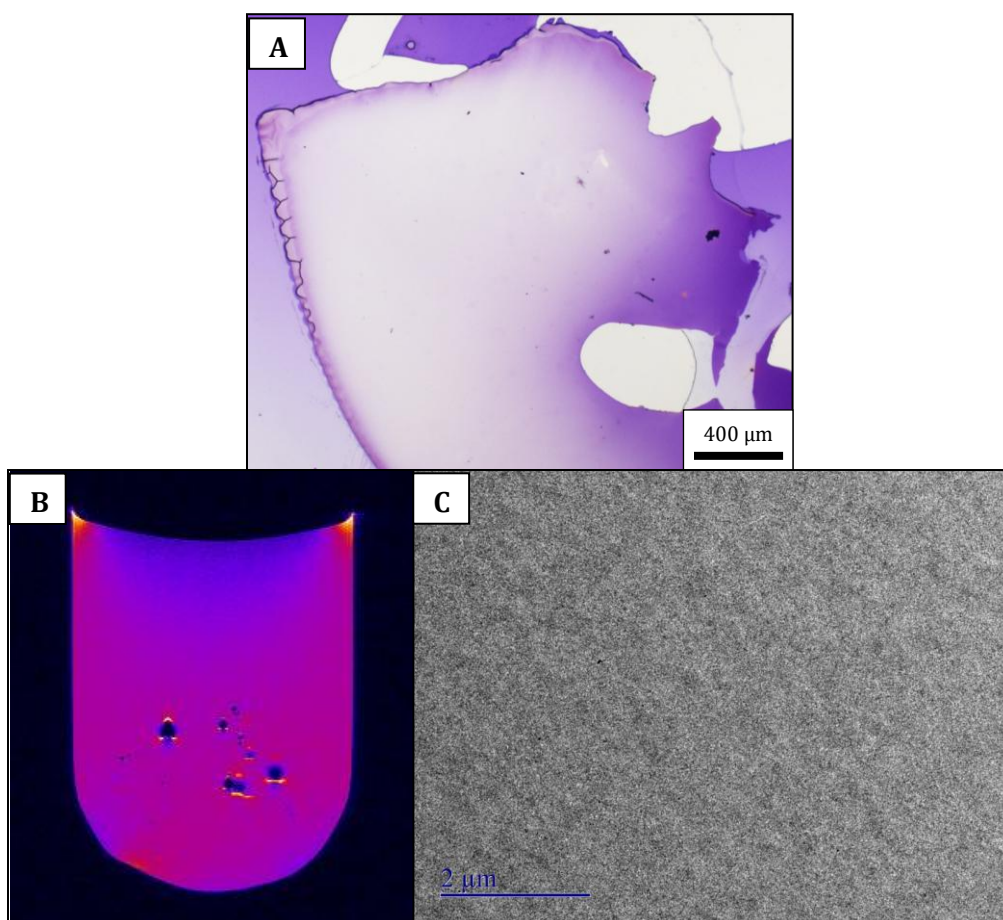
**Figure 24 :** Observation au MOP (sans polariseurs) de coupes semi-fines d'une matrice m75%. La coupe a été teinte avec de la toluidine pour marquer le collagène et la gélatine. Sur cette coupe, on observe la présence de domaines constitués de microdomaines de collagène alignés selon un directeur (voir figure 22). Ce directeur varie brutalement d'un domaine à un autre, rappelant une structure cristalline-liquide en contre-plaqué. Sur la coupe, on note également la présence de zones sans microdomaines.



**Figure 25 :** Matrice m75% imagée en IRM à l'aide de la séquence RARE. Pour éviter son dessèchement, la matrice est recouverte d'eau déionisé. A une échelle macroscopique, le matériau apparaît hétérogène. Le contraste observé est probablement dû à la répartition non-uniforme des microdomaines de collagène. Le tube utilisé a un diamètre interne de 8,3 mm et l'échelle de couleur a été optimisé pour obtenir le meilleur contraste.

e – Matrice **m100%**.

Comme attendu, la matrice ne contenant que de la gélatine (**m100%**) est un gel homogène. Nos techniques d'observations ne nous ont toutefois pas permis d'observer la structuration de la gélatine (voir figure 26). Les images en SHG n'ont pas été ajoutées ici car la gélatine n'émet pas de signal SHG (voir Partie II - Chapitre 2).

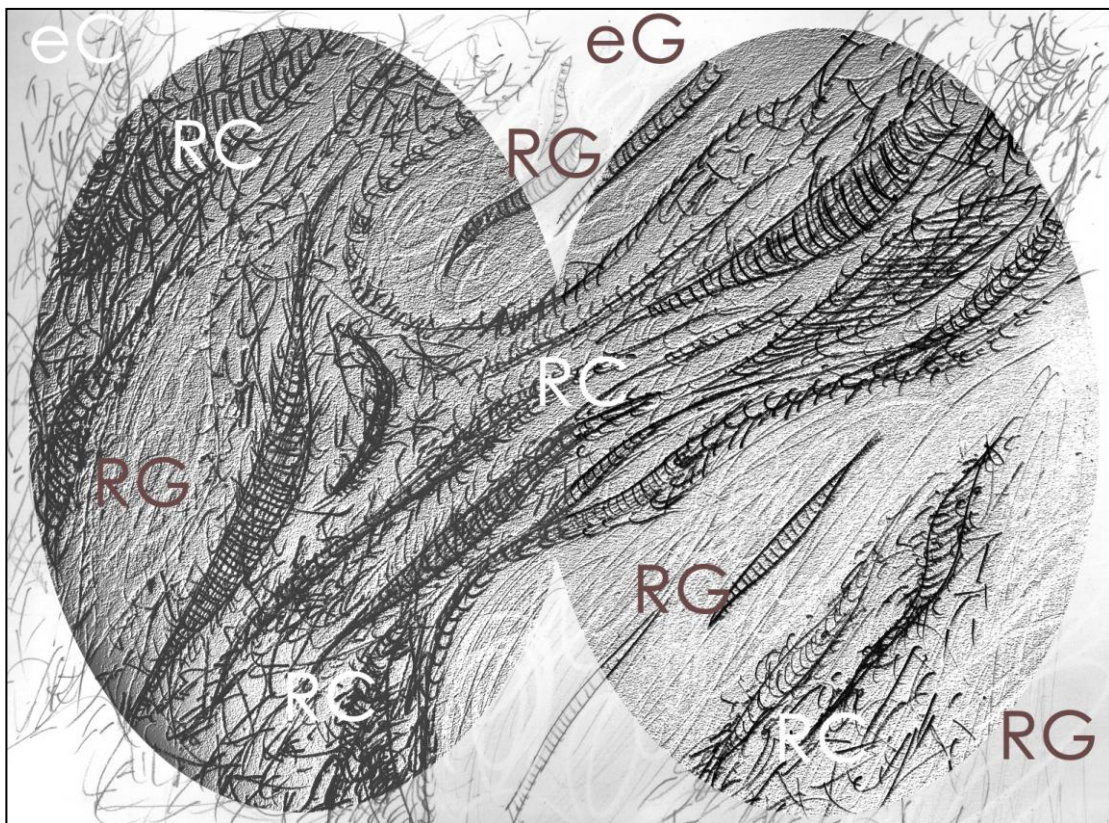


*Figure 26 : En A, observation au MOP (sans polariseurs) d'une coupe semi-fine d'une matrice m100%. En B, observation au MET d'une coupe ultra-fine de m100%. En B, matrice m100% imagée en IRM à l'aide de la séquence RARE. Nous n'avons pas recouvert la matrice d'eau ici car la gélatine seule absorbe l'eau et gonfle. Le tube utilisé a un diamètre interne de 8,3 mm et l'échelle de couleur a été optimisé pour obtenir le meilleur contraste. Sur les 3 images (à trois échelles différentes), la matrice présente un aspect homogène et plutôt lisse. Au MET, on ne distingue pas de structuration de la gélatine.*

## 5 – Discussion.

En fibrillant des mélanges concentrés collagène/gélatine, nous avons obtenu des matériaux hétérogènes (mélange biphasique collagène/gélatine) et structurés à plusieurs niveaux. Nous avons étudié, en particulier, la structuration du collagène à l'aide de diverses techniques d'observation (IRM, SHG, MET) permettant de décrire nos matrices du nanomètre jusqu'au millimètre. De manière générale, la structuration du collagène dans les matrices collagène/gélatine est la suivante :

- Les triples hélices de collagène s'associent pour former de fines fibrilles.
- Les fines fibrilles, alignées sur quelques microns, constituent des microdomaines denses présentant la striation de 67 nm caractéristique des fibrilles et fibres de collagène.
- Ces microdomaines sont dispersés, de manière hétérogène, au sein d'une matrice de gélatine (ségrégation de phase). On distingue donc des zones riches et des zones pauvres en microdomaines. Une tentative de représentation des organisations observée en m25% et m75% est donnée figure 27.



**Figure 27:** Tentative d'illustration de l'organisation des matrices dense collagène/gélatine m25% et m50%. eC: A gauche, zone enrichie en collagène présentant des domaines riche en collagène RC et des domaines riches en gélatine RG. eG: A droite, zone enrichie en gélatine présentant des domaines riche en collagène RC et de domaines riche en gélatine RG. Notons la présence de fibrilles de collagène classiques au sein les domaines riches en gélatine.

La structure des matrices **m25%** et **m75%** est comparable à l'organisation observée dans des microcellules contenant respectivement 25% (**g25%**) et 75% (**g75%**) de gélatine. De manière similaire aux phases denses de collagène [16], la fibrillation sous vapeur d'ammoniac permet donc de conserver la structure préalablement présente au sein de mélanges concentrés collagène/gélatine.

Afin de caractériser les interactions collagène/gélatine au sein des matrices, nous avons également étudié leur dénaturation thermique par DSC. Le thermogramme des matrices collagène/gélatine présentent deux pics (voir figure 7) : un pic de transition pelote/hélice pour la gélatine (basse température) et un pour le collagène (haute température).

Commençons tout d'abord par le pic du collagène. De manière surprenante, on observe une augmentation de la température de dénaturation du collagène fibrillé lorsque l'on augmente le ratio en gélatine. Pour les trois matrices contenant le plus de gélatine (**m75%**, **m85%** et **m95%**), on observe même deux pics de dénaturation pour le collagène (voir figure 8) :

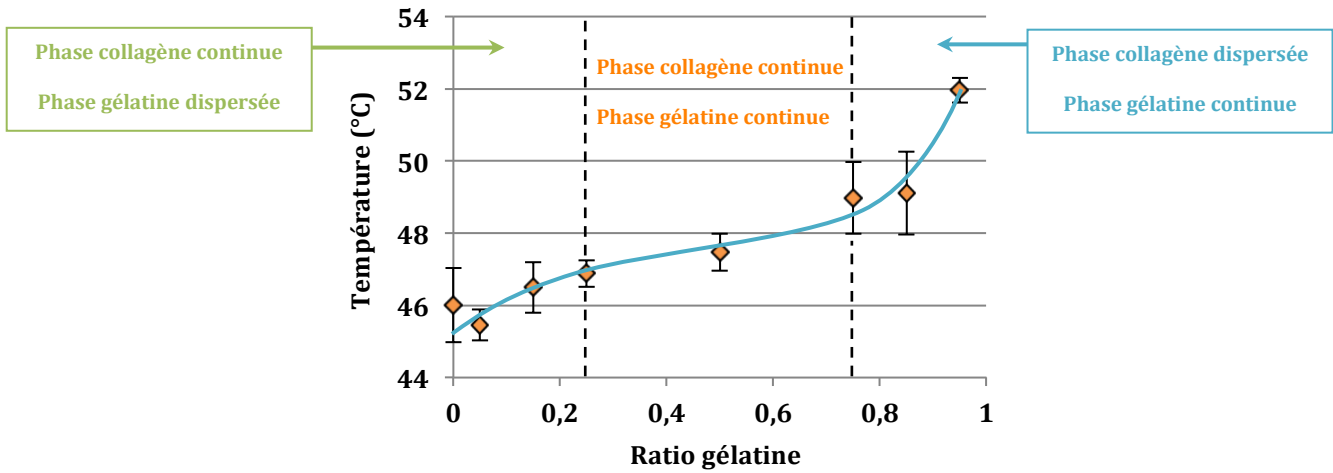
- L'un des pics est centré sur le pic de **m0%**, la matrice ne contenant que du collagène. Il s'agit donc du pic de dénaturation d'une molécule de collagène entourée par d'autres molécules de collagène.
- Le second pic, à plus haute température, signe pour une interaction collagène/gélatine. Il semble qu'il s'agisse du pic de dénaturation d'une molécule de collagène fibrillé à l'interface collagène/gélatine.

Avec cette hypothèse, on explique le profil (voir figure 28) de la courbe  $T_{\text{dénaturation}}(\text{collagène}) = f(r_{\text{gélatine}})$  :

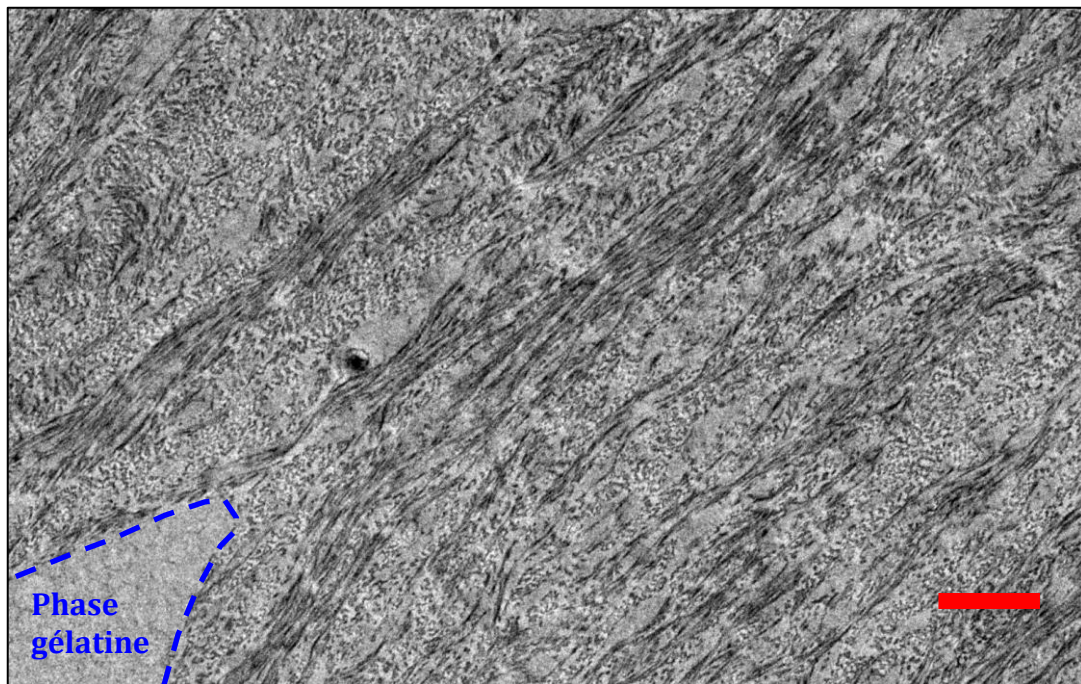
- Entre 5% et 25% de gélatine, on observe une première phase rapide d'augmentation de la température de dénaturation du collagène qui correspond à une augmentation rapide de la proportion de collagène à l'interface collagène/gélatine. Sur cette plage de composition, la gélatine forme une phase dispersée au sein de la phase continue riche en collagène.
- A partir de 25%, la phase riche en gélatine devient une phase continue. Pour des volumes identiques, l'interface entre deux phases continues est moins étendue que l'interface totale entre une phase dispersée et une phase continue. C'est pour cette raison que la fraction de collagène à l'interface collagène/gélatine (et donc la température de dénaturation du collagène) augmente plus lentement après 25%.
- Au delà de 75%, la phase riche en collagène est une phase dispersée. La fraction de collagène à l'interface collagène/gélatine (et la température de dénaturation du collagène) augmente alors à nouveau rapidement avec le ratio en gélatine.

Avec le même raisonnement, on peut également rendre compte du profil de la courbe  $T_{\text{dénaturation}}(\text{gélatine}) = f(r_{\text{gélatine}})$  (voir figure 9). Quand on diminue le ratio en gélatine dans la matrice, la fraction de gélatine à l'interface collagène/gélatine augmente et on observe une augmentation de la température de dénaturation de la gélatine.

### Température de dénaturation du collagène\_ibrillé



**Figure 28 :** Courbe  $T_{\text{dénaturation}}(\text{collagène}) = f(r_{\text{gélatine}})$ . La forme de cette courbe est directement liée à la structure du mélange biphasique collagène/gélatine (voir explication ci-dessus). La courbe en bleu a été tracée pour guider l'œil.



**Figure 29 :** Observation au MET de coupes ultrafines d'une matrice collagène/gélatine comportant 5% de gélatine ( $C_{\text{protéines}} = 90 \text{ mg/mL}$ ). Au sein d'une phase en contre-plaqué de collagène fibrillé, on distingue la présence des globules de gélatine. La barre d'échelle, en rouge, correspond à 500 microns.

L'étude des courbes  $T_{\text{dénaturation}} = f(r_{\text{gélatine}})$  nous permet donc d'estimer la composition pour laquelle la phase riche en gélatine devient continue. D'une manière intéressante, cette composition ( $r_{\text{gélatine}} = 25\%$ ) correspond également à

la perte de la structure en contre-plaqué de la phase riche en collagène (voir Partie II – Chapitre 2). Je pense que ces deux évènements sont liés. Entre 0 et 25% en gélatine, la phase gélatine est dispersée et peut-être accommodée au sein de la mésophase contre-plaqué de collagène sans la perturber.

Nous supposons d'ailleurs que la gélatine est insérée au niveau des défauts de la mésophase (voir figure 29). Ce type de comportement a déjà été observé pour des particules de silice incorporée au sein de mésophase de collagène [19]. Au delà de 25%, la phase riche en gélatine devenant continue, elle perturbe fortement la forme et la structure de la phase collagène, empêchant ainsi l'établissement de la structure en contre-plaqué.

L'étude du comportement de l'enthalpie massique de dénaturation du collagène en fonction du ratio de gélatine (voir figure 9), nous permet d'obtenir des informations sur les interactions collagène/gélatine et la répartition du collagène au sein du matériau :

- Pour  $0\% < r_{\text{gélatine}} < 50\%$ , l'enthalpie massique de dénaturation reste constante. Sur cette même plage de concentration, la température de dénaturation du collagène augmente ; c'est à dire que la proportion de collagène fibrillé en interaction avec la gélatine augmente. Par conséquent, comparé aux fibrilles natives de collagène, le collagène fibrillé en interaction avec la gélatine à une température de dénaturation plus élevée mais une enthalpie massique équivalente.
- Pour  $r_{\text{gélatine}} > 50\%$ , on observe une diminution rapide de l'enthalpie massique de dénaturation. Comme nous l'avons expliqué ci-dessus, cette diminution ne peut pas être attribué à une différence d'enthalpie entre une fibrille normale et une fibrille en interaction avec la gélatine. Nous supposons que cette diminution est dûe à une proportion croissante de collagène qui ne forme pas de fibrilles. Lors du calcul de l'enthalpie massique, on fait l'hypothèse que l'ensemble du collagène est sous la forme de fibrilles et on divise l'enthalpie du pic de collagène par la masse en collagène contenue dans la matrice. Or, en augmentant le ratio en gélatine, on augmente également la proportion de collagène solubilisée dans la phase riche en gélatine. Nos observations de la matrice **m50%** montrent que le collagène solubilisé dans la phase gélatine est encore suffisamment concentré pour former des fibrilles. Toutefois, pour **m75%**, on n'observe déjà plus la présence de fibrilles uniques au sein de la matrice de gélatine. Pour les matrices riches en gélatine, on a donc une quantité non-négligeable de collagène qui ne forme pas de fibrilles. Ces molécules de collagène non fibrillés sont celles qui sont dispersées dans la phase gélatine. Cette hypothèse est étayée par le fait que la diminution de l'enthalpie débute à partir de 50%, quand la phase gélatine devient majoritaire et que la proportion de collagène dans la phase gélatine augmente plus rapidement. La proportion de collagène non fibrillé pourrait être estimée en considérant l'enthalpie massique de dénaturation comme constante pour l'ensemble des compositions collagène/gélatine.



En étudiant le pic de dénaturation de la gélatine, on observe un comportement similaire. Pour les matrices composées majoritairement de gélatine, l'enthalpie massique de dénaturation est constante. Par conséquent, une triple hélice de gélatine a la même enthalpie massique de dénaturation, qu'elle soit à l'interface collagène/gélatine ou dans un « bulk » de gélatine.

Cette enthalpie diminue ensuite, pour  $r_{\text{gélatine}} < 50\%$ , car la proportion de gélatine diluée dans la phase collagène est de plus en plus importante. En effet, les chaînes de gélatine dispersées dans la phase collagène peuvent difficilement établir des triples hélices entre elle (dilution + contrainte stérique). Ces chaînes de gélatine ne peuvent pas non plus établir de triple hélice en remplaçant une des chaînes  $\alpha$  d'une molécule de collagène [21]. On a donc une diminution du nombre de triples hélices de gélatine par chaîne de gélatine lorsque le ratio en gélatine diminue.

Enfin, concernant la nature de l'interaction collagène/gélatine, nous n'avons actuellement pas d'hypothèses permettant d'expliquer la température de dénaturation plus élevée des triples hélices de gélatine et des molécules de collagène fibrillé situées à l'interface collagène/gélatine.

## 6 – Conclusions et perspectives.

En fibrillant des mélanges concentrés collagène/gélatine, nous avons obtenu des matériaux hétérogènes (mélange biphasique collagène/gélatine) et structurés à plusieurs niveaux. Nous avons démontré, par une caractérisation multi-échelle (MET, SHG, IRM), que la structure de ces matériaux est comparable à la structure des mélanges observés en microcellule.

L'étude de la dénaturation thermique des matrices collagène/gélatine a mis en évidence un résultat inattendu : l'interaction entre le collagène et la gélatine stabilise la fibrille de collagène. En effet, la température de dénaturation du collagène fibrillé augmente avec le ratio de gélatine. Pour un ratio de 95% en gélatine, la température de dénaturation du collagène fibrillé est de 52°C, soit 6°C de plus que la matrice sans gélatine !!! L'enthalpie massique de dénaturation du collagène n'est toutefois pas affectée par cette interaction collagène/gélatine.

Les matrices étant hétérogènes, elles diffusent fortement la lumière et sont opaques. Elles ne peuvent donc pas être utilisées afin de réaliser un implant cornéen. Ces matériaux structurés, denses et à base de collagène restent toutefois très intéressants afin de reproduire des tissus organisés tels que le tendon ou l'os.

La ségrégation de phase collagène/gélatine offre également de nouvelles opportunités. En effet, après synthèse du matériau biphasé, on peut imaginer le placer dans des conditions physiologiques afin de solubiliser la phase de gélatine et libérer ainsi une porosité au sein du matériau. Ce procédé permettrait d'obtenir des matrices à porosités et géométries variées pouvant faciliter la colonisation de ces matériaux denses par des cellules. Il serait ainsi possible de lever une des limitations des matrices denses à base de collagène [ref thèse

Aurélien]. On peut également envisager d'utiliser l'espace libéré pour y insérer une phase inorganique ou un polymère synthétique, créant ainsi un matériau hybride.

### Bibliographie :

- [1] – RAMIREZ-RODRIGUEZ G.B., IAFISCO M., TAMPIERI A., GOMES-MORALES J., DELGADO-LOPEZ J.M. pH-responsive collagen fibrillogenesis in confined droplets induced by vapour diffusion. *Journal of materials science : Materials in medicine*, 2014, vol 25, p 2305-2312. DOI : 10.1007/s10856-014-5189-1.
- [2] – WESS T.J. Collagen fibrillar structure and hierarchies. In : FRATZL P. (dir.). *Collagen – Structure and Mechanics*. New York : Springer US, 2008, chapitre 3, p. 49-80. ISBN : 978-0-387-73905-2.
- [3] – HODGE A.J., PETRUSKA J.A. Recent studies with the electron microscope on ordered aggregates of the tropocollagen molecule. In : RAMACHANDRA G.N. (dir.). *Aspects of protein chemistry*. London : Academic Press, 1963, p. 289-300.
- [4] – Extracellular structures. In : *Principles of cell biology* (en ligne). Consulté le 30/08/2016. Disponible à l'adresse : [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-17/17\\_15.jpg](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-17/17_15.jpg)
- [5] – HULMES D.J.S., WESS T.J., PROCKOP D.J., FRATZL P. Radial packing, order and disorder in collagen fibrils. *Biophysical journal*, 1995, vol 68, p 1661-1670. DOI : 10.1016/S0006-3495(95)80391-7.
- [6] – BOULIGAND Y., DENEFLÉ J.P., LECHAIRE J.P., MAILLARD M. Twisted architectures in cell-free assembled collagen gels : study of collagen substrates used for cultures. *Biology of the cell*, 1985, vol 54, issue 2, p 143-162. DOI : 10.1111/j.1768-322X.1985.tb00389.x
- [7] – BROWN A.I., KREPLAK L., RUTENBERG A.D. An equilibrium double-twist model for the radial structure of collagen fibrils. *Soft matter*, 2014, vol 10, p 8500-8511. DOI : 10.1039/c4sm01359j.
- [8] – HULMES D.J.S. Building collagen molecules, fibrils and suprafibrillar structures. *Journal of structural biology*, 2002, vol 137, p 2-10. DOI : 10.1006/jsbi.2002.4450.
- [9] – YOSHIOKA J., ITO F., TABE Y. Stability of a double twisted structure in spherical cholesteric droplets. *Soft matter*, 2016, vol 12, issue 8, p 2400-2408. DOI : 10.1039/c5sm02838h.
- [10] – CANTY G.E., MEADOWS R.S., SHAW M.K., HOLMES D.F., KADLER K.E. Coalignment of plasma membrane channels and protrusions (fibripositors) specifies the parallelism of tendon. *Journal of cell biology*, 2004, vol 165, n° 4, p 553-563. DOI : 10.1083/jcb.200312071
- [11] – HULMES D.J.S. Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In : FRATZL P. (dir.). *Collagen – Structure and Mechanics*. New York : Springer US, 2008, chapitre 2, p. 15-47. ISBN : 978-0-387-73905-2.
- [12] – KADLER K.E., HOJIMA Y., PROCKOP D.J. Assembly of collagen fibrils de novo by cleavage of the type I PCCollagen with procollagen C-Proteinase. Assay of critical concentration demonstrates that collagen

self-assembly is a classical example of an entropy-driven process. *Journal of biological chemistry*, 1987, vol 260, n°32, p 15696-15701.

- [13] – COOPER A. Thermodynamic studies of the assembly in vitro of native collagen fibrils. *Biochemical journal*, 1970, vol 118, p 355-365.
- [14] – LEIKIN S., RAU D.C., PARSEGIAN V.A. Temperature-favoured assembly of collagen is driven by hydrophilic not hydrophobic interactions. *Nature structural biology*, 1995, vol 2, issue 3, p 205-210. DOI : 10.1038/nsb0395-205.
- [15] – SHOULDERS M.D., RAINES R.T. Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*, 2009, vol 78, p 929-958. DOI : 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.
- [16] – BESSEAU L., GIRAUD-GUILLE M-M. Stabilization of fluid cholesteric phases of collagen to ordered gellated matrices. *Journal of molecular biology*, 1995, vol 251, issue 11, p 197-202. DOI : 10.1006/jmbi.1995.0426.
- [17] – ORGEL J.P.R.O., IRVING T.C., MILLER A., WESS T.J. Microfibrillar structure of type I collagen *in situ*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2006, vol 103, issue 24, p 9001-9005. DOI : 10.1073/pnas.0502718103.
- [18] – TIDU A. *Synthèse d'une cornée artificielle à base de collagène I. De la conception des matrices à l'intégration des cellules*. Thèse de doctorat : Physique et chimie des matériaux. Paris : UPMC, 2016.
- [19] – MILES C.A., BURJANADZE T.V., BAILEY A.J. The kinetics of the thermal denaturation of collagen in unrestrained rat tail tendon determined by differential scanning calorimetry. *Journal of molecular biology*, 1995, vol 245, p 437-446.
- [21] – WANG A.Y., MO X., CHEN C.S., YU S.M. Facile modification of collagen directed by collagen mimetic peptides. *Journal of the american chemical society*, 2005, vol 127, p 4130-4131. DOI : 10.1021/ja0431915.



## Partie B – Conclusions et perspectives.

Nous avons débuté ce projet en ayant pour but de remplacer partiellement le collagène par de la gélatine dans les phases denses tout en conservant les organisations et, entre autre, la structure en contre-plaqué. Notre objectif initial étant de produire un substitut cornéen, nous souhaitons également que nos matériaux soient transparents après fibrillation du collagène.

Dans le chapitre 2, nous avons présenté un système simple pour permettre l'étude de phase cristalline liquide lyotrope en microscopie optique : la microcellule. Ces microcellules ont été utilisées pour démontrer qu'il est possible de conserver la structure initiale en contre-plaqué alors que 20% du collagène a été substitué par de la gélatine. La persistance de la structure en contre-plaqué a pu être confirmée en microscopie à lumière polarisée et en P-SHG.

L'étude des phases denses collagène/gélatine (chapitre 2) a également permis de mettre en évidence une ségrégation de phase. Pour des ratios de gélatine compris entre 75% et 95%, nous avons observé une phase riche en collagène sous forme de tactoïdes organisées dispersés au sein d'une matrice biréfringente riche en gélatine.

Nous avons également démontré que la gélatine seule, dans certaines conditions physico-chimiques, est capable de former des mésophases. A notre connaissance, ce comportement de la gélatine n'a encore jamais été reporté.

Des mélanges concentrés collagène/gélatine ont ensuite été fibrillés et caractérisés dans le chapitre 3. Nous avons pu étudier leur structure aux échelles micro, méso et macroscopique en corrélant des observations de MET, SHG et IRM. Les matrices denses collagène/gélatine se sont révélées être toutes hétérogènes. En effet, nous avons observé une ségrégation de phase collagène/gélatine observable à toutes les échelles et rappelant par là une structure fractale. La ségrégation de phase apporte par conséquent un niveau de structuration supplémentaire à nos matériaux. Concernant le collagène, nous avons démontré, pour chaque mélange collagène/gélatine, que les fibrilles sont alignées au sein de domaines de taille micrométrique. L'organisation de la gélatine n'a, quant à elle, pas pu être mise en évidence.

La dénaturation des triples hélices au sein des matériaux collagène/gélatine a également été étudiée par DSC. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une interaction spécifique entre le collagène fibrillé et la gélatine qui a tendance à augmenter la température de dénaturation de ces deux molécules. Par conséquent, plus on augmente le ratio en gélatine dans nos matériaux et plus les fibrilles de collagène sont thermiquement stables ! Là encore, à notre connaissance, ce type d'interaction n'a jamais été rapporté dans la littérature.

Finalement, le seul point noir concerne les propriétés optiques de nos matériaux. Etant hétérogène, les matrices collagène/gélatine présentent toutes un certain degré d'opacité qui ne permet pas de les utiliser comme telle en tant que substitut cornéen.

Toutefois, de tels matériaux denses et à la structure très hiérarchisée sont extrêmement intéressants pour reproduire d'autres tissus organisés tel que l'os, le tendon, le derme, etc. Une étude rhéologique poussée des mélanges denses

collagène/gélatine avant et après fibrillogenèse serait nécessaire pour compléter la caractérisation de ces matériaux. Ce type d'étude pourrait nous apporter des informations complémentaires quant à l'organisation d'une phase par rapport à l'autre ainsi que sur leur coté fractal.

Enfin, dans certaines conditions, nous pouvons envisager de solubiliser la gélatine afin de libérer une porosité de taille micrométrique ; c'est à dire adapter le matériau pour une colonisation cellulaire. Dans ce cadre là, j'aurai également souhaité caractériser, *in vitro*, l'interaction cellules/matériaux en fonction du ratio de gélatine.

D'autres perspectives sont envisageables comme, par exemple, le remplacement ou le dopage de la gélatine par une phase inorganique. Il a été montré par exemple que le vanadium interagit de manière différente avec la gélatine qu'avec le collagène [1]. Notons qu'outre la possibilité de former des matériaux hybrides, la production de tels matériaux comprenant une proportion non-négligeable de gélatine, abaisserait le coup de production.

### **Bibliographie :**

- [1] – CARN F., DJABOUROV M., CORADIN T., LIVAGE J., STEUNOU N. Influence of decavanadate clusters on the rheological properties of gelatin. *Journal of physical chemistry B*, 2008, vol 112, p 12596-12605. DOI : 10.1021/jp802146g.



## **Partie C :**

Gel rifamycine/collagène –  
De la conjugaison d'un antibiotique  
aux gels sensibles au pH.



## Partie C - Introduction.

« On voyage pour changer, non de lieu, mais d'idée. » *H. Taine*

Depuis plusieurs années maintenant, notre équipe a établi de profonds liens avec Martin Desimone et son équipe de Buenos Aires. Ces liens se sont renforcés au cours des différentes collaborations et échanges d'étudiants et de permanents. Les travaux qui ont été menés en commun concernent des domaines d'expertises partagées par nos deux laboratoires : le collagène et la silice.

Les premiers projets ont eu pour but la synthèse et la caractérisation de **matrice hybride collagène/silice** [1,2]. Ces matrices ont été utilisées pour encapsuler avec succès des fibroblastes [3-5].

Parallèlement, une thématique **nanoparticule de silice** a commencé à se développer. Initialement, ces particules étaient utilisées comme vecteurs pour transporter, protéger et libérer des antibiotiques de manière contrôlée [6]. Toutefois, l'étude de leur toxicité, en tant que nanoparticule, a également été au cœur d'une collaboration [7].

Récemment, une troisième thématique est apparue : **les matériaux adaptés au traitement des plaies chroniques**. Alvarez et *al.* ont combiné les deux premières thématiques en insérant des nanoparticules de silice, chargées en antibiotique, dans une matrice de collagène. Ils ont pu obtenir, *in vitro*, une libération contrôlée de la gentamycine sur une semaine [8].

Depuis, Gervaise Mosser et Carole Aimée ont pris le relais et ont proposé d'étudier l'impact de l'organisation du collagène sur le profil de libération de l'antibiotique. De plus, Gervaise a souhaité introduire une autre nouveauté en utilisant des fils de collagène dense qui pourront être tissés par la suite. Ces fils, dans un second temps, seront couplés à des nanoparticules de silice modifiées en surface [6] afin d'améliorer les propriétés de relargage et de chargement en antibiotique.

C'est dans ce contexte que j'ai intégré la collaboration France/Argentine. Dans le cadre d'un partenariat (financé par ECOS), j'ai pu partir pendant 1 mois à Buenos Aires pour travailler sur des fils denses de collagène et de collagène/gélatine. Au cours de ce séjour, j'ai cherché à déterminer les capacités maximales d'adsorption de différents antibiotiques (rifamycine et gentamycine) par des fils de collagène et de collagène/gélatine. Nos résultats préliminaires étant intrigant (et intéressant), j'ai poursuivi mes expériences en France, où nous avons mis en évidence une nouvelle réaction de conjugaison de la rifamycine sur le collagène. C'est à partir de ce résultat inattendu que nous avons décidé d'étudier les gels de collagène conjugué rifamycine.

Au cours du prochain chapitre, je décrirai le phénomène de cicatrisation ainsi que les mécanismes qui mènent à la plaie chronique. Nous définirons également la matrice idéale pour refermer une plaie chronique.

Le second chapitre est dédié à la synthèse et à la caractérisation (structurale, rhéologique, biologique...) des gels de collagène conjugué rifamycine.

Enfin, dans le troisième chapitre, nous avons essayé d'obtenir des informations sur la structure fine des gels en étudiant un système dilué de particules de collagène conjugué.

### **Bibliographie :**

- [1] – QUIGNARD S., COPELLO G.J., AIME C., BATAILLE I., HELARY C., DESIMONE M.F., CORADIN T. Influence of silification on the structural and biological properties of buffer-mediated collagen hydrogel. *Advanced biomaterials*, 2012, vol 15, n°3, p B51-B55. DOI : 10.1002/adem.201180063.
- [2] – HEINEMANN S., CORADIN T., DESIMONE M.F. Bio-inspired silica-collagen materials : applications and perspectives in the medical field. *Biomaterials science*, 2013, vol 1, p 688-702. DOI : 10.1039/c3bm00014a.
- [3] – DESIMONE M.F., HELARY C., MOSSER G., GIRAUD-GUILLE M.-M., LIVAGE J., CORADIN T. Fibroblast encapsulation in hybrid silica-collagen. *Journal of materials chemistry*, 2010, vol 20, p 666-668. DOI : 10.1039/b921572g.
- [4] – DESIMONE M.F., HELARY C., RIETVELD I.B., BATAILLE I., MOSSER G., GIRAUD-GUILLE M.-M., LIVAGE J., CORADIN T. Silica-collagen bionanocomposites as three-dimensional scaffolds for fibroblast immobilization. *Acta biomaterialia*, 2010, vol 6, p 3998-4004. DOI : 10.1039/b921572g.
- [5] – DESIMONE M.F., HELARY C., QUIGNARD S., RIETVELD I.B., BATAILLE I., COPELLO G.J., MOSSER G., GIRAUD-GUILLE M.-M., LIVAGE G., MEDDAHI-PELLE A., CORADIN B. In vitro studies and preliminary in vivo evaluation of silicified concentrated collagen hydrogels. *Applied and material interfaces*, 2011, vol 3, p 3831-3838. DOI : 10.102/am2000984.
- [6] – MEBERT A.M., AIME C., ALVAREZ G.S., SHI Y., FLOR S.A., LUCANGIOLI S.E., DESIMONE M.F., CORADIN T. Silica core-shell particles for the dual delivery of gentamycin and rifamycine antibiotics. *Journal of materials chemistry B*, 2016, vol 4, p 3135-3144. DOI : 10.1039/c6tb00281a.
- [7] – GONZALEZ C.G., ALVAREZ G.S., CAMPOROTONDI D.E., FOGLIA M.L., AIME C., DIAZ L.E., CORADIN T., DESIMONE M.F. Preliminary evaluation of median lethal concentrations of Stöber silica particles with various sizes and surface functionalities towards fibroblast cells. *Silicon*, 2014, p 1-6. DOI : 10.1007/s12633-014-9203-5.
- [8] – ALVAREZ G.S., HELARY C., MEBERT A.M., WANG X., CORADIN T., DESIMONE M.F. Antibiotic-loaded silica nanoparticle-collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. *Journal of materials chemistry B*, 2014, vol 2, p 4660-4670. DOI : 10.1039/c4tb00327f.

## Partie C – Chapitre 1 : Les matériaux adaptés au traitement des plaies cutanées chroniques.

I – Les plaies cutanées chroniques : un phénomène complexe et un enjeu sociétal.

1 – Généralités sur les plaies chroniques.

Par définition, une plaie chronique est une plaie cutanée dont le délai de cicatrisation est allongé. Selon la Haute Autorité de Santé française, une plaie est considérée comme chronique si elle ne cicatrice pas après 4 à 6 semaines d'évolution [1]. En pratique, on distingue un grand nombre de plaies chroniques :

- les ulcères de la jambe (veineux, artériel ou mixte).
- les escarres ou ulcères de pression
- les plaies ou ulcères du diabétique
- les moignons d'amputation
- certains cancers de la peau
- etc.

L'étiologie des plaies chroniques est assez variée mais la majorité d'entre elles (70%) sont d'origine ischémique ; ischémie consécutive à un diabète sucré, une stase veineuse ou encore à la pression (escarre) [2].

En plus d'être terriblement douloureuse [3] et de restreindre les mouvements du patient, les plaies chroniques entraînent de sérieuses complications si elles ne sont pas traitées. Elles peuvent ainsi mener rapidement à la gangrène (ischémique ou infectieuse) puis à l'amputation [4] voir même à des septicémies mortelles.

Les traitements actuels pour les plaies chroniques dépendent avant tout de l'étiologie de la plaie. Toutefois, ils nécessitent tous un débridement (chimique, mécanique, enzymatique ou même par des larves !) de la plaie ainsi que l'application d'un pansement afin de :

- couvrir la plaie pour limiter les infections bactériennes ou fongiques.
- maintenir un certain degré d'humidité tout en absorbant les potentiels exsudats.
- contribuer à l'établissement de l'hémostase.

Dans tous les cas, ces traitements sont longs (quelques mois à plusieurs années !), coûteux et doivent être adaptés à chaque patient sous peine de récurrence.

Enfin, je conclurai par quelques chiffres afin de souligner l'enjeu sociétal majeur que représentent aujourd'hui les plaies chroniques :

- **7 millions.** C'est le nombre de patients atteints de plaies chroniques aux Etats-Unis [4].
- **8 milliards de dollars.** C'est le coût, par an, des soins qu'occasionnent ces plaies chroniques aux USA [4].
- **10 000.** C'est le nombre de diabétiques amputés par an en France suite à une plaie chronique qui n'a pu être soignée. La fédération Française des

diabétiques estime d'ailleurs que **10%** des diabétiques encourent un risque d'amputation [5].

## 2 – La cicatrisation, un processus physiologique complexe [6].

Avant de discuter des processus biologiques qui conduisent à la survenue d'une plaie chronique, nous allons décrire la réponse naturelle de l'organisme face à une plaie cutanée : la cicatrisation.

La cicatrisation est un processus en trois phases :

- **La phase inflammatoire.**
- **La phase de formation du nouveau tissu.**
- **La phase de remodelage du tissu.**

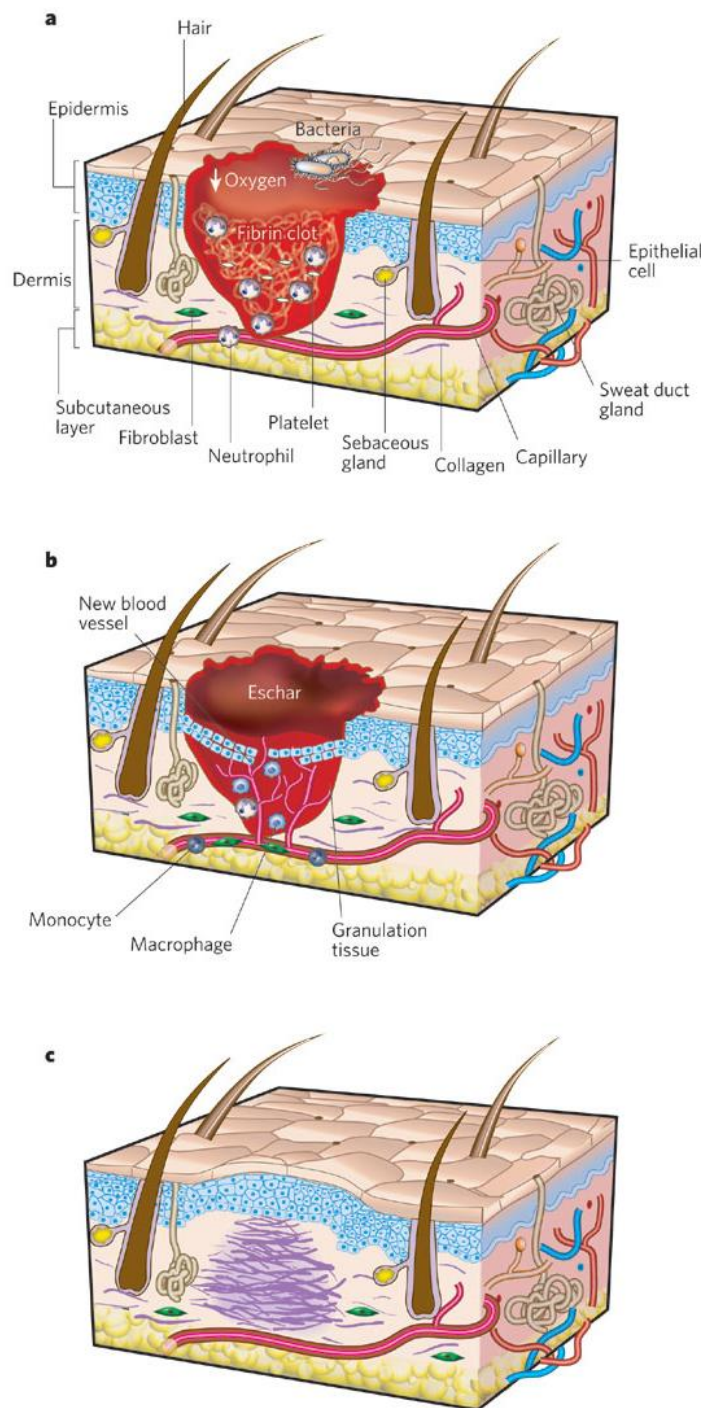
### a – Phase inflammatoire.

Cette phase débute immédiatement après l'apparition de la blessure par l'hémostase. Les plaquettes s'agrègent au niveau des parois lésées des capillaires pour former un premier caillot ou clou plaquettaire. Ce caillot est ensuite renforcé par l'activation du fibrinogène en fibrine et la formation d'une matrice de fibrine qui comble partiellement la blessure (voir figure 1-a). Ce processus est plus communément appelé la coagulation. Au sein du caillot, les plaquettes et les neutrophiles piégés sécrètent divers facteurs pour attirer les cellules de l'inflammation sur le site de la blessure [7]. Les produits de dégradation des bactéries présentes dans le lit de la blessure sont également des chémoattractants des cellules de l'inflammation [6].

Les premières cellules de l'inflammation à arriver au niveau de la blessure sont les neutrophiles. En profitant du flux sanguin, ils atteignent le caillot où ils sont activés par des signaux chimiques inflammatoires. Les neutrophiles traversent ensuite la paroi endothéliale (diapédèse) avant de s'infiltrer à travers le caillot. En quelques heures, on les retrouve dans le lit de la plaie où ils débutent le débridement des tissus dévitalisés ainsi que la phagocytose des bactéries. Pour accomplir ces tâches, les neutrophiles libèrent de grandes quantités d'agents antibiotiques (éicosanoïdes, R.O.S, peptides cationiques, etc.) ainsi que des protéases. Dans les conditions physiologiques, les neutrophiles ne sont plus présents dans la plaie 72 heures après le début de la phase inflammatoire.

Après deux jours, les monocytes commencent à coloniser le caillot. Au cours de la diapédèse, ils se différencient alors en macrophages matures. Leur fonction est de terminer le débridement et de nettoyer la plaie des débris de bactéries et de neutrophiles. Les macrophages ont également un rôle dans la formation du nouveau tissu puisqu'ils sécrètent de nombreux facteurs de croissance qui promeuvent la prolifération cellulaire et la synthèse d'une nouvelle matrice extracellulaire.

Les mécanismes induisant la résolution de l'inflammation *in vivo* ne sont pas encore très bien compris. Une des hypothèses les plus crédibles est lié au phénotype des macrophages.



**Figure 1 :** Les 3 phases de la cicatrisation cutanée : la phase inflammatoire (a), la phase de formation du nouveau tissu (b) et la phase de remodelage (c). En a, la phase inflammatoire 24h après la blessure. Cette phase débute immédiatement après l'apparition de la blessure et dure environ 48h. La plaie est alors un milieu hypoxique dans lequel s'est formé un caillot de fibrine et de plaquettes. Les neutrophiles migrent vers le lit de la plaie pour phagocyter les bactéries et ôter les tissus dévitalisés. En b, la phase de formation du nouveau tissu entre 5 et 10 jours après la blessure. Une croûte s'est formée à la surface de la blessure et de nouveaux vaisseaux sanguins ont bourgeonné dans le tissu de granulation. On observe également la migration de cellules épithéliales sous la croûte. En c, la phase de remodelage entre 1 mois et 1 an après la survenue de la blessure. Les fibroblastes du tissu de granulation ont progressivement remplacé la fibrine par une matrice désorganisée de collagène. Une partie de ces fibroblastes s'est différencié en myofibroblastes et a induit la contraction du tissu cicatriciel en surface. On note un renflement de l'épithélium au niveau de la cicatrice [6].

Il a été démontré *in vitro* qu'un macrophage de phénotype « pro-inflammatoire » voit son phénotype changer lorsqu'il phagocyte des neutrophiles apoptotiques. Il devient alors un macrophage présentant un phénotype « anti-inflammatoire ». Ce changement de phénotype pourrait être à l'origine de la résolution de l'inflammation *in vivo* [8].

#### b – Phase de formation du nouveau tissu.

Cette phase débute deux jours après la survenue de la blessure et dure environ une semaine. Elle est tout d'abord caractérisée par des phases de migration et de prolifération cellulaire :

- Les macrophages sécrètent des facteurs de croissance qui favorisent l'angiogenèse (ex : VEGF, PDGF). On observe alors un bourgeonnement de nouveaux capillaires sanguins à travers le caillot. La progression des capillaires est facilitée par l'activité fibrinolytique de cellules endothéliales. De manière concomitante, les fibroblastes synthétisent une nouvelle matrice riche en collagène de type III et désorganisée. Ce phénomène de remodelage et de vascularisation du caillot est appelé « la granulation ».
- Les kératinocytes, en bordure de la plaie, migrent sous la croûte (la partie séchée et superficielle du caillot) en utilisant le nouveau tissu de granulation comme substrat. Ces cellules, en se rejoignant au centre de la plaie, forment alors le nouvel épithélium. C'est l'épithélialisation. Au cours de cette étape, on observe le rétablissement de la jonction dermo-épidermique (membrane basale).

Dans un second temps, on observe une rétraction de la partie supérieure de la plaie induite, en grande partie, par la contraction des myofibroblastes. Les myofibroblastes sont des fibroblastes différenciés sous l'action des macrophages.

#### c – Phase de remodelage.

Cette phase commence environ un mois après la survenue de la blessure et dure au moins un an. Elle débute tout d'abord par une phase de régulation où tous les processus engagés au cours de la cicatrisation sont progressivement arrêtés. Les myoblastes, macrophages et cellules endothéliales entrent alors en apoptose, ou quittent le nouveau tissu. Le tissu cicatriciel mature est donc quasiment acellulaire et peu vascularisé.

Dans un second temps, on observe un remplacement progressif du collagène III par le collagène de type I. Au cours de ce processus, les fibroblastes opèrent également une réorganisation de la matrice, puisqu'on constate que les nouvelles fibrilles de collagène sont orientées selon des directions privilégiées [9].

Toutefois, le tissu cicatriciel, même mature, ne récupère jamais les propriétés mécaniques, fonctionnelles ou esthétiques du tissu initial.

### 3 – Quand l'inflammation perdure... : description de la plaie chronique [2].

Les plaies chroniques sont des plaies dont le processus de cicatrisation reste bloqué à la phase inflammatoire. En effet, dans le lit de la blessure, on observe une persistance des neutrophiles bien au-delà de 72h. L'inflammation s'installe quand un stimulus provoque un recrutement excessif et continu de neutrophiles. Ces stimuli sont assez variés :

- hypoxie consécutive à une ischémie
- infection bactérienne
- présence d'un corps étranger
- pression hydrostatique excessive consécutive à un trouble veineux
- etc.

Comme expliqué ci-dessus, les neutrophiles retirent les tissus dévitalisés en sécrétant des protéases. La présence de neutrophiles en excès induit donc une augmentation importante de la concentration en protéases dans la plaie. Cet excès mène alors à un déséquilibre de la balance dégradation/synthèse de la matrice extracellulaire qui a deux répercussions majeures :

- Au lieu de se refermer, la plaie a tendance à s'agrandir et à se creuser (formation d'un ulcère).
- La dégradation des protéines structurales de la matrice génère de facteurs chemoattractants qui vont attirer de nouveaux neutrophiles et entretenir ainsi la phase inflammatoire.

La sécrétion soutenue de cytokines inflammatoires par les neutrophiles contribue également au maintien de l'inflammation. L'inflammation chronique est donc un mécanisme auto-entretenu, une spirale infernale...

En plus d'une altération du profil inflammatoire, on observe également un retard de la phase de formation du nouveau tissu pour deux raisons :

- Les facteurs de croissance qui promeuvent la prolifération cellulaire ou la synthèse de la matrice extracellulaire (ex : VEGF, PDGF, etc.) sont également clivés par les protéases en excès.
- Comparés aux fibroblastes normaux, les fibroblastes des plaies chroniques ont des capacités altérées. Ils migrent moins facilement et sont moins sensibles aux facteurs de croissance.

En gardant ses considérations à l'esprit, nous pouvons maintenant réfléchir à la synthèse d'un matériau adapté à la guérison des plaies chroniques.

## II – Les matériaux adaptés au traitement des plaies chroniques.

### 1 – Les différentes classes de pansements.

Actuellement, on distingue quatre classes de pansements :

- **Les hydrocolloïdes.** Ce sont des films d'élastomères (semi-perméables ou imperméables) dans lesquels sont insérés des particules de polymères

hydrophiles (carboxymethylcellulose le plus souvent). Appliqués sur une plaie suintante, les particules hydrophiles absorbent l'exsudat en gonflant. Le pansement maintient ainsi un niveau adéquat d'humidité dans la plaie. Toutefois, ils ne doivent surtout pas être utilisés sur une plaie infectée.

- **Les hydrogels.** Ce sont des gels synthétiques (polyméthacrylate) ou naturels (alginate, collagène) qui comprennent plus de 70% d'eau. Ces matériaux favorisent le débridement de la plaie, absorbent les exsudats et maintiennent un bon niveau d'humidité. Ils ont toutefois des propriétés mécaniques plutôt faibles et nécessitent l'utilisation d'un second pansement pour les couvrir.
- **Les films.** Ce sont des matériaux en polyuréthane, facilement manipulables et adaptables. Ils sont perméables à l'air, mais pas à l'eau, ni aux bactéries. Ce sont donc de bons moyens de protection pour des plaies saines mais ils ne peuvent pas être appliqués sur une plaie infectée. Enfin, ils maintiennent l'humidité, mais n'ont pas de pouvoir absorbant.
- **Les hydrocellulaires.** Ce sont des mousses de polyuréthane avec un fort pouvoir absorbant et qui maintiennent toutefois un bon niveau d'humidité. De plus, elles sont imperméables aux bactéries tout en permettant les échanges gazeux. Enfin, les hydrocellulaires n'entraînent pas d'adhérences donc ils peuvent être facilement retirés.

## 2 – Définition du matériau idéal : vers la synthèse d'un matériau « bioactif ».

Selon Helary et *al.* [10], le matériau idéal pour couvrir une plaie chronique doit présenter les propriétés suivantes :

- **maintenir un environnement humide** dans la plaie. En séchant, un tissu se nécrose.
- **absorber les exsudats.** Si la plaie macère, on augmente la probabilité d'une infection bactérienne. De plus, les exsudats contiennent souvent des toxines et débris d'origine bactérienne qui sont des facteurs pro-inflammatoires.
- **protéger des infections.** On évite ainsi de graves complications comme la gangrène.
- **être biocompatible.** On cherche à éviter ici toute source d'inflammation additionnelle.
- **favoriser la cicatrisation.** Dans le cas des plaies chroniques, on peut soit essayé d'induire la résolution de l'inflammation, soit promouvoir la synthèse du tissu de granulation.

Pour favoriser la cicatrisation ou réduire les infections, ce matériau ne peut toutefois pas se contenter d'être seulement biocompatible. Il doit interagir avec son environnement et modifier un ou des paramètres d'intérêts pour avancer dans le processus de cicatrisation [11]. C'est vers ces matériaux « acteurs », ces matériaux « bioactifs », que s'orientent les recherches depuis quelques années.

Afin de réaliser des matériaux bioactifs pour les plaies chroniques, de nombreuses stratégies sont envisageables dont les deux principales sont :



- La synthèse de matériaux qui favorisent la transition vers la phase de synthèse du nouveau tissu.
- La synthèse de matériaux qui réduisent l'inflammation. C'est cette seconde stratégie qui va nous intéresser ici.

### 3 – Les matériaux qui réduisent l'inflammation.

La stratégie, pour induire la cicatrisation d'une plaie chronique est de réduire ou de résoudre la phase inflammatoire.

L'inflammation peut-être réduite en diminuant la concentration en facteurs pro-inflammatoires présents dans le lit de la plaie tel que :

- **Les bactéries.** De nombreuses équipes ont synthétisé des gels libérant des antibiotiques de manière plus ou moins contrôlée [12, 13]. Le but premier est de réduire la quantité de bactéries dans la plaie, mais également de prévenir une future infection et ses complications. C'est aussi de réduire l'inflammation en diminuant la quantité d'antigènes générée par les bactéries.
- **Les protéases.** Cullen *et al.* [14] ont synthétisé des matrices à base de collagène et de cellulose oxydée régénérée (ORC) afin d'inactiver certaines protéases. Le collagène est un substrat des métalloprotéases présentes dans le lit de la blessure (MMP-8). Ces enzymes vont donc migrer dans la matrice et commencer à cliver le collagène. Toutefois, les auteurs ont montré que l'ORC, un polyanion, chélate les ions métalliques des métalloprotéases et ainsi, les inactive.
- **Les cytokines pro-inflammatoires.** La neurotensine est un petit neuropeptide qui, au niveau d'une plaie, interagit avec les cellules immunitaires pour moduler la réponse inflammatoire [15]. Ce neuropeptide induit, entre autre, la sécrétion de cytokines qui vont réduire la transcription d'une autre cytokine, TNF- $\alpha$ , responsable du recrutement des neutrophiles. On agit donc ici à la base de la réponse inflammatoire. Moura *et al.* [16] ont démontré l'efficacité modérée de la neurotensine en testant l'effet de gels de collagène chargé en neurotensine sur un modèle animal de blessure (souris diabétique).
- Etc.

Certains groupes ont utilisé des molécules qui permettent d'agir sur plusieurs de ces facteurs en même temps. C'est le cas, par exemple, de Anumolu *et al.* qui ont chargé une matrice avec de la doxycycline, un antibiotique inhibiteur de métalloprotéases et d'une enzyme responsable de la maturation de TNF- $\alpha$  [17].

### 4 – Concept de notre projet.

Compte tenu de l'historique de la collaboration avec l'équipe de M. Desimone et de mes connaissances acquises sur le collagène et la gélatine, nous avons synthétisé un hydrogel dense de collagène conjugué rifamycine.

Les matériaux à base de collagène de type I sont très souvent utilisés pour traiter les plaies chroniques [12] car ils sont biocompatibles, biodégradables, hémostatiques et ils favorisent la cicatrisation par leur structure fibrillaire. Cette structure fibrillaire favorise d'ailleurs la migration des fibroblastes et des kératinocytes.

Nous avons choisi de préparer des hydrogels, car ils permettent de maintenir la plaie hydratée, mais également d'absorber les exsudats. De plus, ils favorisent un débridement naturel de la blessure [18].

Nous avons porté notre choix sur la rifamycine SV car c'est tout d'abord un antibiotique efficace contre *S. Aureus*, une des bactéries souvent observée au niveau des plaies chroniques [19]. De plus, il a été démontré que la rifamycine SV est un inhibiteur d'une metalloprotéase : une collagénase bactérienne [20]. On peut donc supposer que la rifamycine peut également inhiber d'autres metalloprotéases comme MMP-8. Enfin, la rifamycine SV présente également des propriétés anti-inflammatoires, puisqu'elle inhibe les fonctions du neutrophile humain [21].

Considérant l'ensemble de ces propriétés ainsi que la problématique générale, les gels de collagène conjugués rifamycine semblent donc être des systèmes prometteurs afin d'induire la résolution de la phase inflammatoire d'une plaie chronique.

## **Bibliographie :**

- [1] – Les pansements, indications et utilisations recommandées. In : *Haute Autorité de Santé* (en ligne). Consulté le 08/09/2016. Disponible à l'adresse : [http://www.has-sante.fr/portail/jcms/r\\_1438004/fr/les-pansements-indications-et-utilisations-recommandees-fiche-but](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/r_1438004/fr/les-pansements-indications-et-utilisations-recommandees-fiche-but)
- [2] – MENKE N.B., WARD K.R., WITTEN T.M., BONCHEV D.G., DIEGELMANN R.F. Impaired wound healing. *Clinics in dermatology*, 2007, vol 25, p 19-25. DOI : 10.1016/j.clindermatol.2006.12.005.
- [3] – FAIVRE B. Prise en charge des plaies chroniques. In : *Centre de traitement ambulatoire des plaies chroniques – CHU de Besançon* (en ligne). Consulté le 08/09/2016. Disponible à l'adresse : [https://www.chu-besancon.fr/geriatrie/5et6mai/2011\\_PlaiesChroniques\\_CapaciteGeriatrie\\_Besancon.pdf](https://www.chu-besancon.fr/geriatrie/5et6mai/2011_PlaiesChroniques_CapaciteGeriatrie_Besancon.pdf)
- [4] – ALVAREZ G.S., HELARY C., MEBERT A.M., WANG X., CORADIN T., DESIMONE M.F. Antibiotic-loaded silica nanoparticle-collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. *Journal of materials chemistry B*, 2014, vol 2, p 4660-4670. DOI : 10.1039/c4tb00327f.
- [5] – Le pied diabétique et ses affections. In : *Fédération Française des Diabétiques* (en ligne). Consulté le 08/09/2016. Disponible à l'adresse : <http://www.afd.asso.fr/diabete/complications/pieds>

- [6] – GURTNER G.C., WERNER S., BARRANDON Y., LONGAKER M.T., Wound repair and regeneration. *Journal of investigative dermatology*, 2007, vol 127, p 514-525. DOI : 10.1038/sj.jid.5700701.
- [7] – EMING S.A., KRIEG T., DAVIDSON J.M. Inflammation in wound repair : molecular and cellular mechanism. *Nature*, 2008, vol 435, p 314-321. DOI : 10.1038/nature07039.
- [8] – KOHL T.J., DI PIETRO L.A. Inflammation and wound healing : the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, 2013, vol 13. DOI : 10.1017/S1462399411001943.
- [9] – DEMARCHEZ M. La phase de prolifération et de réparation de la cicatrisation cutanée. In : *Biologie de la peau* (en ligne). Mise en ligne le 29/09/2015. Consulté le 08/09/2016. Disponible à l'adresse : <http://biologiedelapeau.fr/spip.php?article80>
- [10] – HELARY C., DESIMONE M.F. Recent advances in biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2015, vol 16, n° 7, p 1-11. DOI : 10.2174/138920101607150427112208.
- [11] – OVINGTON L.G. Advances in wound dressings. *Clinics in dermatology*, 2007, vol 25, p33-38. DOI : 10.1016/j.clindermatol.2006.09.003.
- [12] – ALVAREZ G.S., HELARY C., MEBERT A.M., WANG X., CORADIN T., DESIMONE M.F. Antibiotic-loaded silica nanoparticle-collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. *Journal of materials chemistry B*, 2014, vol 2, p 4660-4670. DOI : 10.1039/c4tb00327f.
- [13] – MENG X., TIAN F., YANG J., HE C.N., XING N., LI F. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *Journal of materials science : Materials in medicine*, 2010, vol 21, p 1751-1759. DOI : 10.1007/s10856-010-3996-6.
- [14] – CULLEN B., WATT P.W., LUNDQVIST C., SILCOCK D., SCHMIDT R.J., BOGAN D., LIGHT N.D. The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 2002, vol 32, p 1544-1556.
- [15] – MOURA L.I.F., DIAS A.M.A., ERMELINDO C.L., CARVALHO L., DE SOUSA H.C., CARVALHO E. Chitosan-based dressings loaded with neurotensin – an efficient strategy to improve early diabetic wound healing. *Acta biomaterialia*, 2014, vol 10, p 843-857. DOI : 10.1016/j.actbio.2013.09.040.
- [16] – MOURA L.I.F., DIAS A.M.A., SUESCA E., CASADIEGOS S., LEAL C.L., FONTANILLA M.R., CARVALHO L., DE SOUSA H.C., CARVALHO E. Neurotensin-loaded collagen dressings reduce inflammation and improve wound healing in diabetic mice. *Biochimica et biophysica acta*, 2014, vol 1842, p 32-43. DOI : 10.1016/j.bbadis.2013.10.009.
- [17] – ANUMOLU S.S., MENJOGE A.R., DESHMUKH M., GERECKE D., STEIN S., LASKIN J., SINKO P.J. Doxocycline hydrogels with reversible disulfide crosslinks for dermal wound healing of mustard injuries. *Biomaterials*, 2011, vol 32, p 1204-1217. DOI : 10.1016/j.biomaterials.2010.08.117.

- [18] – BRETT D. A review of collagen and collagen-based wound dressing. *Wounds* (en ligne). Consulté le 08/02/2016. Disponible à l'adresse : <http://www.woundsresearch.com/content/a-review-collagen-and-collagen-based-wound-dressings>
- [19] – PERCIVAL S.L., HILL K.E., WILLIAMS D.W., HOOPER S.J., THOMAS D.W., COSTERTON J.W. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound repair and regeneration*, 2012, vol 20, issue 5, p 547-557. DOI : 10.1111/j.1524-475X.2012.00836.x
- [20] – DI GIULIO A., BARRACCHINI A., CELLAI L., MARTUCCIO C., AMICOSANTE G., ORATORE A., PANTALEONI G.C. Rifamycins as inhibitors of collagenase activity : their possible pharmacological role in collagen degradative diseases. *International journal of pharmaceutics*, 1996, vol 144, issue 5, p 27-35.
- [21] – SPISANI S., TRANIELLO S., MOCHI ONORI A., RIZZUTI O., MARTUCCIO C., CELLAI L. 3-(carboxyalkylthio)-rifamycin S and SV derivatives inhibit human neutrophil functions. *Inflammation*, 1998, vol 22, issue 5, p 459-469.



## Partie III – Chapitre 2 : Etude des gels de collagène conjugué rifamycine.

### I – Préparation des gels de collagène conjugué rifamycine.

#### 1 – Description des deux protocoles de préparation.

La conjugaison de la rifamycine sur le collagène s'effectue de manière simple en soumettant un mélange des deux composés à des vapeurs d'ammoniac. La montée de pH provoquée par la solubilisation de l'ammoniac induit simultanément la fibrillogenèse du collagène. Nous avons donc élaboré deux protocoles de préparation :

- **La fibrillogenèse et la conjugaison ont lieu simultanément.** La rifamycine est préalablement solubilisée dans une solution acide de collagène (acide acétique 500 mM). Cette solution est ensuite mise sous vapeur d'ammoniac. Les gels préparés avec ce protocole sont appelés **gels FeC** (Fibrillation et Conjugaison).
- **La fibrillogenèse et la conjugaison sont deux réactions distinctes.** La solution acide de collagène (acide acétique 500 mM) est tout d'abord mise sous vapeur d'ammoniac pour former des hydrogels. Ces gels sont lavés pour ôter l'ammoniaque puis on les laisse à imbiber pendant une nuit dans une solution de rifamycine. L'ensemble est enfin mis sous vapeur d'ammoniac afin d'induire la conjugaison de la rifamycine sur le collagène. Les gels préparés avec ce protocole sont appelés **gels FpC** (Fibrillation puis Conjugaison).

Les protocoles détaillés pour la préparation des gels **FeC** et **FpC** sont indiqués en annexe.

#### 2 – Liste des conditions étudiées.

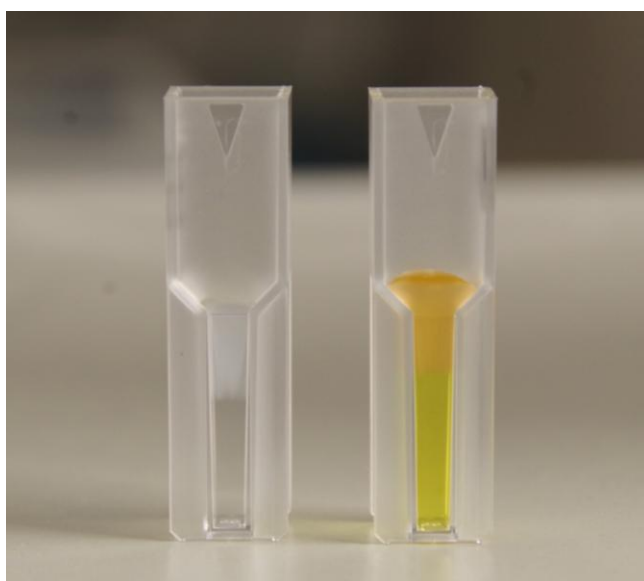
Condition	Protocole	C <sub>collagène</sub> (mg/mL)	C <sub>rifamycine</sub> (mg/mL)	Ratio rifamycine/collagène	Solvant de lavage
<b>FpC 1</b>	FpC	10	1	0,1	PBS 1X
<b>FpC 2</b>	FpC	10	1	0,1	H <sub>2</sub> O
<b>FpC 3</b>	FpC	100	10	0,1	PBS 1X
<b>FeC 1</b>	FeC	10	1	0,1	PBS 1X
<b>FeC 2</b>	FeC	10	1	0,1	H <sub>2</sub> O
<b>FeC 3</b>	FeC	100	10	0,1	PBS 1X

**Tableau 1 : Liste des conditions étudiées.**

En plus des deux protocoles décrits ci-dessus, nous avons également étudié l'effet de la concentration en collagène et du solvant de lavage sur les propriétés de ces gels. La liste des conditions étudiées est indiquée dans le tableau 1.

### 3 – Aspect visuel des gels.

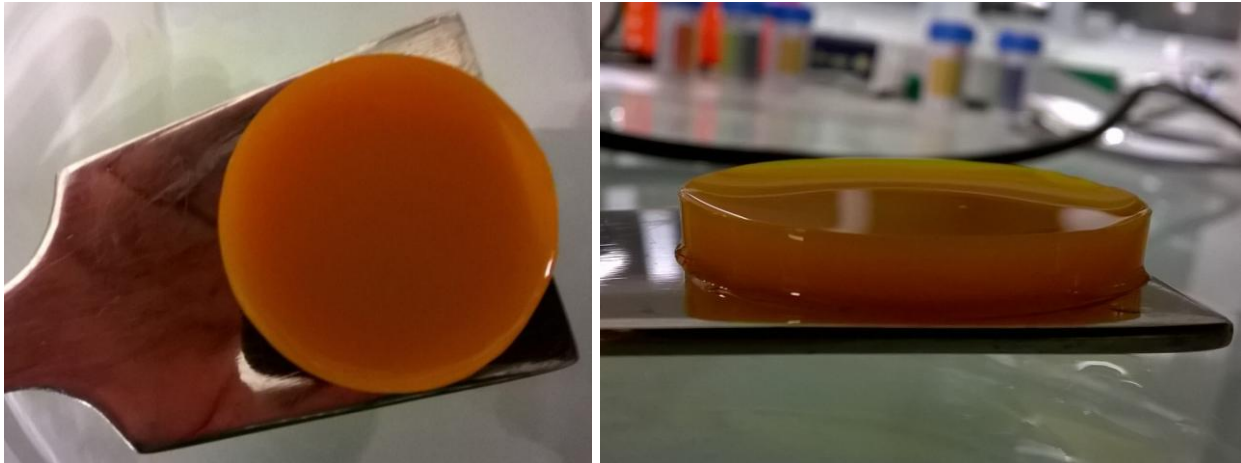
Au cours de la préparation des gels **FeC** (**FeC 1**, **FeC 2** et **FeC 3**), la rifamycine est ajoutée à la solution acide de collagène qui prend alors une couleur jaune. Après avoir mis la solution sous vapeur d'ammoniac, on observe rapidement un changement de couleur : la solution prend alors une teinte orangée (voir figure 1). De plus, elle devient petit à petit turbide à cause de la formation de grosses fibrilles de collagène.



*Figure 1: Préparation de gels de collagène conjugués rifamycine par le protocole FeC. A droite, une solution FeC 1 a été mise pendant 30 minutes sous vapeur d'ammoniac. La solution FeC 1 a initialement une couleur jaune (partie basse de la cuve). En présence d'ammoniac, la solution prend une couleur orangée suite à la réaction de conjugaison entre la rifamycine et le collagène (partie haute de la cuve). La formation de fibrilles de collagène rend également la solution turbide. Ce phénomène est illustré par la cuve de gauche où une solution de collagène (sans rifamycine) a été mise sous vapeur d'ammoniac pendant 30 minutes.*

Après une nuit sous vapeur alcaline, les gels ainsi formés sont lavés cinq fois pour libérer la rifamycine non liée. Les deux derniers bains de lavage sont incolores alors que les gels gardent une couleur orange assez soutenue indiquant clairement un résiduel de rifamycine liée, d'une manière ou d'une autre, plus intimement au collagène.

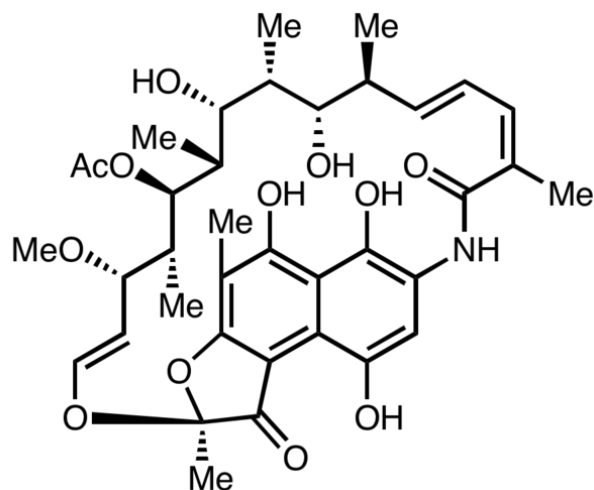
Les gels **FpC** ont un aspect similaire : ils gardent une teinte orangée après lavage et présentent une certaine turbidité due à la formation des fibrilles de collagène (voir figure 2). Eux aussi présentent donc une liaison avec la rifamycine.



*Figure 2 : Photographies d'un gel FpC 1 après lavage. Les gels ont une teinte orange soutenue et présentent un aspect turbide.*

## II – Caractérisation des gels collagène conjugués rifamycine.

### 1 – Comportement des gels en fonction du pH.



*Figure 3 : Forme neutre de la rifamycine SV (d'après [2]). La solubilité de cette molécule dans l'eau est due à la présence d'une fonction phénol acide dont le  $pK_A$  vaut 2,7 [1].*

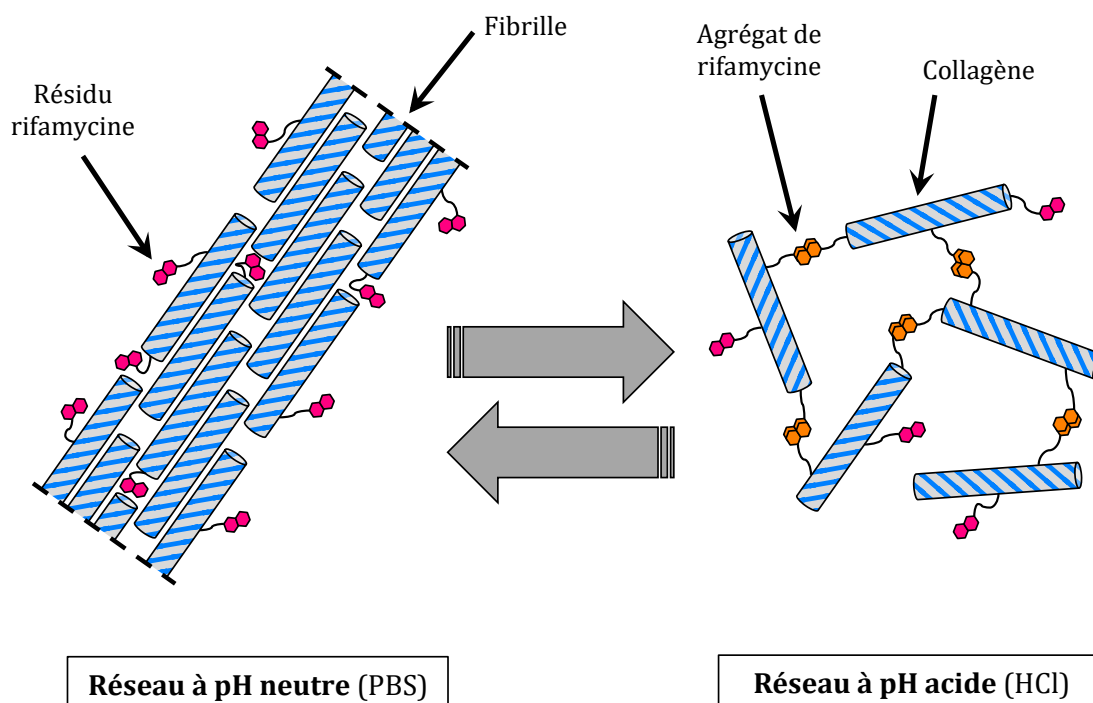
Une des propriétés originales des gels de collagène conjugués rifamycine est lié à leur comportement en milieu acide. Normalement, lorsqu'un gel de collagène fibrillé est transféré dans un bain acide ( $pH < 5$ ), il est alors resolubilisé. Cependant, dans le cas des gels conjugués à la rifamycine (**FpC 1**, **FpC 3**, **FeC 1**, **FeC 3**), nous avons été surpris de remarquer qu'ils gardent leur aspect de gel lorsqu'ils sont immergés dans des bains d'acide à  $pH = 2$ . Ce comportement de gel est d'ailleurs conservé même après trois mois d'immersion dans une solution acide !!!



De plus, on observe un changement de l'aspect des gels lorsqu'on les transfère dans une solution acide. Les gels gonflent et deviennent transparents tout en gardant leur teinte orange. Les fibrilles de collagène semblent donc être solubilisées lors de l'abaissement du pH. La cohésion des gels en milieu acide serait alors due à l'agrégation des résidus rifamycine qui sont insolubles à pH faible. En effet, la rifamycine est un composé macrocyclique comportant un noyau aromatique (voir figure 3) dont la solubilité dans l'eau est due à la présence d'une fonction phénolique ionisable ( $pK_A = 2,7$  [1]). A  $pH = 2$ , la rifamycine est donc sous forme neutre, c'est à dire insoluble dans une solution aqueuse.

Afin d'obtenir des informations sur les interactions à la base du gel en milieu acide, nous avons fait varier le solvant dans lequel les gels sont équilibrés à pH neutre. D'une manière inattendue, les gels équilibrés dans l'eau (gels **FeC 2** et **FpC 2**) sont resolubilisés lorsqu'on les transfère dans un bain d'acide ( $pH = 2$ ).

Le comportement des gels **FeC 2** et **FpC 2** lors de l'abaissement du pH est en faveur de l'hypothèse d'une agrégation des résidus rifamycine. Le tampon PBS est une solution dont la force ionique est bien plus élevée que l'eau déionisée. La solubilité de la rifamycine est donc plus faible dans le PBS que dans l'eau. En équilibrant les gels dans le PBS, on commence à induire la formation de clusters/d'agrégats de rifamycine. On facilite ainsi la transition entre un réseau réticulé par des fibrilles de collagène (pH neutre) et un réseau réticulé par les agrégats de résidus rifamycine (pH acide). L'établissement d'un réseau infini à pH acide semble donc dépendre de la conformation du gel à pH neutre (voir figure 4).



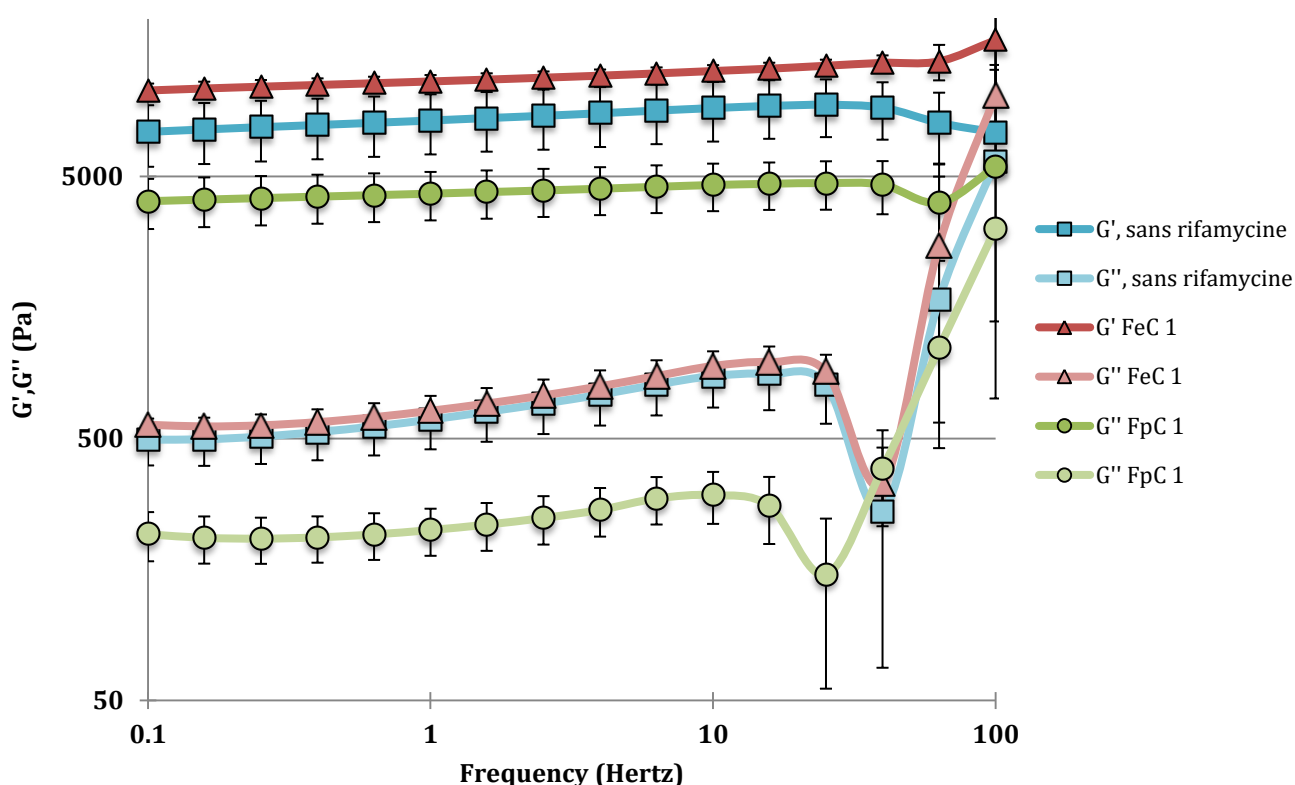
*Figure 4: Structure hypothétique des gels de collagène conjugué rifamycine en milieu neutre (à gauche) et en milieu acide (à droite).*

## 2 – Caractérisation des propriétés rhéologiques des gels.

### a – Protocole expérimental.

Les gels ont été caractérisés avec un rhéomètre Anton Paar mcr 302 en utilisant une géométrie plane (diamètre 2,5 cm ; revêtement sablé) et des coupelles planes recouvertes d'un adhésif sablé. Pour chaque condition, nous avons mesuré les modules élastique ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) d'au moins cinq gels en réalisant une expérience de cisaillement (plan/plan) avec balayage en fréquence (0,1 Hz à 100 Hz). Pour vérifier que les gels ne glissent pas sous l'effet du cisaillement, nous avons déterminé les modules pour trois forces normales différentes (0,1 N, 0,04 N et 0,01 N (contact)).

### b – Résultats.



**Figure 5:** Modules élastique ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) des gels FeC 1, FpC 1 et du gel témoin sans rifamycine ( $C_{\text{collagène}} = 10 \text{ mg/mL}$ ) en fonction de la fréquence de sollicitation. Les modules sont obtenus en effectuant une expérience de cisaillement (plan/plan). Les gels ont été préalablement équilibrés dans le tampon PBS.

Dans le tampon PBS, tous les gels (**FeC**, **FpC** et sans rifamycine) ont un module élastique  $G'$  relativement constant entre 0,1 et 10 Hz et dix fois plus important que leur module visqueux  $G''$  (voir figure 5). De plus, les modules élastiques sont situés entre 1 et 100 kPa. On retrouve ici le comportement typique d'un hydrogel [3]. Pour simplifier la comparaison entre les gels, nous

nous nous focaliserons à présent sur les valeurs de  $G'$  et  $G''$  pour une fréquence de sollicitation de 1 Hz et une force normale appliqué de 0,04 N.

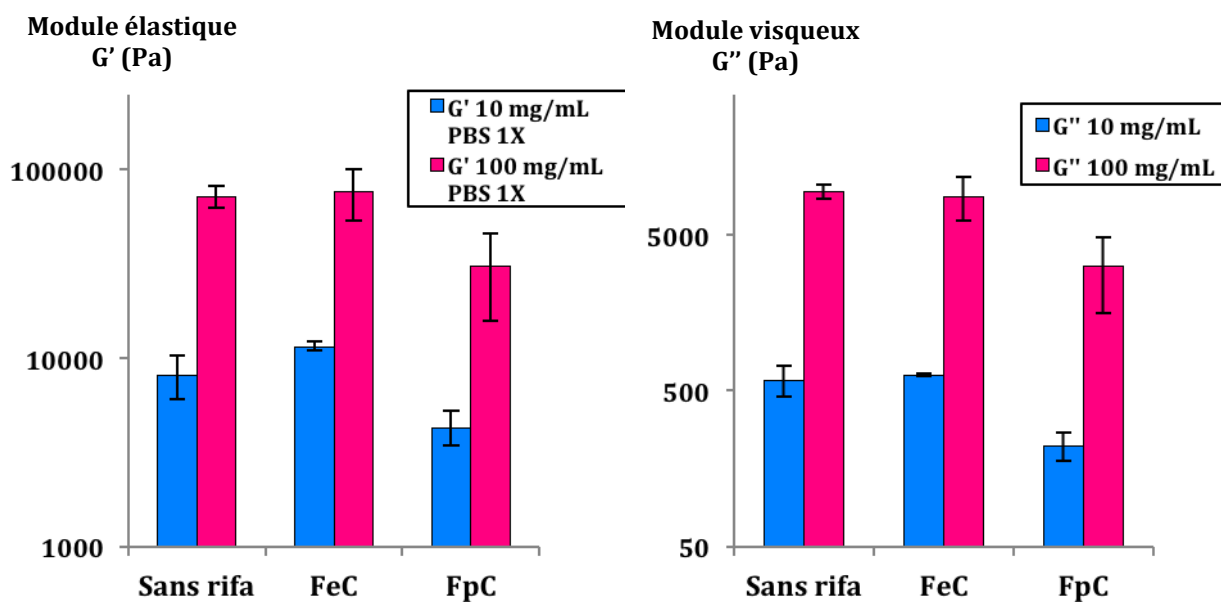


Figure 6 : Modules élastique ( $G'$ , à gauche) et visqueux ( $G''$ , à droite) des gels FeC (1 et 3), FpC (1 et 3) et des gels témoins sans rifamycine (fréquence 1 Hz et force normale 0,04 N) après équilibration dans le tampon PBS.

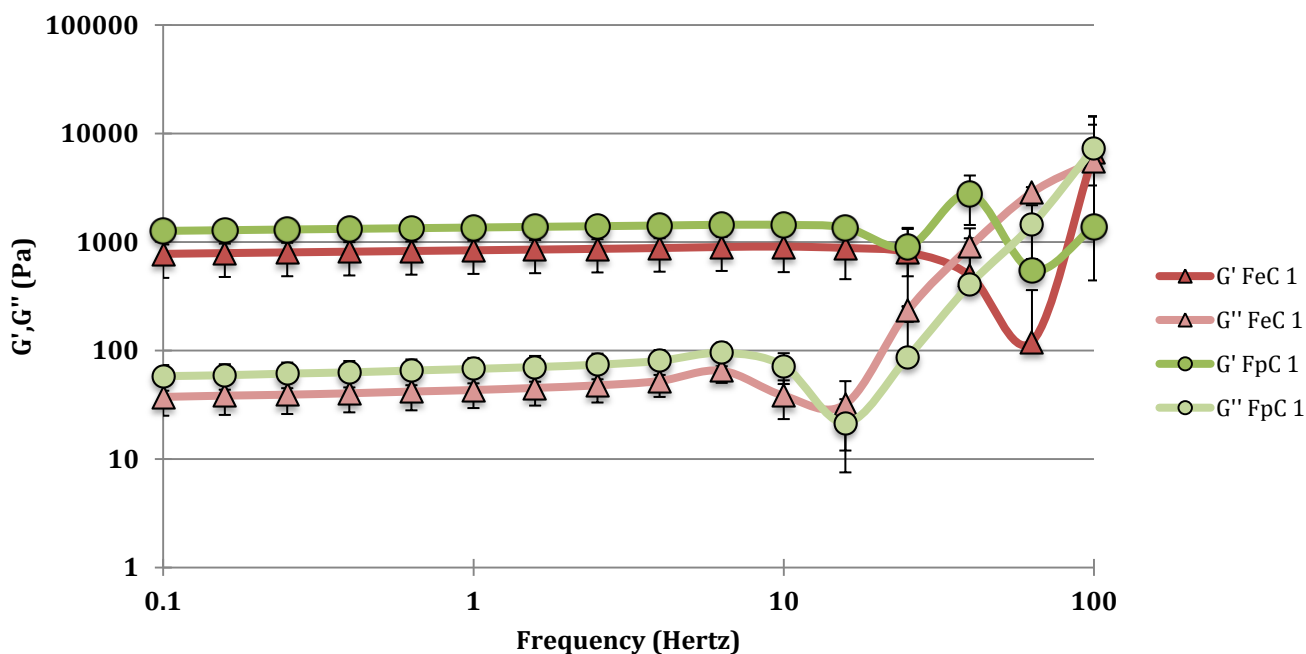
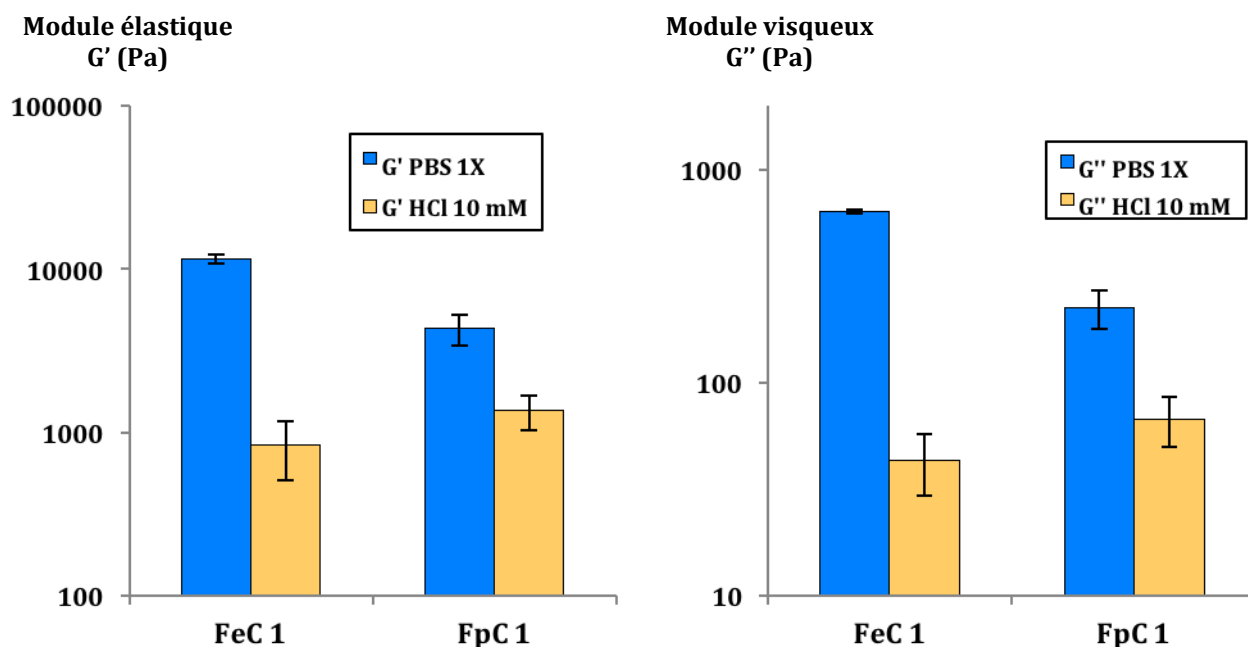


Figure 7 : Modules élastique ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) des gels FeC 1, FpC 1 en fonction de la fréquence de sollicitation. Les modules sont obtenus en effectuant une expérience de cisaillement (plan/plan). Les gels ont été préalablement équilibrés une solution d'acide chlorhydrique (pH = 2).

Dans le tampon PBS, le gel **FeC 1** a des modules  $G'$  et  $G''$  similaires à ceux du gel témoin sans rifamycine (voir figure 6) alors que les modules du gel **FpC 1** sont par contre plus faible. On observe d'ailleurs le même rapport de valeurs avec les gels **FeC 3** et **FpC 3** qui sont dix fois plus concentrés. De plus, on note que les gels **FeC 3** et **FpC 3** ont respectivement des modules ( $G'$  et  $G''$ ) dix fois plus élevés que **FeC 1** et **FpC 1**.

Équilibrés dans une solution d'acide chlorhydrique ( $\text{pH} = 2$ ), les gels (**FeC 1** et **FpC 1**) gardent un  $G'$  relativement constant entre 0,1 et 10 Hz et plus de dix fois supérieur à leur  $G''$ . Ils se comportent donc toujours comme des hydrogels (voir figure 7).

Comparés aux gels initiaux, équilibrés dans le PBS, les gels en milieu acide ont des modules  $G'$  et  $G''$  bien plus faible (voir figure 8). De plus, on note que les modules de **FpC 1** sont maintenant un peu plus élevés que ceux de **FeC 1**. Cette différence de module pourrait être liée à la quantité de rifamycine fixée sur le collagène.



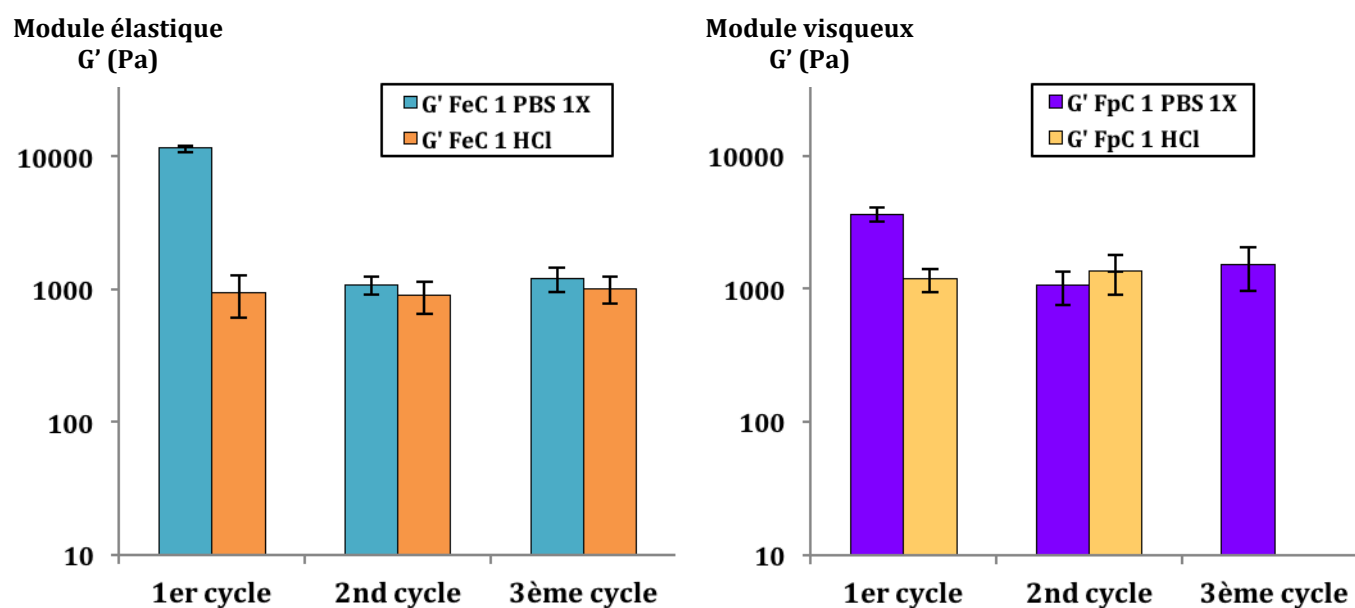
*Figure 8 : Modules élastique ( $G'$ , à gauche) et visqueux ( $G''$ , à droite) des gels **FeC 1** et **FpC 1** (fréquence 1 Hz et force normale 0,04 N) après équilibration dans une solution d'acide chlorhydrique ( $\text{pH} = 2$ ).*

Nous pensons que la réticulation des gels, à pH neutre et acide, repose sur des interactions supramoléculaires (fibrilles de collagène et/ou agrégats de rifamycine). Ces interactions étant faibles et réversibles, nous supposons que les cycles « neutre/acide » sont également réversibles. Nous avons vérifié cette hypothèse en mesurant les modules élastiques et visqueux des gels **FeC 1** et **FpC 1** à chaque cycle de montée et descente en pH (voir figure 9). Après quelques cycles, le comportement des deux gels est similaire :

- Le module  $G'$  des gels dans l'acide chlorhydrique reste constant.
- Le module  $G'$  des gels dans le PBS 1X diminue après le premier cycle puis devient constant. Ce module dépend de la quantité et de la structure des

fibrilles de collagène. Lors du premier passage dans une solution acide, les fibrilles sont dissociées et le collagène comportant peu ou pas de résidus rifamycine est solubilisé. Le gel perd donc une partie de son contenu en collagène. C'est pour cette raison que l'on observe une diminution du module  $G'$  dans le PBS 1X après le premier cycle.

Par conséquent, mise à part le premier cycle, le passage de la structure « acide » à la structure « neutre » est un phénomène réversible pour les deux types de gels, **FpC** et **FeC**. De plus, les modules élastiques (et visqueux) des deux types de gels deviennent similaires, que ce soit en condition « acide » ou « neutre ».



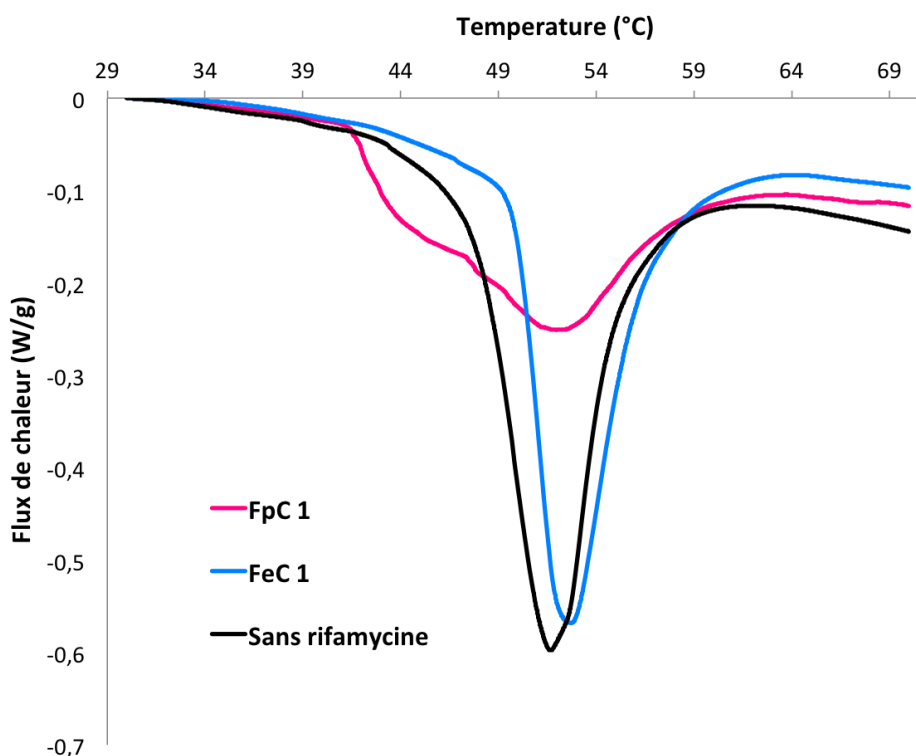
*Figure 9 : Suivi du module élastique  $G'$  des gels FeC 1 (à gauche) et FpC 1 (à droite) pour chaque cycle de descente/montée en pH. Fréquence 1 Hz et force normale 0,04 N.*

### 3 – Caractérisation des gels par DSC.

#### a – Protocole expérimental.

Les thermogrammes des matrices ont été enregistrés à l'aide d'un appareil DSC Q20, TA Instruments. La dénaturation du collagène étant un procédé irréversible, les matrices n'ont subi qu'un seul cycle de montée et descente en température. Avant chaque mesure, les matrices ont été équilibrées pendant 3 jours dans le solvant désiré ( $T_{\text{stockage}} = 4^{\circ}\text{C}$ ). Les échantillons ont été découpés peu de temps avant la mesure et placés dans des capsules hermétiques en aluminium. Ils sont ensuite transférés dans l'appareil et stabilisés pendant 5 minutes à  $5^{\circ}\text{C}$ . Les échantillons subissent ensuite une montée en température jusqu'à  $90^{\circ}\text{C}$  puis une descente jusqu'à  $5^{\circ}\text{C}$  avec une vitesse de  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Pour chaque condition, 4 échantillons ont été analysés. Chaque échantillon a été préalablement pesé afin de déterminer l'enthalpie massique de dénaturation.

b – Résultats.



**Figure 10 :** Thermogramme des gels FpC 1 et FeC 1 et du gel témoin sans rifamycine. Les gels ont tous été équilibrés, au préalable, dans le PBS 1X. Les thermogrammes du gel témoin et de FeC 1 comportent un seul pic lié à la dénaturation des fibrilles de collagène. Ce pic de dénaturation est similaire pour les deux gels. Pour le gel FpC 1, par contre, on note la présence de deux pics convolués.

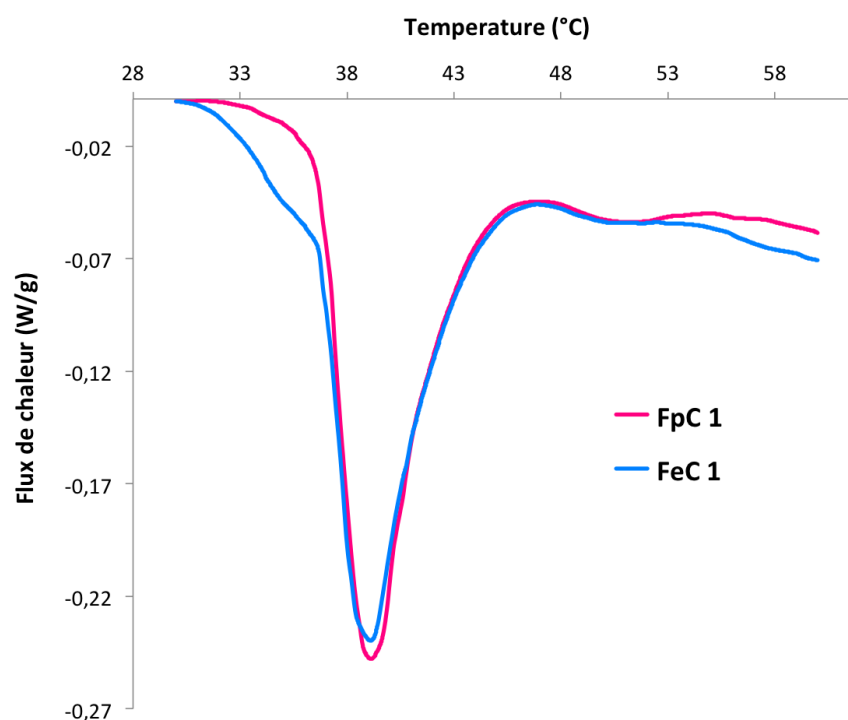
Condition	Température de dénaturation (°C)	Enthalpie massique de dénaturation (J/g)
<b>FeC 1</b>	49,7 +/- 0,3	100 +/- 20
<b>FpC 1</b>	41,5 +/- 0,3	78 +/- 7
<b>Sans rifamycine</b>	47,8 +/- 0,5	101 +/- 12

**Tableau 2 :** Température et enthalpie massique de dénaturation du collagène pour les gels FeC 1, FpC 1 et le gel témoin sans rifamycine. Tous les gels ont été préalablement équilibrés dans le PBS 1X. Pour chaque condition, nous avons moyenné les températures et les enthalpies de dénaturation de 4 échantillons. Les incertitudes sur chaque valeur correspondent aux écarts types sur ces 4 échantillons.

Afin de sonder l'interaction collagène/rifamycine, nous avons étudié la dénaturation thermique des gels par DSC, à pH neutre et à pH acide.

Dans le PBS 1X, les thermogrammes du gel **FeC 1** et du gel témoin (sans rifamycine) comportent un unique pic lié à la dénaturation des fibrilles de collagène. Ce pic de dénaturation est similaire pour les deux gels (voir figure 10 et tableau 2). Pour le gel **FpC 1**, par contre, on note la présence de deux pics convolués (voir figure 10). Le pic à haute température correspond à la dénaturation d'une fibrille de collagène classique/native. Le pic à basse température, plus large, correspond à un assemblage différent et moins stable du collagène (cf Partie II chapitre 3).

Dans la solution d'acide chlorhydrique (pH = 2), les thermogrammes des gels **FeC 1** et **FpC 1** comporte un seul pic (voir figure 11 et tableau 3) ; un pic similaire au pic de dénaturation des triples hélices d'une solution acide de collagène [4]. Ces observations confirment qu'en transférant les gels conjugués rifamycine en milieu acide, on désagrège les fibrilles de collagène. Après quelques cycles, il ne reste donc plus que des molécules de collagène conjuguées à la rifamycine. Cela signifie que la cohésion de ces gels, à pH acide, repose donc uniquement sur des interactions ryfamycine-conjugué/ryfamycine-conjugué et non sur la formation d'un réseau de fibrilles de collagène.



*Figure 11: Thermogramme des gels FpC 1 et FeC 1 après équilibration dans une solution d'acide chlorhydrique (pH = 2). Les thermogrammes des deux gels comportent un seul pic, un pic similaire au pic de dénaturation des triples hélices d'une solution acide de collagène [4].*

Condition	Température de dénaturation (°C)	Enthalpie massique de dénaturation (J/g)
<b>FeC 1</b>	36,5 +/- 0,1	36 +/- 3
<b>FpC 1</b>	36,9 +/- 0,3	30 +/- 1

*Tableau 3 : Température et enthalpie massique de dénaturation du collagène pour les gels FeC 1, FpC 1. Tous les gels ont été préalablement équilibrés dans une solution d'acide chlorhydrique (pH = 2). Pour chaque condition, nous avons moyenné les températures et les enthalpies de dénaturation de 4 échantillons. Les incertitudes sur chaque valeur correspondent aux écarts types sur ces 4 échantillons.*

En couplant l'ensemble des informations obtenues jusqu'ici, nous pouvons en déduire que nous avons synthétisé des matériaux présentant un comportement de gel en condition acide et neutre. En condition acide, les interactions à l'origine du gel engagent des interactions ryfamycine-conjugué/ryfamycine-conjugué alors qu'en condition neutre, le gel repose sur la fibrillogenèse des molécules de collagène. Nous pouvons également en déduire que la conjugaison de la ryfamycine au collagène n'empêche pas la formation des fibrilles.

#### 4 – Propriétés antibactériennes des gels.

##### a – Protocole expérimental.

L'activité antibactérienne des gels a été vérifiée en évaluant leur capacité à inhiber la croissance d'une souche bactérienne de *Staphylococcus Aureus* (ATCC 29213). Cette bactérie est souvent présente au niveau des plaies chroniques et elle est sensible à la rifamycine [5]. Pour chaque type de gels, nous avons réalisé des antibiogrammes en utilisant la méthode de Kirby-Bauer.

Cette méthode est basée sur la diffusion de substances antibiotiques imprégnées sur des disques en papier préalablement séchés qui doivent être déposés à la surface d'un gel de LB-agar. Les disques appliqués sur l'agar absorbent une quantité d'eau suffisante pour dissoudre l'antibiotique qui diffuse ainsi progressivement dans le milieu, suivant les lois physiques de diffusion des molécules à travers un gel. Il se forme ainsi un gradient de concentration de l'antibiotique autour de chaque disque. Tandis que le mécanisme de diffusion se produit, la multiplication des bactéries ensemencées à la surface de l'agar intervient. Au moment où se manifeste la phase logarithmique de croissance, les bactéries se multiplient plus rapidement que la diffusion de l'antibiotique ne peut progresser et les cellules bactériennes non inhibées continuent à se multiplier jusqu'à ce que la culture puisse être visualisée. Aucune croissance n'apparaît lorsque l'antibiotique est présent aux concentrations inhibitrices. Il est alors possible de mesurer le diamètre de la zone d'inhibition.

*Staphylococcus Aureus* est une bactérie incapable de dégrader les fibrilles de collagène. Dans les gels conjugués à la rifamycine, l'antibiotique est lié de



manière covalente au collagène. Il ne peut donc pas diffuser librement et nous supposons par conséquent que les gels intacts n'auraient pas d'activité antibactérienne. Cette hypothèse a été vérifiée en plaçant des morceaux de gels (**FeC**, **FpC** et sans rifamycine) de même forme et de même taille que les disques de papier sur un gel de LB-agar imprégné de *S. Aureus*.

Pour démontrer que la conjugaison de la rifamycine n'a pas altérée ses propriétés antibactériennes et que les produits de dégradation des gels peuvent inhiber la croissance de *S. Aureus*, nous avons également mimé la dégradation des matrices *in vitro*. Nous avons eu recours à une enzyme bactérienne capable de cliver le collagène fibrillé : la collagénase. Les gels sont mis à incuber dans une solution de collagénase pendant deux heures, à 37°C. On obtient alors des solutions de débris de collagène dont des peptides conjugués à la rifamycine. On peut alors imprégner des disques de papier de ces solutions pour en tester l'effet antibiotique.

Pour chaque condition, nous avons testé quatre échantillons (disque ou gel) sur deux inocula différents. Pour chaque inoculum, nous avons également déposé une série de disques de concentration connue en rifamycine. Ces disques permettent de relier le diamètre de la zone d'inhibition à la quantité de rifamycine relarguée [6]. Ils nous indiquent également si les bactéries de l'inoculum sont devenues résistantes à l'antibiotique. Ce point est très important puisque *S. Aureus* est connue pour son habilité à développer facilement des résistances aux antibiotiques [7].

Le protocole détaillé pour réaliser un antibiogramme est indiqué en annexe.

#### b – Résultats.

Concentration collagène	SR	FeC	FpC	SR + Case	FeC + Case	FpC + Case
10 mg/mL						
100 mg/mL						

**Tableau 4 :** Résultats des antibiogrammes pour les gels conjugués rifamycine. En rouge, les gels et les solutions (gels dégradés) qui n'ont pas démontré de propriétés antibiotiques. En vert, la solution de FeC 3 clivé pour laquelle on observe une zone d'inhibition. SR : Sans Rifamycine ; Case : Collagénase.

Dans le tableau 4, nous avons indiqué si les gels sont capables d'induire une zone d'inhibition. Comme attendu, le collagène et ses produits de dégradation n'ont pas de propriétés antibiotiques (**SR et SR+Case**). On remarque aussi que les gels conjugués rifamycines, lorsqu'ils sont intacts, n'induisent pas d'inhibition.

Lorsque les solutions des gels clivés **FpC** sont testées, on n'observe aucune zone d'inhibition indépendamment de la concentration en collagène. La

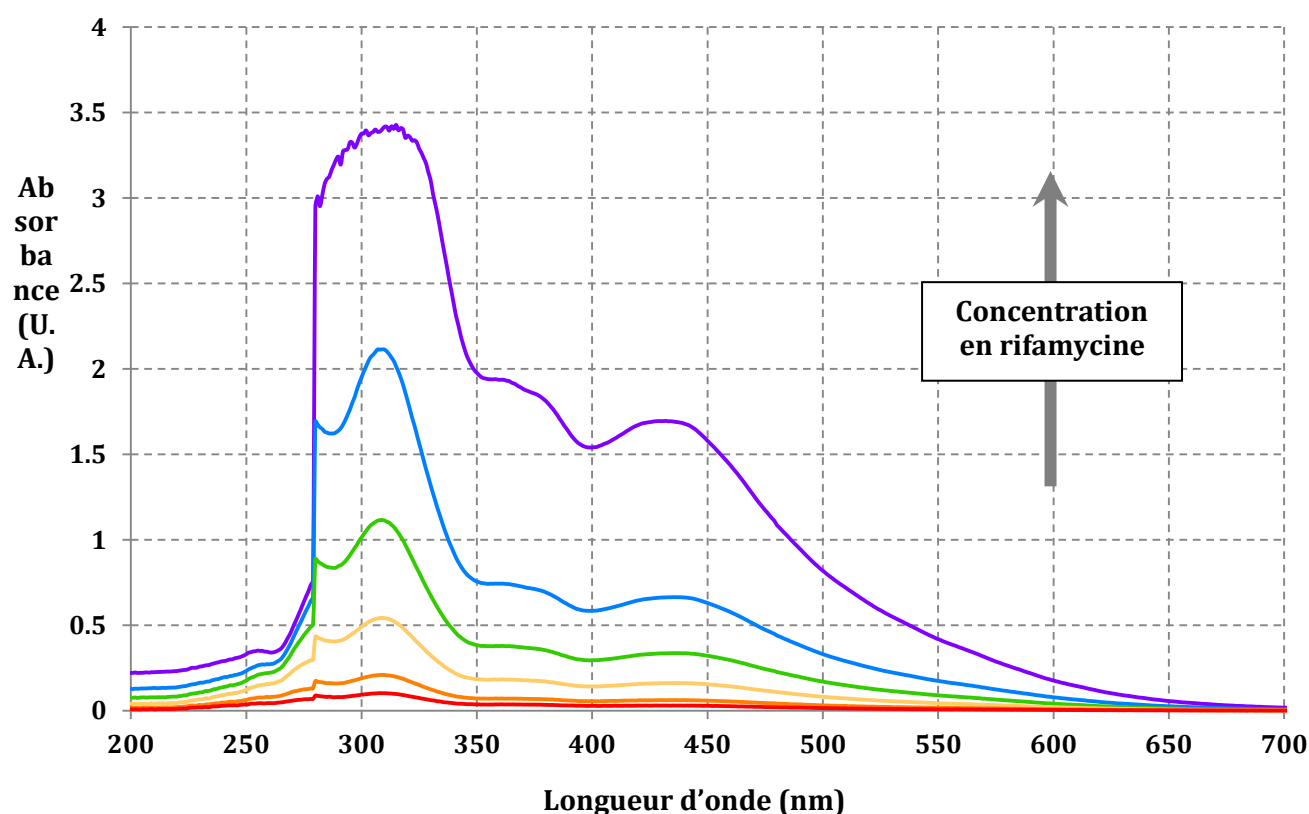
conjugaison de la rifamycine par le procédé **FpC** semble donc altérer ses propriétés antibiotiques.

Concernant le procédé **FeC**, le gel **FeC 3** induit une légère inhibition alors que le gel moins concentré, **FeC 1**, est recouvert de bactéries. Par conséquent, le procédé **FeC** permet de conserver les propriétés antibiotiques de la rifamycine. Toutefois, il est nécessaire de travailler avec des concentrations importantes en collagène afin d'augmenter la quantité d'antibiotique fixée sur le gel.

Nos expériences indiquent que seule la condition **FeC 3** permet de conserver l'effet antibiotique de la rifamycine. Nous avons donc trouvé un moyen de fixer l'antibiotique sur un gel de façon à ce qu'il ne devienne actif qu'après dégradation de ce gel. Par conséquent, le gel FeC 3 peut permettre un relargage lent, contrôlé et continu de l'antibiotique basé sur sa dégradation. Qui plus est, le gel est stable même à des conditions drastiques de pH.

### III – Expériences en cours.

#### 1 – Détermination de la quantité de rifamycine conjuguée.

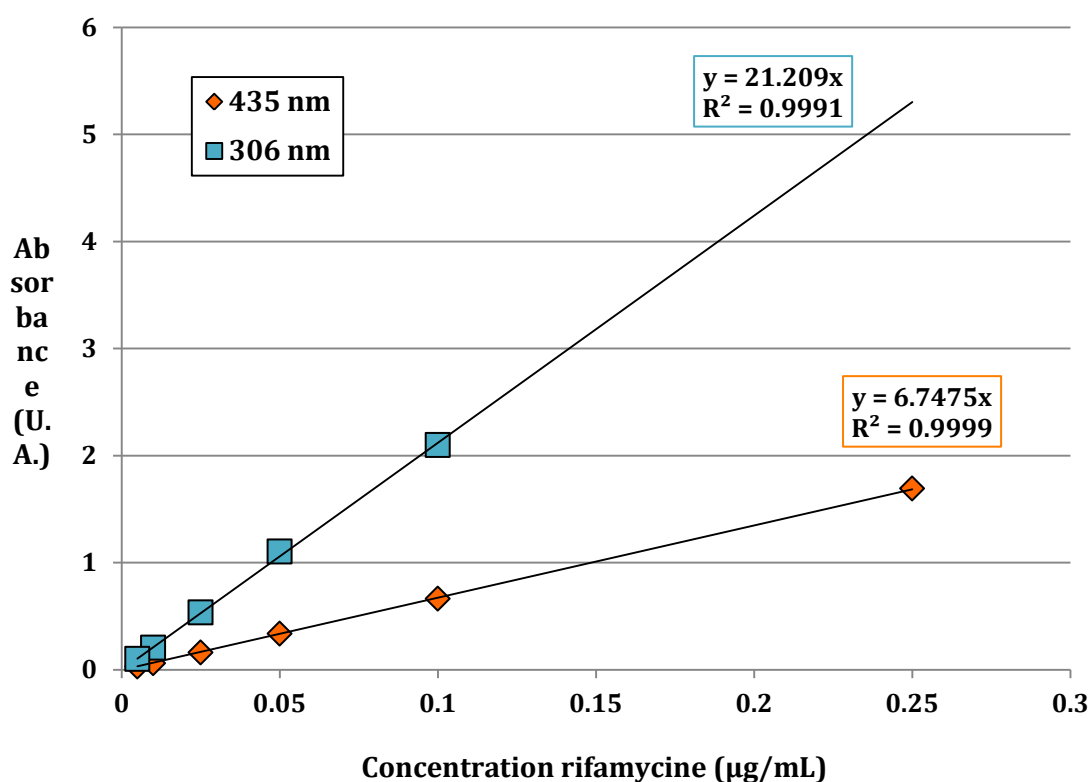


*Figure 12: Spectres UV-visible de solutions de rifamycine après passage sous vapeur d'ammoniac. De la courbe rouge à la courbe violette, la concentration initiale en rifamycine SV augmente régulièrement (5, 10, 25, 50, 100 et 250 µg/mL). Des courbes étalons Absorbance =  $f(C_{rifamycine})$  ont été réalisées pour les pics à 306 nm et 435 nm.*

Nous souhaitons déterminer indirectement la quantité d'antibiotique fixé dans les gels en dosant la rifamycine non-liée présente dans les eaux de lavage. Ces eaux de lavage étant colorées, nous avons opté pour un dosage spectrophotométrique basé sur la loi de Beer-Lambert.

Dans un premier temps, il nous a donc fallu réaliser une courbe étalon de la rifamycine modifiée. Pour cela, nous avons enregistré des spectres UV-visible de solutions de rifamycine (6 concentrations initiales différentes) après une nuit sous vapeur d'ammoniac (voir figure 12). Nous avons alors identifié deux pics obéissant à la loi de Beer-Lambert sur la gamme de concentration  $250 \mu\text{g/mL} > C_{\text{rifamycine}} > 5 \mu\text{g/mL}$  : un pic à 306 nm et un pic à 435 nm. Nous avons donc établi deux courbes étalons décrivant l'absorbance de la rifamycine modifiée en fonction de la concentration initiale en rifamycine SV (voir figure 13).

A présent, nous sommes en train de préparer de nouveaux de gels afin de procéder effectivement au dosage des eaux de lavage des deux types d'échantillons.

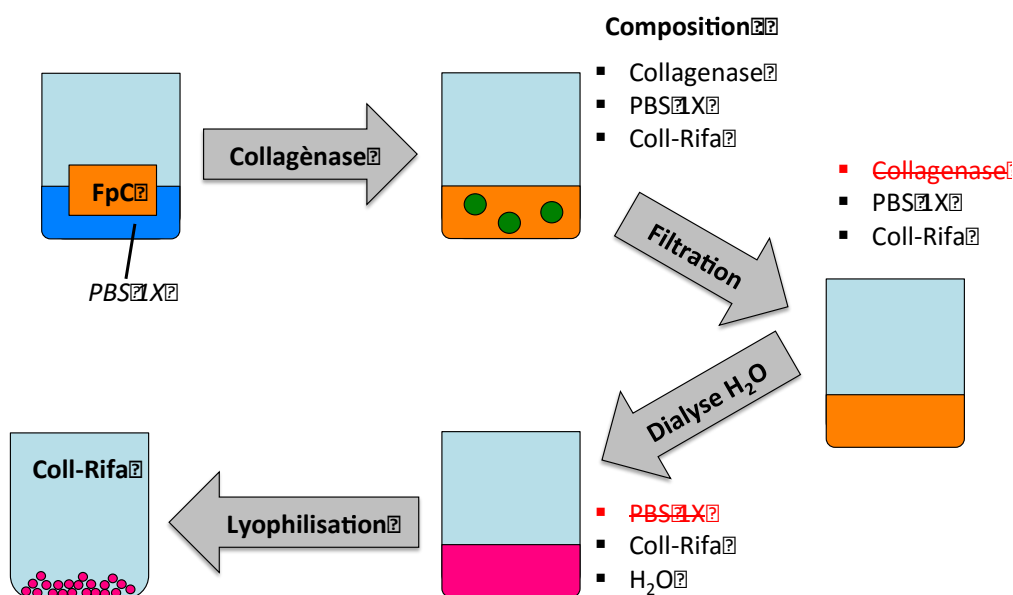


**Figure 13 :** Courbes étalons Absorbance =  $f(C_{\text{rifamycine}})$  réalisées à partir des valeurs d'absorbance des pics à 306 nm (carrés bleus) et 435 nm (losanges oranges).

## 2 – Caractérisation de la liaison collagène-rifamycine.

Comme nous l'avons vu, malgré les lavages, les gels conservent une coloration orangée laissant penser à une liaison forte entre la rifamycine et le collagène. Nous avons donc cherché à mettre en évidence l'existence d'une liaison covalente entre le collagène et la rifamycine par spectroscopie UV-visible et RMN.

Nous avons tout d'abord utilisé la spectroscopie UV-visible afin d'obtenir le spectre du dérivé de rifamycine présent dans les gels **FeC1** et **FpC1**. Malheureusement, les gels diffusent trop la lumière et nous n'avons pas pu obtenir de spectre exploitable.



*Figure 14 : Protocole de préparation des gels conjugués rifamycine pour la RMN H<sup>1</sup> en solution. Les gels sont tous d'abord clivés en petits peptides par une collagénase. Cette enzyme est ensuite ôtée par centrifugation-filtration et le PBS est échangé contre de l'eau déionisée par dialyse. Enfin, les peptides sont lyophilisés pour pouvoir être redispersés dans D<sub>2</sub>O.*

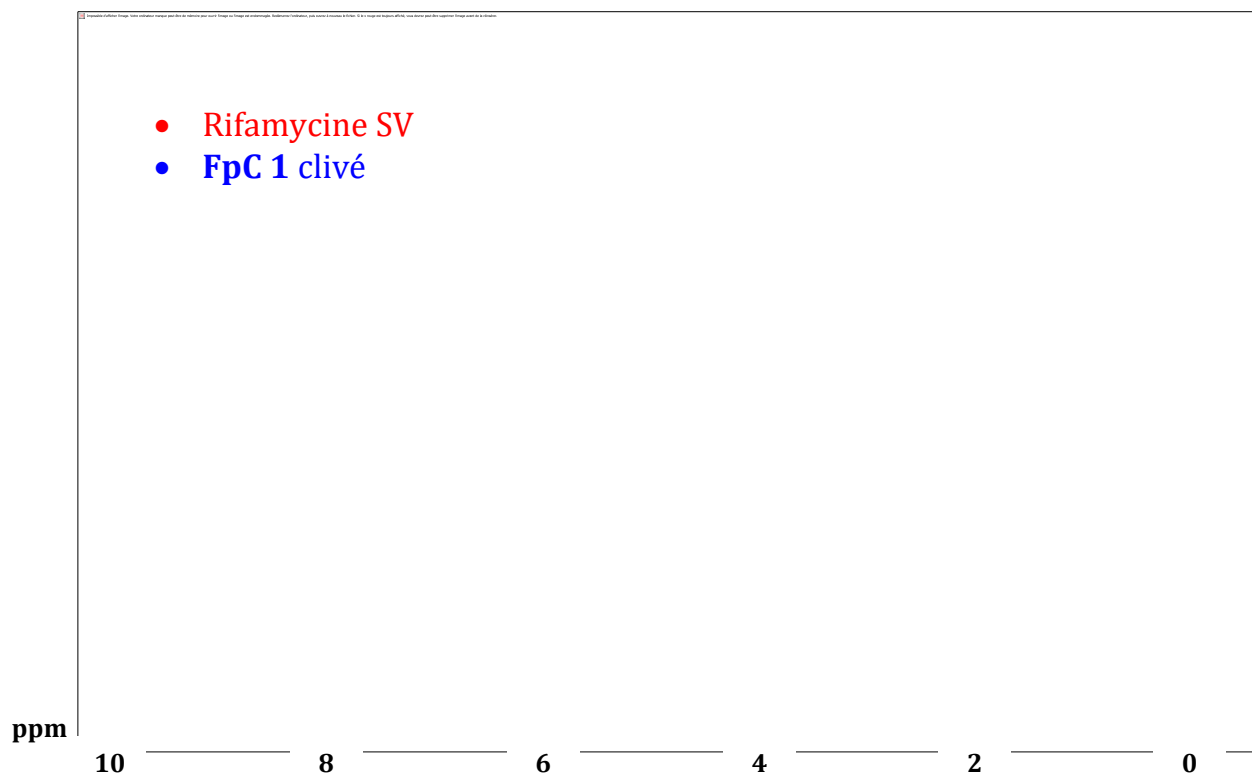
Nous avons essayé de démontrer l'existence de liaisons covalentes collagène-rifamycine par RMN. La démarche n'est pas évidente car le collagène est une molécule de haut poids moléculaire dont le spectre RMN H<sup>1</sup>, en solution, est constitué de pics très larges et peu intenses.

Afin de contourner ce problème, nous avons décidé de cliver les gels conjugués enzymatiquement à l'aide d'une collagénase. La solution de peptides ainsi générée est ensuite filtrée (« Cut-off » du filtre = 30 kDa) de manière à ôter la collagénase puis dialysée (« Cut off » de la membrane = 3,5 kDa) contre l'eau pour se débarrasser des sels du tampon PBS. Afin d'échanger le milieu pour s'affranchir de l'eau, nous avons finalement procédé à une étape de lyophilisation puis redispersé les peptides dans du D<sub>2</sub>O (voir figure 14).

Ce protocole a été utilisé avec succès sur des gels **FpC 1** et nous a permis d'obtenir un spectre H<sup>1</sup> en solution comportant des pics peu larges (voir figure 15). A ce stade, le spectre est trop complexe pour être interprété en lui-même. En effet, il comprend les pics des peptides conjugués et des peptides non conjugués à la rifamycine.

Afin de compléter les données et de pouvoir plus facilement les exploiter, il faudra par la suite faire des spectres des gels témoins (sans rifamycine) traités de la même manière avec la collagénase. Ce témoin nous permettra de mieux identifier les pics des peptides conjugués. L'idée sera ensuite d'identifier les sites de liaisons de la rifamycine sur le collagène à l'aide des couplages scalaires. Il

faudra également appliquer le même protocole sur les gels **FeC 1** afin de vérifier les différences de conjugaison entre les deux types d'échantillons : **FeC** et **FpC**.



*Figure 15 : Spectre RMN  $H^1$  de la rifamycine SV et de FpC 1 clivé dans  $D_2O$ . La solution de FpC 1 a été préparée suivant le protocole décrit en figure 14.*

#### IV – Discussion.

Nous avons identifié un protocole simple permettant de lier un antibiotique (la rifamycine) au collagène.

Pour conjuguer la rifamycine sur le collagène, nous avons eu recours à deux protocoles : **FeC** et **FpC**. La caractérisation des gels (Rhéologie et DSC) démontre que ces deux protocoles ne sont pas équivalents :

- Protocole **FeC**. Dans le PBS, les gels **FeC** ont les mêmes propriétés mécaniques que des gels témoins sans rifamycine. Les gels **FeC** et témoins ont également un thermogramme similaire. En utilisant le protocole **FeC**, la fibrillation du collagène n'est donc pas affectée par l'ajout de rifamycine.
- Protocole **FpC**. En DSC, pour le gel **FpC 1**, nous observons l'apparition d'un second pic de dénaturation à une température plus faible. Nous supposons que la rifamycine, en se liant au collagène, perturbe la structure initiale des fibrilles. La conjugaison de la rifamycine pourrait même induire la formation d'un nouvel assemblage de collagène. Dans tous les cas, la rifamycine modifie suffisamment la structure des fibrilles pour que les propriétés mécaniques des gels **FpC** en soit affecté. En effet,

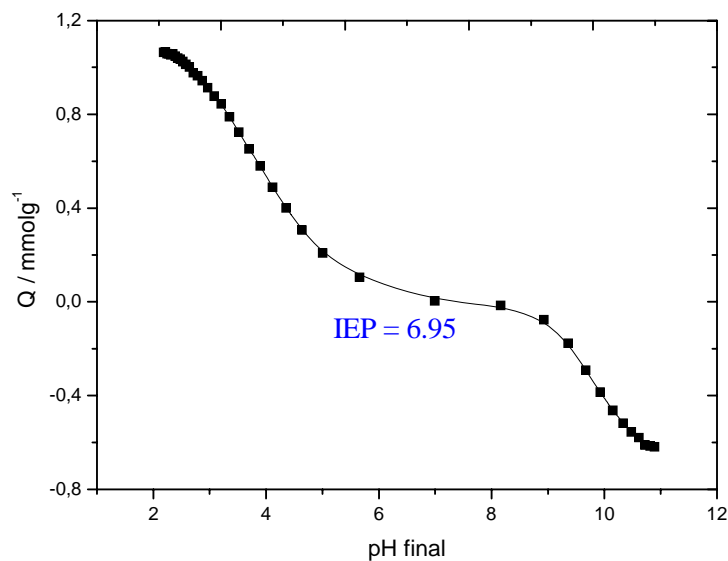
dans le PBS, les gels **FpC** ont des modules  $G'$  et  $G''$  plus faibles que les gels témoins sans rifamycine.

Néanmoins, après un premier cycle « neutre/acide », les différences entre les deux types de gels semblent s'estomper. En effet, les gels **FpC** et **FeC** ont des modules  $G'$  et  $G''$  similaires, à pH neutre et acide, à partir du second cycle. Il serait intéressant de confirmer ce comportement en étudiant l'effet des cycles « neutre/acide » par DSC.

Au cours de la première descente en pH, on induit également la solubilisation du collagène peu ou pas conjugué dans le bain d'acide. Les gels perdent alors une partie de leur contenu en collagène. C'est pour cette raison que l'on observe une diminution marquée des modules  $G'$  et  $G''$  des gels équilibrés dans le PBS après le premier cycle.

Enfin, nous avons surtout montré, mise à part le premier cycle, que la transition acide/base est un phénomène réversible. Ce résultat semble indiquer que la cohésion des gels conjugués, en milieu acide et neutre, est basée sur des réseaux physiques :

- à pH acide, le réseau est réticulé par des agrégats de résidus rifamycine.
- à pH neutre, la cohésion du gel repose sur la formation de fibrilles de collagène.



**Figure 16:** Isotherme d'adsorption de protons par le collagène en fonction du pH (d'après [9]).  $Q$  est la capacité du collagène à adsorber des protons (en mmol de protons par gramme de collagène). Quand  $Q$  est positif, le collagène capte des protons (charge nette positive) alors que pour des valeurs négatives de  $Q$ , le collagène relargue des protons (charge nette négative).

La formation d'une liaison covalente collagène-rifamycine n'a pas encore été mise en évidence. Toutefois, nous pouvons déjà écarter certaines interactions :

- **Les liaisons ioniques** (ou électrostatiques fortes). Les gels de collagène prennent une couleur orange au cours de l'étape de conjugaison avec la rifamycine. Cette couleur est conservée, même après plusieurs lavages

(PBS et eau) et cycles de descente/montée en pH. Cependant, la charge nette du collagène varie fortement entre pH = 2 et pH = 7 (voir figure 16). A pH = 2, le collagène est chargé positivement alors qu'à pH = 7, il est globalement neutre. Si la liaison collagène-rifamycine était purement ionique, l'antibiotique devrait donc être libéré au cours de la montée ou de la descente en pH.

- **Les liaisons faibles de type  $\pi$ -stacking** car le collagène contient très peu d'acides aminés aromatiques [8].

## V – Conclusions et perspectives.

Nous avons mis en évidence une nouvelle réaction permettant de lier facilement un antibiotique, la rifamycine, à une matrice de collagène. La conjugaison de cet antibiotique est à l'origine de propriétés originales pour un gel de collagène. En effet, les gels conjugués ne sont plus solubles en milieu acide. Ils gonflent et deviennent transparents. Nous avons donc synthétisé des gels sensibles au pH. Nous pensons que ces gels pourraient être intéressants pour réaliser des pansements gastriques.

De plus, nous avons identifié une condition (**FeC 3**) pour laquelle les gels présentent des propriétés antibiotiques. Nous avons d'ailleurs démontré que cette activité antibiotique repose sur l'érosion des gels. Les gels **FeC 3** permettent donc une libération lente et contrôlée de la rifamycine et sont de bons candidats pour réaliser des pansements adaptés aux plaies chroniques.

Concernant les perspectives, il faudrait mieux définir ces objets en :

- déterminant la quantité de rifamycine fixée dans chaque gel
- démontrant l'existence de la liaison collagène/rifamycine
- identifiant les acides aminés qui réagissent avec la rifamycine
- caractérisant la transparence et le gonflement en fonction du pH
- etc.

En parallèle de l'étude de ces gels, nous également cherché à décrire la structure des fibrilles de collagène lorsqu'elles sont conjuguées avec la rifamycine.

## Bibliographie :

- [1] – KORZYBSKI T., KOWSZYK-GINDIFER Z., KURYLOWICZ W. *Antibiotics : origin, nature and properties*. Oxford : Pergamon Press, 2013. ISBN: 978-1-4831-9802-6.
- [2] – Rifamycine. In : *Wikipedia* (en ligne). Consulté le 29/08/2016. Disponible à l'adresse : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Rifamycine>
- [3] – ALMDAL K., DYRE J., HYIDT S., KRAMER O. Towards a phenomenological definition of the term « gel ». *Polymer gels and networks*, 1993, vol 1, issue 1, p 5-17. DOI : 10.1016/0966-7822(93)90020-I.

- [4] – MU C., LI D., LIN W., DING Y., ZHANG G. Temperature induced denaturation of collagen in acidic solution. *Biopolymers*, 2007, vol 86, n°4, p 282-287. DOI : 10.1002/bip.20742.
- [5] – PERCIVAL S.L., HILL K.E., WILLIAMS D.W., HOOPER S.J., THOMAS D.W., COSTERTON J.W. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound repair and regeneration*, 2012, vol 20, issue 5, p 547-557. DOI : 10.1111/j.1524-475X.2012.00836.x
- [6] – ALVAREZ G.S., HELARY C., MEBERT A.M., WANG X., CORADIN T., DESIMONE M.F. Antibiotic-loaded silica nanoparticle-collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. *Journal of materials chemistry B*, 2014, vol 2, p 4660-4670. DOI : 10.1039/c4tb00327f.
- [7] – LOWY F.D. Antimicrobial resistance : the example of *Staphylococcus Aureus*. *The journal of clinical investigation*, 2003, vol 111, issue 9, p 1265-1273. DOI : 10.1172/JCI200318535.
- [8] – EASTOE J.E. The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochemical Journal*, 1955, vol 61, n°4, p. 589-600. DOI : 10.1042/bj0610589.
- [9] – DE MESQUITA J.P., PATRICIO P.S., DONNICI C.L., PETRI D.F.S., DE OLIVEIRA L.C.A., PEREIRA F.V. Hybrid layer-by-layer assembly based on animal and vegetable structural materials : multilayered films of collagen and cellulose nanowhiskers. *Soft Matter*, 2011, vol 7, p. 4405-4413. DOI : 10.1039/C0SM01168A.





### Partie III – Chapitre 3 : Impact de la conjugaison de la rifamycine sur la structure des fibrilles de collagène – Etude d’un système dilué.

I – Présentation du système dilué : les particules de collagène conjugué rifamycine.

1 – Présentation du système dilué.

Comme indiqué tout au long de cette thèse, le collagène a la capacité de former des fibrilles à pH neutre. Notre protocole habituel de fibrillogenèse consiste à augmenter le pH d’une solution acide de collagène en la mettant sous des vapeurs d’ammoniac. Toutefois, si la concentration en collagène est trop faible pour former un réseau infini, la solution ne devient pas un gel. A la place, on obtient une solution de particules de collagène fibrillé. Ces particules, si elles sont suffisamment petites, peuvent alors être directement observées en cryo-MET. Il est également possible les caractériser à l’aide d’un AFM-nanoIR (AFMIR). C’est ce type de système dilué que nous avons décidé d’utiliser afin d’étudier l’impact de la conjugaison de la rifamycine sur la structure des fibrilles de collagène.

2 – Préparation des échantillons.

La liste des conditions étudiées est indiquée dans le tableau 1. Comme pour les gels conjugués (cf Partie III - chapitre 2), on distingue deux protocoles : **FpC** et **FeC**. Ces protocoles, et le protocole pour les particules témoins, sont résumés ci-dessous :

- **Particules témoins** (sans rifamycine). Une solution acide de collagène diluée (0,2 mg/mL) est mise à fibriller sous des vapeurs d’ammoniac pendant une nuit. La solution est agitée fortement pour éviter la sédimentation et le grossissement des particules. Cette solution est ensuite dialysée contre de l’eau déionisée (ou du PBS) pour ôter l’ammoniaque.
- **Particules FpC**. Une solution acide de collagène diluée (0,2 mg/mL) est mise à fibriller sous des vapeurs d’ammoniac pendant une nuit. La solution est agitée fortement pour éviter la sédimentation et le grossissement des particules. Un excès de rifamycine ( $C_{\text{rifamycine}} = 0,1$  mg/mL) est ensuite solubilisé dans la solution alcaline de particules. Cette solution est remise sous vapeur d’ammoniac pour une dizaine d’heure (étape de conjugaison). Elle est finalement dialysée contre l’eau (ou le PBS) pour ôter l’ammoniaque et la rifamycine libre.
- **Particules FeC**. Un excès de rifamycine ( $C_{\text{rifamycine}} = 0,1$  mg/mL) est solubilisé dans une solution acide de collagène diluée (0,2 mg/mL). La solution collagène/rifamycine est ensuite mise sous des vapeurs d’ammoniac pendant une nuit. La fibrillation et la conjugaison ont alors lieu au même moment. La solution est agitée fortement pour éviter la sédimentation et le grossissement des particules. Cette solution est ensuite dialysée contre l’eau (ou le PBS) pour ôter l’ammoniaque et la rifamycine libre.

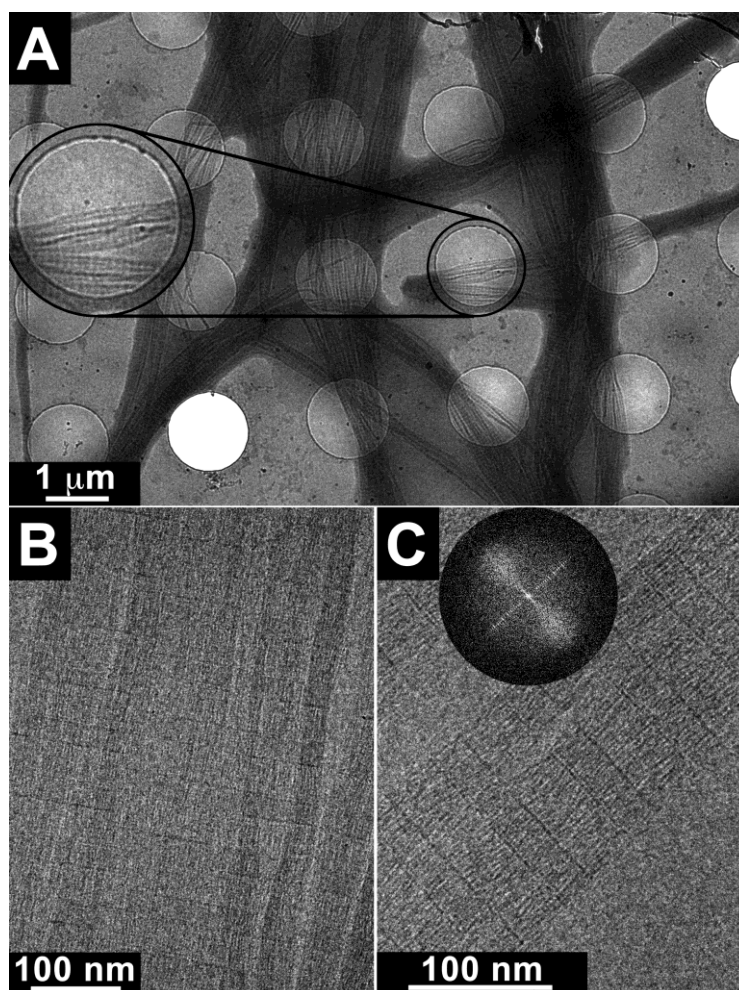
Ces solutions peuvent alors être observées en cryo-MET en suivant méthode décrite dans la partie I-chapitre 2.

Condition	Protocole	C <sub>collagène</sub> (mg/mL)	C <sub>rifamycine</sub> (mg/mL)
témoin	Sans rifamycine	0,2	0
p(FpC)	<b>FpC</b>	0,2	0,1
p(FeC)	<b>FeC</b>	0,2	0,1

*Tableau 1: Liste des conditions étudiées. Les concentrations indiquées (rifamycine et collagène) sont les concentrations initiales avant fibrillation et dialyse.*

II – Observation des particules de collagène conjugué rifamycine en cryo-MET.

1 – Particules témoins (sans rifamycine).

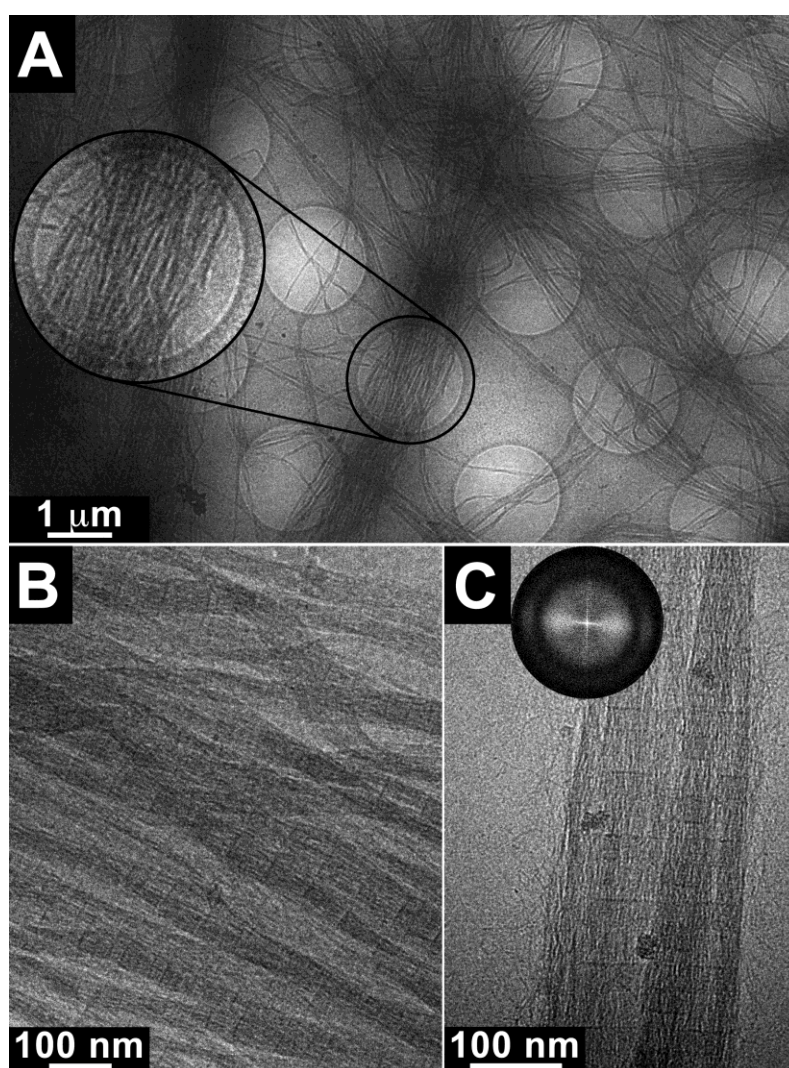


*Figure 1: Particules témoins observées en cryo-MET. En A, on distingue des amas de fibrilles qui présentent la striation caractéristique du collagène (période D). En B et en C, à fort grossissement, on distingue les molécules mises en registre. En C, la transformée de Fourier de l'image a été ajoutée en encart.*

En cryo-MET, on observe un mélange polydisperse de particules allant de la fibrille unique aux amas de fibrilles enchevêtrées (voir figure 1). Ces fibrilles présentent toutes la striation caractéristique du collagène, la période D. A fort grossissement, on distingue même les molécules de collagène mises en registre ainsi que les sous striations de la période D. La transformée de Fourier de l'image (voir encart de la figure 1 - C) montre :

- Transversalement, un degré d'ordre relatif des molécules au sein de la fibrille.
- Axialement, un haut degré de mise en registre des molécules avec des taches de diffraction correspondantes très fines et intenses.

## 2 – Particules p(FeC).



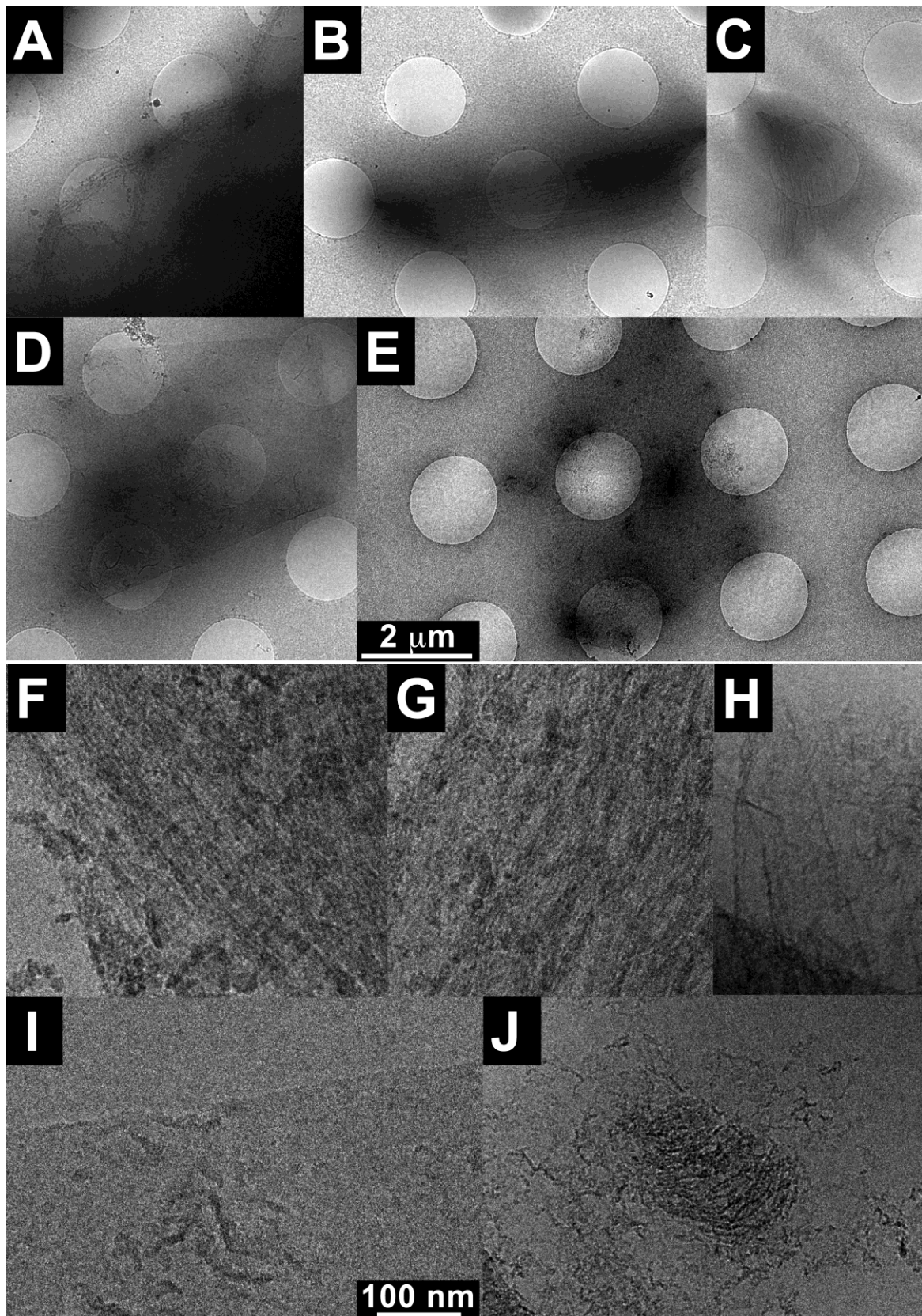
*Figure 2: Particules p(FeC) observées en cryo-MET. En A, on distingue des amas de fibrilles qui présentent la striation caractéristique du collagène (période D). En B et en C, à fort grossissement, on distingue les molécules mises en registre. Sur l'image C, on note la présence de petits objets sphériques et sombres sur les fibrilles qui pourraient être des agrégats de rifamycine. En C, la transformée de Fourier de l'image a été ajoutée en encart.*

En cryo-MET, l'échantillon p(**FeC**) est morphologiquement similaire à l'échantillon témoin : on observe un mélange polydisperse de particules allant de la fibrille unique aux amas de fibrilles enchevêtrées (voir figure 2). Ces fibrilles présentent toutes la striation caractéristique du collagène, la période D.

A fort grossissement, on distingue même les molécules de collagène mises en registre. Sur certaines fibrilles, on note également la présence de petits objets sphériques et électroniquement plus dense qui pourraient correspondre à des agrégats de rifamycine.

La transformée de Fourier montre un degré d'ordre latéral un peu plus large et donc dégradé par rapport aux fibrilles de l'échantillon témoin. Axialement, les taches de diffraction sont également un peu plus larges et bruitées que dans la condition test sans rifamycine.

3 – Particules p(FpC).



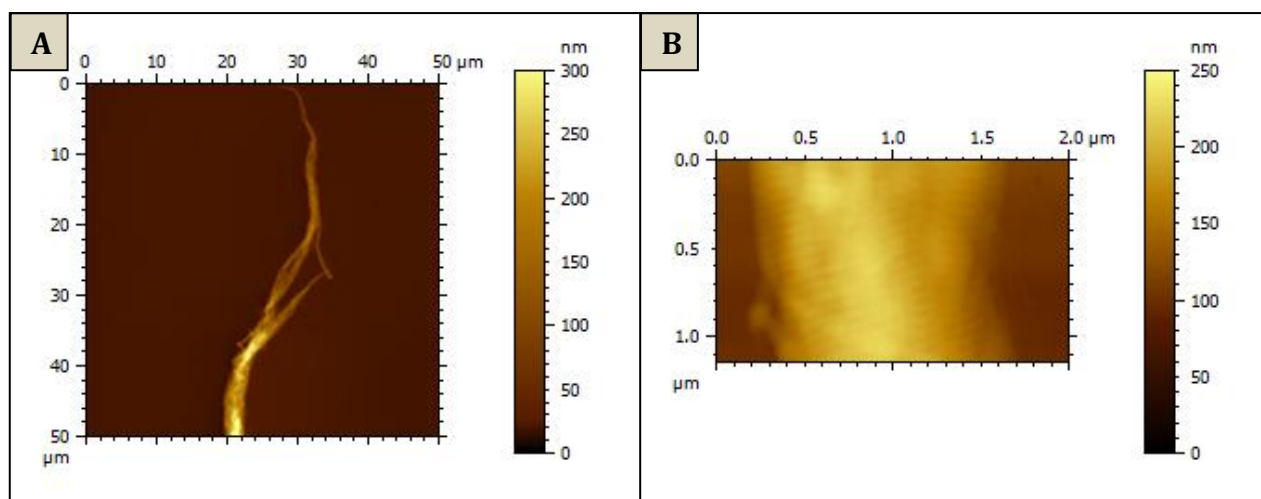
*Figure 3 : Observation en cryo-MET de l'échantillon p(FpC). La description de ces images est indiquée ci-dessous.*

L'échantillon p(**FpC**) se distingue dramatiquement des deux précédents. D'un point de vue morphologique, cet échantillon est riche (voir figure 3) puisque nous avons observé :

- des fibrilles et des agrégats de fibrilles de collagène classique (non montré) similaire aux particules des échantillons témoins et p(**FeC**).
- des agrégats polydisperses de fibrilles débobinées ou mal définies (voir figure 3 – A, B, C). A fort grossissement, on ne distingue pas toujours ou mal (voir figure 3 – F) la période D mais les molécules de collagène semblent être alignées (voir figure 3 – F, G).
- des feuillets peu denses dont certains comportent des structures fibrillaires (voir figure 3 – D, E). A fort grossissement, nous n'avons pas pu mettre en évidence la structuration du collagène dans les feuillets (voir figure 3 – H, I). En J, on distingue une zone fibrillaire au sein d'un feuillet.

### III – Observation des particules de collagène conjugué rifamycine par AFMIR.

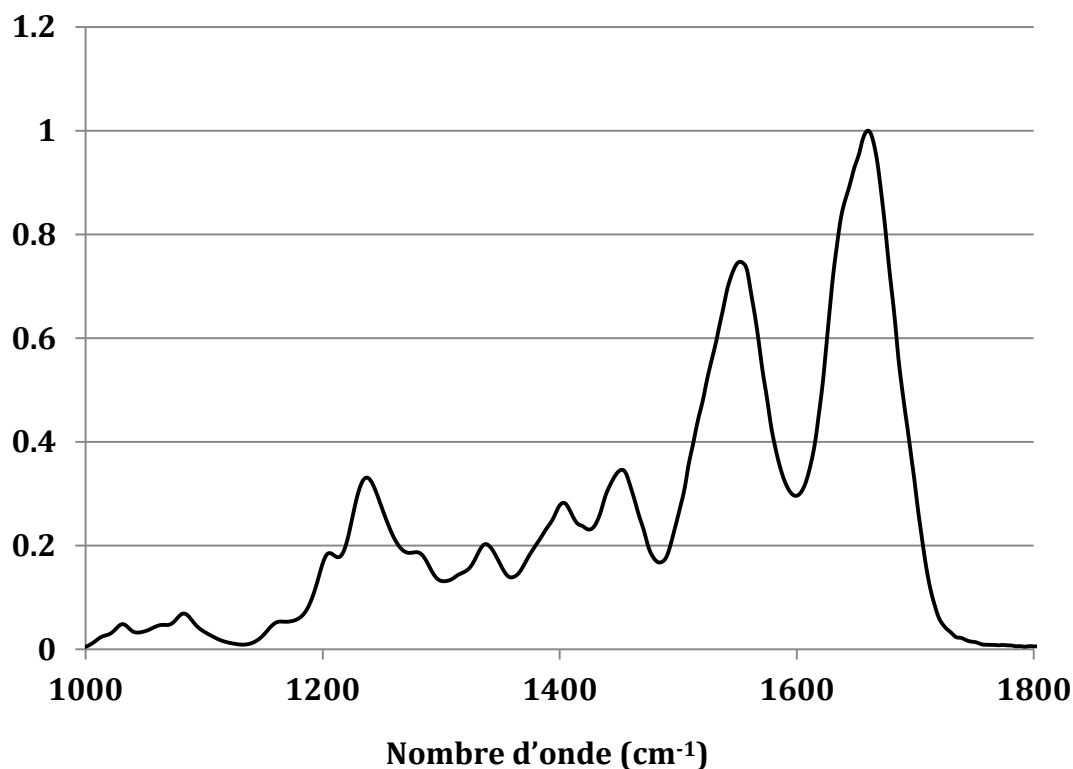
#### 1 – Particules témoins (sans rifamycine).



*Figure 4: Images topographiques d'une particule témoin (sans rifamycine) obtenues par AFMIR. Comme en cryo-MET, nous avons observé un mélange polydisperse de fibrilles et d'agrégats de fibrilles (A). En B, sur un champ de vue plus restreint, on distingue même la période D caractéristique du collagène.*

L'observation par AFMIR de l'échantillon témoin confirme nos précédentes observations faites en cryo-MET : les particules, de taille variable, sont constituées de fibrilles de collagène bien définies présentant la période D caractéristique (voir figure 4).

Des spectres infrarouges ont été enregistrés régulièrement le long de plusieurs fibrilles (voir figure 5). On constate que l'ensemble de ces spectres est identique, c'est à dire que l'échantillon est spectralement homogène.



*Figure 5: Spectre infrarouge de particules témoins (sans rifamycine) obtenu par FTIR. Ce spectre est semblable au spectre observé localement par AFMIR. Les particules témoins sont spectralement homogènes. On constate la présence de deux pics intenses, caractéristiques du collagène, à 1551 et à 1660  $\text{cm}^{-1}$ .*

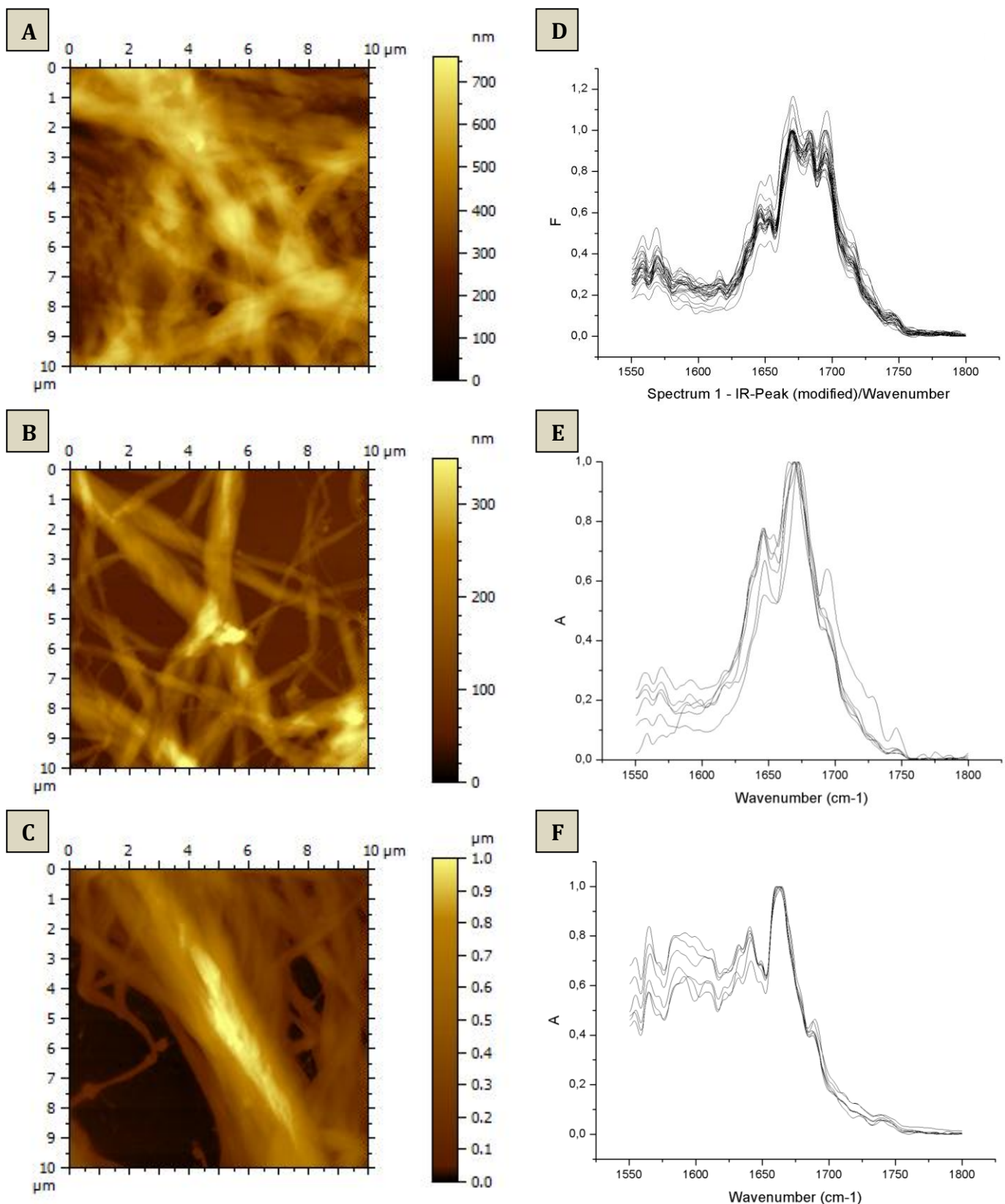
## 2 – Particules p(FeC).

Morphologiquement, les particules p(FeC) sont identiques aux particules témoins : ce sont des particules de taille variable constituée de fibrilles de collagène bien définies et présentant la période D caractéristique (voir figure 6). Là encore, on confirme les observations préalables effectuées en cryo-TEM.

Cependant, on observe une forte hétérogénéité spectrale en passant d'une fibrille à une autre. Cette hétérogénéité peut avoir deux origines :

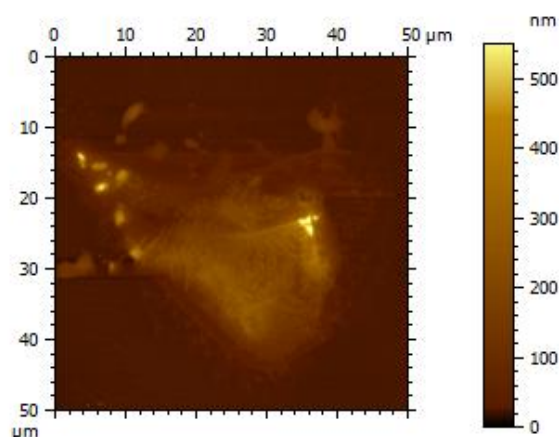
- **Chimique.** La rifamycine a pu se lier à acides aminés de nature variée, formant ainsi des résidus chimiquement différents. Il est également possible que la répartition des résidus rifamycine sur le collagène ne soit pas uniforme.
- **Structurale.** La conjugaison de la rifamycine peut induire, localement, un changement de conformation du collagène.





**Figure 6:** Images topographiques (A, B, C) et spectres IR (D, E, F) de particules  $p(\text{FeC})$  obtenus par AFMIR. Morphologiquement, les particules  $p(\text{FeC})$  sont identiques aux particules témoins : ce sont des particules de taille variable constituée de fibrilles de collagène bien définies et présentant la période  $D$  caractéristique (non montrée). Cependant, ces fibrilles sont spectralement très hétérogène. Sur la partie droite de la figure, ont été représenté en D, E et F les spectres infrarouge respectifs des fibrilles imagées en A, B et C. Localement, ces spectres sont similaires mais on observe une forte disparité en passant d'une particule à une autre.

### 3 – Particules p(**FpC**).

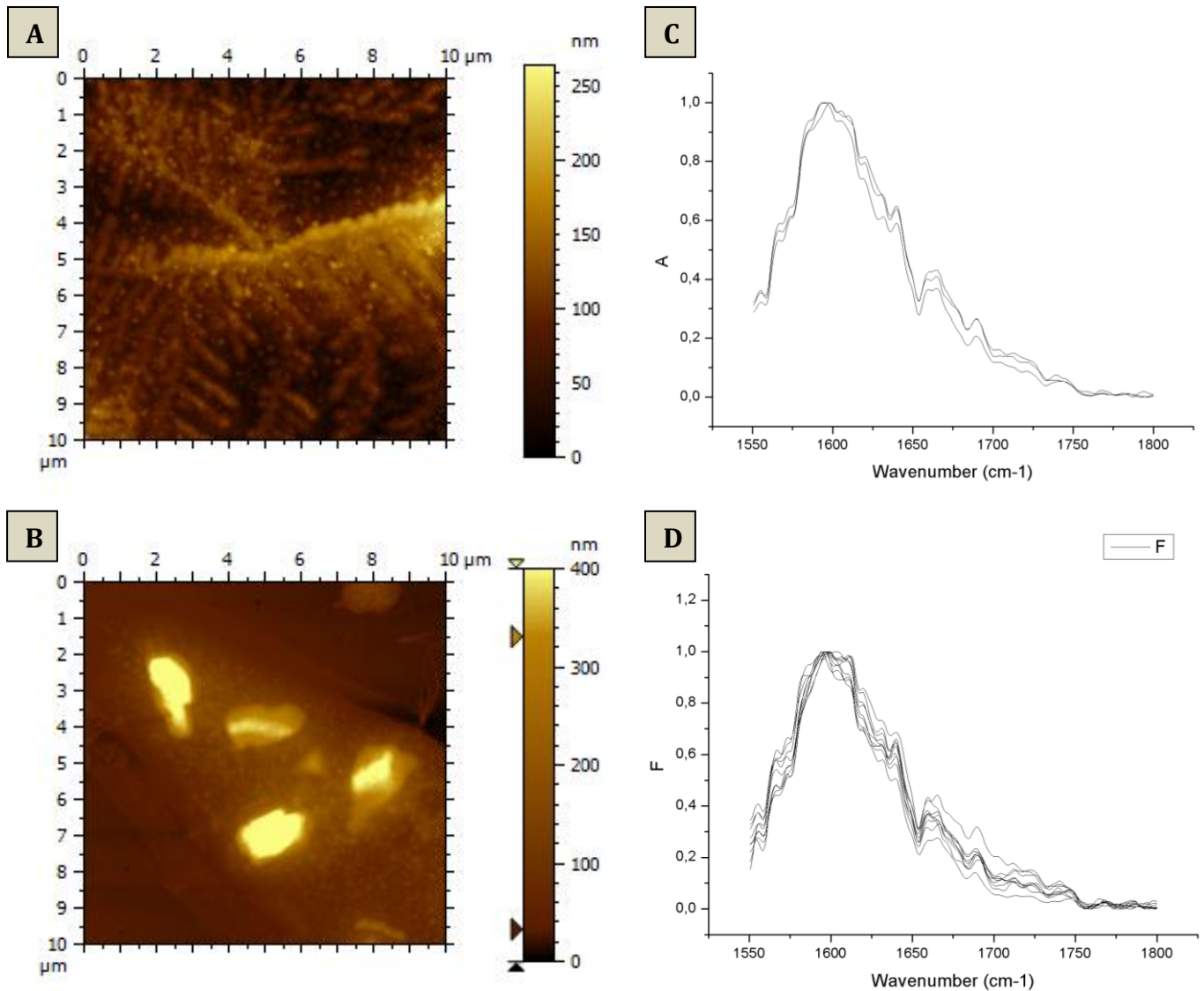


*Figure 7: Image topographique d'une particule p(FpC) obtenue par AFMIR. Comme en cryo-TEM, les particules sont morphologiquement très différentes. Sur cette image, on observe par exemple un feuillet de collagène. Au sein de ce feuillet, on distingue différentes structurations (voir figure 8).*

Les observations par AFMIR et en cryo-MET des particules p(**FpC**) sont cohérentes. La morphologie des particules p(**FpC**) est très variée et on confirme la présence de feuillets qu'on peut assurément associer au collagène (voir figure 7). La structuration de ces feuillets n'est d'ailleurs pas homogène puisqu'on observe la présence d'agrégats de taille variable et de zones fibrillées au sein du même feuillet (voir figure 8).

Toutefois, à la différence de p(**FeC**) et malgré des morphologies très variées, l'échantillon p(**FpC**) est spectralement homogène et ce spectre diffère fortement du spectre de l'échantillon témoin (voir figure 8 – C, D). En particulier, on constate un déplacement du pic du collagène vers des nombres d'onde plus bas. Ce déplacement peut s'expliquer par :

- la formation d'un nouvel assemblage de collagène (feuillet).
- un changement de conformation des molécules de collagène



**Figure 8:** Images topographiques (A, B) et spectres IR (C, D) de particules p(FpC) obtenus par AFMIR. Ces images ont été prises sur le même feuillet de collagène. Elles illustrent les différentes structurations observées au sein de ces feuillets. En A, nous avons zoomé sur une zone fibrillaire alors qu'en B, on distingue de gros agrégats au milieu du feuillet. Sur la partie droite de la figure, ont été représenté en C et D les spectres infrarouge respectifs des fibrilles imagées en A et B. On constate que le feuillet est spectralement homogène et que le pic du collagène est déplacé vers les bas nombres d'onde.

#### IV – Discussion.

Nous avons étudié l'impact de la conjugaison de la rifamycine sur la structure des fibrilles de collagène en utilisant un système dilué. Ce système présente l'avantage de pouvoir être directement observé en cryo-TEM et par AFMIR. Il nous a également permis de mettre en évidence des différences dramatiques entre les protocoles **FeC** et **FpC**.

En effet, morphologiquement, le protocole **FeC** n'induit qu'un désordre relatif au sein de la structure des fibrilles de collagène. Les particules p(**FeC**) sont

constitués de fibrilles organisées présentant la striation caractéristique du collagène, la période D. Cette striation a d'ailleurs été observée à la fois en cryo-MET et par AFM.

D'un autre côté, le protocole **FpC** induit, quant à lui, une désagrégation progressive des fibrilles et la formation d'un nouvel assemblage bidimensionnel : les feuillets de collagène. La présence des feuillets est à la fois confirmée en cryo-MET et par AFM. A ma connaissance, cet assemblage n'a jamais été décrit pour le collagène de type I. Concernant la structuration du collagène au sein des feuillets, on constate tout d'abord une absence de la période D ou de toute autre type de périodicité. Plus précisément, si une périodicité existe, nous n'avons pas été en mesure de l'observer sur notre microscope et dans les conditions expérimentales utilisées. De plus, les images en AFM ont mis en évidence des structures variées (zones fibrillaires, agrégats polydisperses...) au sein d'un même feuillet.

Nous avons également caractérisé chimiquement les particules en enregistrant localement leur spectre infrarouge. Là encore, les protocoles **FeC** et **FpC** se démarquent radicalement :

- Les particules p(**FeC**) sont **spectralement hétérogènes**. En passant d'une fibrille à une autre, on observe des spectres infrarouges totalement différents.
- Les particules p(**FpC**) sont quant à elles **spectralement homogènes** sur l'ensemble des structures observées.

Ces observations nous permettent d'émettre quelques hypothèses sur les mécanismes des deux protocoles de conjugaison.

Rappelons tout d'abord que le protocole **FpC** consiste à conjuguer la rifamycine sur des molécules de collagène déjà fibrillées. Comme indiqué précédemment, la fibrille est un assemblage dense et bien organisé (cf Partie II - Chapitre 3). Le nombre de sites accessibles à la rifamycine est donc assez limité ce qui pourrait expliquer l'homogénéité spectrale des particules p(**FpC**).

On peut distinguer deux types de sites de fixation pour la rifamycine :

- Les acides aminés en surface de la fibrille.
- Les acides aminés situés dans les « gaps » entre les molécules de collagène.

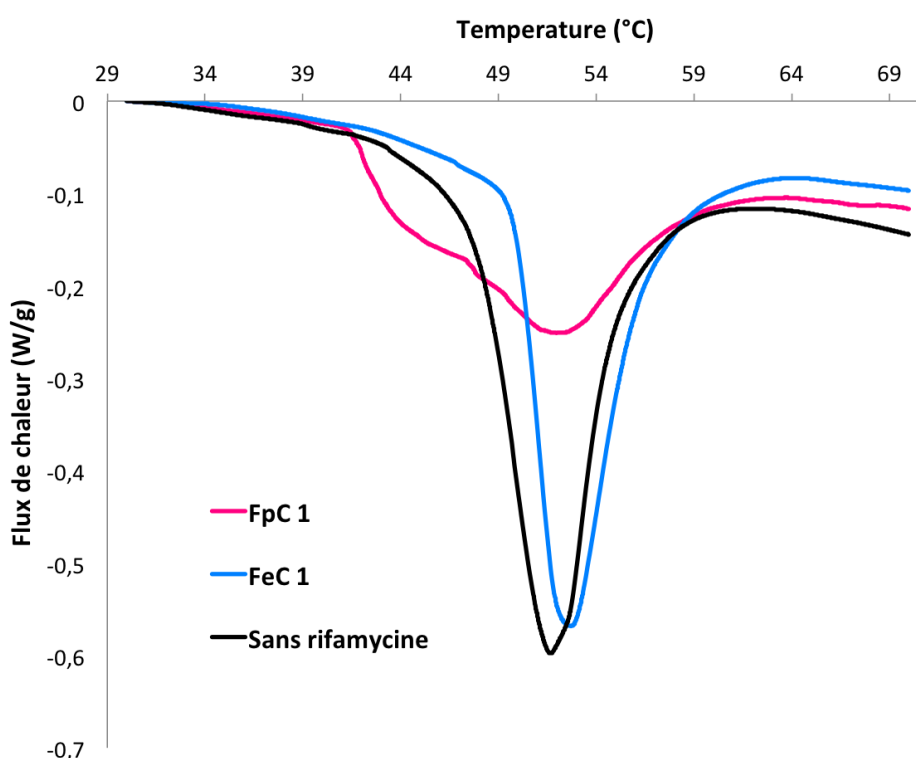
Or nous savons que la conjugaison de la rifamycine déstabilise la fibrille et induit la formation de feuillets. Les sites de fixation les plus probables semblent donc situés dans les « gaps ». En effet, la liaison de l'antibiotique au sein de la fibrille perturbe *a priori* plus les interactions entre molécules de collagène que la liaison en surface. Le protocole **FpC** serait par conséquent un protocole régiosélectif.

Intéressons-nous à présent au protocole **FeC** où la rifamycine est ajoutée à la solution acide de collagène avant d'induire simultanément la fibrillogenèse et la conjugaison. La fibrillogenèse est un processus assez lent qui passe tout d'abord par la formation de microfibrilles (cf Partie II - Chapitre 3). Dans un premier temps, la rifamycine peut donc se fixer sur n'importe lequel des acides aminés du collagène. La multiplicité des sites de fixation permet d'expliquer

l'hétérogénéité spectrale des particules p(**FeC**). Le plus surprenant est que le protocole **FeC** puisse cependant donner des fibrilles presque identiques à celles de l'échantillon témoin.

#### V – Comparaison des gels et des particules de collagène conjugué rifamycine.

Les informations ou conclusions tirées de l'étude des particules de collagène conjugués rifamycine ne peuvent pas être directement transposées aux gels. Toutefois, elles nous permettent de soutenir des hypothèses déjà émises au cours du dernier chapitre.



**Figure 9 :** Thermogramme des gels FpC 1 et FeC 1 et du gel témoin sans rifamycine. Les gels ont tous été équilibrés, au préalable, dans le PBS 1X. Les thermogrammes du gel témoin et de FeC 1 comportent un seul pic lié à la dénaturation des fibrilles de collagène. Ce pic de dénaturation est similaire pour les deux gels. Pour le gel FpC 1, par contre, on note la présence de deux pics convolués.

En particulier, nous avons observé que les gels **FpC**, équilibrés dans le PBS, présentent deux pics de dénaturation (voir figure 9) :

- Un pic à plus haute température qui correspond au pic de dénaturation des fibrilles de collagène sans rifamycine.
- Un pic à basse température qui pourrait correspondre à un nouvel assemblage de collagène.

Or, pour le système dilué, nous avons démontré que le protocole **FpC** induit une déstabilisation des fibrilles et une formation de feuillets. Ces feuillets

pourraient donc être le nouvel assemblage observé sur le thermogramme des gels **FpC**. La formation de ces feuillets peu denses et mal définis pourrait également expliquer pourquoi les gels **FpC** ont des propriétés mécaniques plus faibles que les gels témoins.

L'étude des particules **FeC** a, quant à elle, démontré que ce protocole n'altère pas, ou peu, la formation des fibrilles. C'est pour cette raison que les gels **FeC** et les gels témoins ont des propriétés mécaniques et des thermogrammes similaires avant la première descente en pH.

Nous avons donc démontré que les deux protocoles, **FeC** et **FpC**, sont à l'origine de gels dont la structure (fibrille, feuillets, etc.) et les propriétés (mécaniques, biologiques, etc.) sont différentes. Cependant, après une première descente en pH et la perte du collagène peu conjugué, nous avons également observé que les disparités entre les deux types de gels, d'un point de vue rhéologique, disparaissent. Est ce que les gels tendent vers une structure commune suite à la perte du collagène peu conjugué ? Dans le cas des gels **FeC**, est ce que la fibrillogenèse continue à s'opérer normalement après un cycle « neutre/acide » ?

## VI – Conclusions et perspectives.

L'étude des particules de collagène conjugué rifamycine a confirmé que les protocoles **FpC** et **FeC** induisent la formation d'objets chimiquement et structurellement très différent.

Dans le cas des particules **FpC**, nous avons également identifié un assemblage inédit, totalement inattendu et tout à fait particulier des molécules de collagène : le feuillet. Cet assemblage pourrait expliquer la présence du second pic de dénaturation pour les gels **FpC** ainsi que ses propriétés mécaniques. Si il se révélait organisé, ce nouvel assemblage pourrait, par la suite, être exploité afin de déterminer la structure à haute résolution du collagène par cryo-microscopie électronique.

L'étude de ces systèmes dilués ouvre de nombreuses perspectives à ce travail :

- Il faut pousser la caractérisation des structures observées dans les feuillets. En particulier, nous aimerions comprendre comment s'associe le collagène au sein de ses assemblages bidimensionnels.
- Il faut isoler un pic IR caractéristique des résidus rifamycine afin de cartographier sa présence sur les particules.
- La structure des systèmes dilués en milieu acide doit également être caractérisée à l'aide de différentes techniques. En particulier, il serait intéressant d'observer ces systèmes en dichroïsme circulaire afin de déterminer si la conjugaison a un effet sur la conformation en triple hélice du collagène.
- etc.



## Partie C – Conclusions et perspectives.

Le but de notre projet et de cette collaboration était de synthétiser un gel de collagène contenant un antibiotique fortement lié afin que la libération de cet antibiotique repose sur la dégradation du collagène. Ce mode de libération évite un relargage rapide et aigu de l'antibiotique. Il permet également, dans le cas du collagène, de moduler la libération de l'antibiotique en fonction de l'état d'inflammation de la plaie. En effet, plus le site lésé est enflammé et plus la concentration en collagénase sera élevée (cf Partie C – Chapitre 1).

Au cours du chapitre 2, nous avons présenté deux protocoles afin de lier efficacement la rifamycine SV au collagène. L'antibiotique, coloré, reste présent dans les gels, même après de longues phases de lavage (3 mois !). Nous avons également démontré, dans le cas du protocole **FeC**, que la réaction de liaison/conjugaison n'altère pas totalement les propriétés antibiotiques de la rifamycine. Ces propriétés antibiotiques ne sont d'ailleurs observées que dans le cas d'un clivage enzymatique du gel de collagène. Nous avons donc obtenu l'objet désiré !

Toutefois, en plus des propriétés initialement recherchées, nous avons constaté que nos gels de collagène présentent des caractéristiques originales. En effet, les gels préparés avec les protocoles **FpC** et **FeC** ne sont plus solubles en milieu très acide (pH = 2). De plus, nous avons démontré que le transfert entre un milieu à pH acide et un milieu à pH neutre est réversible. Les matrices collagène/rifamycine semblent donc être des gels physiques dont la cohésion repose sur des assemblages différents en fonction du pH. Les propriétés (gonflement, transparence) de ces gels variant également avec le pH, les gels collagène/rifamycine sont par conséquent des systèmes sensibles au pH.

Enfin, l'étude de système dilué collagène/rifamycine, au cours du chapitre 3, nous a permis de cerner un peu mieux la structure du collagène au sein des différents gels. Nous avons ainsi confirmé que les deux protocoles sont à l'origine d'assemblages de collagène très différents à pH neutre. La nature de ces assemblages semble être liée au site de fixation de la rifamycine. De plus, cette étude a également mis en évidence un nouveau type d'association pour le collagène de type I : les feuilletts.

Les perspectives pour ces gels sont nombreuses et peuvent concerner autant des biologistes que des physico-chimiques :

- Caractérisation fine des propriétés des gels (rhéologie, transparence, structure, etc.) en fonction du pH.
- Mise en évidence du mécanisme de liaison de la rifamycine SV sur le collagène.
- Etude à haute résolution de la structure des feuilletts de collagène.
- Etude *in vitro* de l'interaction gel/cellule en fonction du pH en utilisant différents types cellulaires (fibroblastes, cellule de la muqueuse gastrique, etc.).
- Etude thermodynamique et théorique avec modélisation du changement de réseau en fonction du pH.



Enfin, étant un peu lié à la gélatine à présent, je ne peux m'empêcher de penser qu'il serait pertinent de s'intéresser aux éventuelles réactions de conjugaison entre la gélatine et la rifamycine. Nos tentatives préliminaires n'ont pas montré de fixation efficace de l'antibiotique sur la gélatine lorsque nous avons utilisé les protocoles **FpC** ou **FeC** mais ces expériences nécessitent d'être répétées. Dans le cas d'un nouvel échec, ces expériences pourraient également nous apporter des indices complémentaires sur le mécanisme d'association du collagène et de la rifamycine (nécessité d'avoir une triple hélice ou non).



## Conclusions générales et perspectives.

« Vous arrivez devant la Nature avec des théories,  
la Nature flanque tout par terre » *P. A. Renoir*

Le but initial de ma thèse était d'étudier la structure de phase dense collagène/gélatine à l'aide de microscopie à lumière polarisée et de la microscopie SHG. Nous sommes partis d'une mésophase de collagène de structure connue (contre-plaqué) et y avons progressivement ajouté de la gélatine. Nous souhaitions déterminer le ratio à partir duquel la structure en contre-plaqué disparaît. Nous avons ainsi démontré qu'il est possible d'ajouter jusqu'à 20% de gélatine sans perturber l'auto-association du collagène.

En poursuivant nos ajouts de gélatine, nous avons également mis en évidence des structures originales. Pour des ratios de gélatine compris entre 75% et 95%, nous avons observé une ségrégation de phase collagène/gélatine : la phase riche en collagène est constituée de tactoïdes nématiques dispersés au sein d'une matrice biréfringente riche en gélatine. L'organisation au sein de la phase riche en gélatine n'a toutefois pas pu être observée.

Quant aux phases denses dont le ratio en gélatine est compris entre 25% et 75%, nos observations ne nous ont pas permis de décrire précisément leur structure. Toutefois, les mélanges sont biréfringents et nous avons constaté la présence de domaines localement organisés en P-SHG. Notre étude de matrices collagène/gélatine fibrillées semble indiquer, pour ces ratios, que les phases denses sont constituées de deux phases continues : une phase riche en collagène et une phase riche en gélatine. L'origine de la ségrégation collagène/gélatine n'est cependant pas encore comprise.

Enfin, nous avons également démontré que la gélatine seule, dans certaines conditions physico-chimiques, est capable de former des mésophases. A notre connaissance, ce comportement de la gélatine n'a encore jamais été reporté.

Nous avons ainsi pu construire un premier diagramme de phase pour les phases denses collagène/gélatine.

\*\*\*

Des mélanges concentrés collagène/gélatine ont ensuite été fibrillés afin d'obtenir des matériaux denses et organisés. Nous avons pu étudier leur structure aux échelles micro, méso et macroscopique en corrélant des observations de MET, SHG et IRM. Les matrices denses collagène/gélatine se sont révélées être toutes hétérogènes. En effet, nous avons observé une ségrégation de phase collagène/gélatine observable à toutes les échelles et rappelant par là une structure fractale. La ségrégation de phase apporte par conséquent un niveau de structuration supplémentaire à nos matériaux. Concernant le collagène, nous avons démontré, pour chaque mélange collagène/gélatine, que les fibrilles sont alignées au sein de domaines de taille micrométrique. L'organisation de la gélatine n'a, quant à elle, pas pu être mise en évidence.

La dénaturation des triples hélices au sein des matériaux collagène/gélatine a également été étudiée par DSC. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une interaction spécifique entre le collagène fibrillé et la gélatine. Cette interaction augmente la température de dénaturation de ces deux molécules. Par conséquent, plus on augmente le ratio en gélatine dans nos matériaux et plus les fibrilles de collagène sont thermiquement stables ! Là encore, à notre connaissance, ce type d'interaction n'a jamais été rapporté dans la littérature.

\*\*\*

Concernant les gels collagène/rifamycine, le but de la collaboration France-Argentine était de synthétiser un gel de collagène capable de libérer un antibiotique de manière contrôlée pour traiter les plaies chroniques. Nous souhaitons également que le stimulus responsable du relargage soit lié à l'état d'inflammation de la plaie.

Nous avons ainsi élaboré deux protocoles afin de lier efficacement la rifamycine SV au collagène. Si la formation d'une liaison covalente collagène-rifamycine n'a pu être démontré, nos gels ont toutefois gardés une teinte orange prononcée même après plusieurs mois de lavage. Nous avons démontré, dans le cas du protocole **FeC**, que la réaction de liaison/conjugaison n'altère pas totalement les propriétés antibiotiques de la rifamycine. Ces propriétés antibiotiques ne sont d'ailleurs observées que dans le cas d'un clivage enzymatique du gel de collagène. Or, dans une plaie, la concentration en collagénase est directement reliée aux nombres de neutrophiles et macrophages, c'est à dire à la réponse inflammatoire. Nous avons donc obtenu l'objet désiré !

\*\*\*

En plus des propriétés initialement recherchées, nous avons constaté que nos gels de collagène présentent des caractéristiques originales. En effet, les gels préparés avec les protocoles **FpC** et **FeC** ne sont plus solubles en milieu très acide (pH = 2). De plus, nous avons démontré que le transfert entre un milieu à pH acide et un milieu à pH neutre est réversible. Les matrices collagène/rifamycine semblent donc être des gels physiques dont la cohésion repose sur des assemblages différents en fonction du pH. Les propriétés (gonflement, transparence) de ces gels varient également avec le pH, les gels collagène/rifamycine sont par conséquent des systèmes sensibles au pH.

\*\*\*

Enfin, l'étude de système dilué collagène/rifamycine nous a permis de cerner un peu mieux la structure du collagène au sein des différents gels. Nous avons ainsi confirmé que les deux protocoles sont à l'origine d'assemblages de collagène très différents à pH neutre. La nature de ces assemblages semble être liée au site de fixation de la rifamycine. De plus, cette étude a également mis en évidence un nouveau type d'association pour le collagène de type I : des feuilletts bidimensionnelles.

\*\*\*

Concernant les perspectives suite à cette thèse, elles sont riches et variées. Tout d'abord, si la structure des matériaux que j'ai synthétisé a été caractérisée, nous n'avons pas eu l'opportunité d'évaluer leur interaction avec des cellules.

Cette démarche s'avère d'autant plus intéressante pour les matrices collagène/gélatine où il est *a priori* possible de libérer une porosité de taille micrométrique dans des conditions physiologiques. On pourrait alors envisagé une colonisation rapide et uniforme de nos matrices denses et organisées ; un des points faibles actuellement des matrices denses ne contenant que du collagène.

La répartition des phases riches en collagène et en gélatine étant hétérogène au sein des matériaux collagène/gélatine, on peut également envisager de les utiliser comme des interfaces entre des tissus présentant des propriétés (mécanique, chimiques, etc.) différentes (ex: jonction ostéo-tendineuse).

Les gels rifamycine/collagène, quant à eux, pourraient maintenant être combiné à des particules de silice chargées en antibiotique afin d'obtenir un système de libération d'antibiotique dont la cinétique serait double. Nous pourrions même induire un relargage des particules de silice en fonction du pH grâce à la solubilisation des fibrilles.

Les idées ne manquent pas, seulement le temps pour les appliquer. Je souhaite, en tout cas, que ce travail puisse servir à bien d'autres à l'avenir.



## **Annexes**

## **Annexe 1 : Protocole d'extraction du collagène I à partir de tendons de queues de rat.**

L'extraction et la manipulation du collagène sont réalisées dans une pièce dédiée à cette usage afin de limiter les risques de contaminations chimique ou biologique. La température dans cette salle est contrôlée et maintenue à 20°C pour éviter toute dénaturation du collagène soluble.

### **I – Prélèvement des tendons.**

La dissection des queues de rat a lieu sous une hotte à flux laminaire préalablement stérilisée. Les queues de rats sont mises à décongeler sur un lit de glace pour éviter une remontée en température trop brutale. Pour obtenir un batch d'environ deux litres de collagène, nous utilisons entre 35 et 40 queues de rats. Dans la mesure du possible, nous avons essayé de prélever des tendons provenant d'une seule et même espèce de rat. Le prélèvement s'opère de la manière suivante :

- En utilisant une pince coupe-ongle, on serre délicatement la queue à 1cm de son extrémité distale. On cherche à couper le derme sans sectionner les tendons.
- On applique ensuite un mouvement de rotation pour briser les vertèbres. L'extrémité n'est alors reliée que par les tendons au reste de la queue.
- On éloigne ensuite progressivement le corps de la queue pour extirper les tendons tout en entretenant le mouvement de rotation. On obtient ainsi une torsade de tendons. Cette torsade est sectionnée au niveau de l'extrémité et placée dans un bain de PBS 1X stérile pour éviter son dessèchement. Ce bain fait également office de premier bain de lavage.
- On recommence cette opération tous les centimètres avant de s'arrêter au niveau des tronçons trop riches en vaisseaux sanguins. En général, on n'extrait pas les tendons situés dans les 4/5 derniers centimètres de la queue (portion proximale).

### **II – Lavage des tendons.**

Après la dissection, les tendons sont lavés plusieurs fois avec du PBS 1X. On les transvase en fait dans des tubes de centrifugation remplis de PBS 1X stérile puis on les centrifuge 5 minutes à 2000 g. Le surnageant, contenant le sang résiduel, est ensuite jeté et remplacé par un volume équivalent de PBS 1X stérile. Cette étape est réitérée jusqu'à l'obtention d'un surnageant limpide et incolore.

Les tendons sont alors rincés dans une solution concentrée de NaCl (4 M) dans le but de déshydrater et de détruire les cellules. La solution de NaCl est ajoutée en lieu et place du PBS 1X et on centrifuge à nouveau les tendons pour 5 minutes à 2000 g. Cette étape est effectuée deux fois.

Enfin, les tendons sont à nouveau lavés plusieurs fois dans le PBS 1X stérile afin d'ôter l'excès de sel ainsi que les débris cellulaires.



### III – Solubilisation du collagène.

Suite à la dernière étape de centrifugation, le surnageant est jeté et les tendons sont rapidement pesés dans un bécher stérile avant de les couvrir d'une solution stérile d'acide acétique 500 mM. Typiquement, en solubilisant 30 grammes de tendons dans 2,5 litres d'acide acétique, on obtient une solution modérément visqueuse après 24h d'agitation. Cette solution contient encore quelques fibres insolubles qui sont écartées par ultra-centrifugation : la solution est mise à centrifuger pendant 2h30, à 45 000 g, et on ne conserve que le surnageant.

### IV – Purification du collagène.

On ôte tout d'abord les polyélectrolytes/macromolécules de haut poids moléculaire (> 300 000 Da) par une première précipitation saline. Une solution concentrée en NaCl (4 M) est ajoutée de manière à fixer la concentration finale en NaCl à 300 mM dans la solution de tendons. On observe la formation d'un précipité gélatineux incolore et quasi-transparent qui est écarté par une étape d'ultra-centrifugation (2h30 à 45 000 g).

Le surnageant est récupéré et on effectue une seconde étape de précipitation saline. Un nouveau volume de NaCl concentrée (4 M) est additionné afin d'obtenir une concentration finale en NaCl de 600 mM. On assiste alors à la précipitation du collagène qui forme de fines particules blanches : la solution prend un aspect laiteux et perd sa viscosité. Après ajout du sel, la solution est mise à agiter pendant une nuit. Le lendemain, on récupère le collagène en centrifugeant la solution laiteuse pendant 45 minutes à 5000 g : les particules de collagène forment un culot blanc et assez dense tandis que le surnageant est censé être limpide et incolore.

Les culots sont prélevés et resolubilisés dans une solution d'acide acétique 500 mM (agitation pendant 1 nuit). Pour obtenir une solution de collagène entre 2 et 3 mg/mL, on disperse 200 g de culot dans environ 1,8 L d'acide acétique.

La solution de collagène est ensuite dialysée contre l'acide acétique 500 mM pour ôter l'excédent de NaCl. Généralement, nous dialysons 250 mL de solution de collagène dans 5 bains de 2 L d'acide acétique 500 mM. Les membranes de dialyse utilisées ont une porosité de 12 kDa (Cellulose régénérée, Spectrum Labs).

Enfin, après dialyse, la solution est centrifugée une dernière fois pendant 3h30 à 45 000 g afin d'écartier les agrégats non solubles. Elle est finalement aliquotée (tubes de 50 mL) et stockée à 4°C.

## Annexe 2 : Dosage chimique des solutions de collagène.

### I – Principe du dosage

Contrairement aux autres protéines, le collagène ne peut pas être directement quantifié par spectrométrie UV-visible. Il contient très peu de résidus aromatiques (voir figure 3). Par contre, l'hydroxylation des prolines est spécifique de la superfamille des collagènes. On dose donc le collagène en dosant ses résidus d'hydroxyproline.

La première étape consiste à hydrolyser totalement le collagène en milieu acide. L'hydroxyproline libérée est ensuite oxydée en pyrrole par l'action de la chloramine T. Cette réaction d'oxydation est stoppée par l'ajout d'un excès d'acide perchlorique. Finalement, on forme un complexe coloré (rose fuchsia) en faisant réagir le pyrrole avec du DMBA (diméthylbenzaldéhyde). L'absorbance du complexe à 557 nm nous permet de remonter à sa concentration grâce à la loi de Beer-Lambert et à une courbe étalon établie en parallèle avec des solutions d'hydroxyproline de concentration connue. Connaissant la composition en acides aminés du collagène, on obtient ainsi la concentration massique de ce dernier.

Cette méthode peut également être utilisée pour quantifier le collagène dans des matrices fibrillées. Toutefois, on obtiendra dans ce cas le pourcentage massique en collagène.

### II – Protocole du dosage.

#### 1 – Hydrolyse des échantillons.

Pour une solution diluée de collagène :

- Prélever 50  $\mu\text{L}$  de solution de collagène et peser précisément le volume déposée dans l'eppendorf.
- Ajouter une masse équivalente d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (37%) puis vortexer et centrifuger (quelques minutes à 5000 g). L'hydrolyse est catalysée en plaçant les eppendorfs, hermétiquement scellés, dans une étuve à 106°C pour la nuit.
- Au matin, on centrifuge à nouveau les eppendorfs puis on les ouvre et on les place à 106°C afin d'évaporer le solvant.
- Lorsque l'échantillon est sec, on observe la présence d'un précipité marron au fond de l'eppendorf.

#### 2 – Dosage de l'hydroxyproline.

- Les échantillons sont tout d'abord repris dans 1 mL d'eau déionisée (milli-Q) puis vortexés.
- Les échantillons sont ensuite dilués, avant d'être oxydés par la chloramine T et couplés au DMBA. Ces manipulations sont résumées de manière détaillée dans le tableau ci-dessous. La gamme étalon d'hydroxyproline est également réalisée à chaque dosage (contrôle).

- Suite à la réaction de couplage avec le DMBA, les eppendorfs sont mis au frigo pendant 5 minutes avant d'être analysés par spectrométrie UV-Visible. On enregistre en particulier l'absorbance de chaque solution à 557 nm. Le spectromètre utilisé est un Ultrospec 1100 Pro (Amersham Biosciences).

	Gamme étalon d'hydroxyproline à partir de la solution fille à 20 µg/mL					Echantillon collagène		
<b>Hydroxyproline ou échantillons (µL)</b>	0	40	80	100	140	20	40	80
<b>Eau milli-Q (µL)</b>	400	360	320	300	260	380	360	320
<b>Facteur de dilution</b>						0,02	0,04	0,08
<b>Chloramine T</b>	Ajouter 200 µL d'une solution de chloramine T dans chaque eppendorf, vortexer et laisser réagir pendant 20 minutes à température ambiante.							
<b>Acide perchlorique 3,15 M</b>	Ajouter 200 µL d'une solution d'acide perchlorique (3,15 M) dans chaque eppendorf, vortexer et laisser réagir pendant 5 minutes à température ambiante. Après 5 minutes, on observe souvent l'apparition d'un précipité blanc.							
<b>DMBA</b>	Ajouter 200 µL d'une solution de DMBA dans chaque eppendorf et vortexer. La solution prend alors une couleur jaune. Placer les tubes dans un bain-marie préalablement chauffé à 60°C et laisser réagir pendant 20 minutes. Les solutions riches en hydroxyproline prennent une teinte fuchsia.							

### III – Calcul de la concentration en collagène.

Le collagène contenant 13% d'hydroxyproline (pourcentage massique ou w%), on peut donc déterminer la quantité de collagène dans notre échantillon en appliquant la formule suivante :

$$w\%_{\text{collagène}} = \frac{C_{\text{hydroxyproline}}(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) \times F \times 7,6 \times 1(\text{mL})}{m_{\text{échantillon}}(\text{mg})}$$

avec :

- F, le facteur de dilution de l'échantillon.

- $C_{\text{hydroxyproline}}$ , la concentration en hydroxyproline dans l'échantillon dilué est déterminée en utilisant la loi de Beer-Lambert.
- 7,6 ; l'inverse de 13%.
- 1 mL, le volume d'eau dans lequel l'échantillon sec a été redispersé.

Si on considère que la quantité de collagène est très faible (cas des solutions diluées), la masse volumique des solutions de collagène correspond à celle de l'eau et on a alors accès à la concentration massique en collagène (en  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

#### IV – Composition des solutions de réactifs utilisées au cours du dosage.

##### 1 – Tampon de dosage :

- Acide citrique monohydraté (0,25 M) : 6,25 g
- Acétate de sodium trihydraté (1 M) : 17,5 g
- Hydroxyde de sodium (0,85 M) : 4,25 g
- Acide acétique glaciale : 1,5 mL
- H<sub>2</sub>O déionisé : compléter jusqu'à 125 mL

Ajuster le pH à 6 en utilisant des solutions d'hydroxyde de sodium ou d'acide acétique. Conserver à 4°C.

##### 2 – Solution de chloramine T :

- Chloramine T : 400 mg
- H<sub>2</sub>O déionisé : 5 mL
- Isopropanol : 7,5 mL
- Tampon de dosage : 12,5 mL

Cette solution doit être préparée extemporanément et ne peut pas être conservée.

##### 3 – Acide perchlorique 3,15 M :

- Acide perchlorique 65% (10,39 M) : 30 mL
- H<sub>2</sub>O déionisé : 70 mL

Conserver la solution à 4°C.

##### 4 – Solution de DMBA :

- Diméthylamino-4-benzaldéhyde (DMBA) : 1 g
- Isopropanol : 5 mL

Cette solution doit être préparée extemporanément et ne peut pas être conservée.

5 – Solution d’hydroxyproline (gamme étalon) :

Solution mère :

- Hydroxy-L-Proline : 20 mg
- H<sub>2</sub>O déionisé : 100 mL

Solution fille :

Dilution de la solution mère d’hydroxyproline au 1/10.

Cette solution doit être préparée extemporanément et ne peut pas être conservée.

### Annexe 3 : Electrophorèse en condition dénaturante ou SDS-PAGE.

#### I – Principe de l'électrophorèse SDS-PAGE

La pureté de nos solutions de collagène est caractérisée par une électrophorèse en condition dénaturante ou SDS-PAGE. Les techniques d'électrophorèse consistent à séparer des molécules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Dans le cas de la SDS-PAGE, on utilise une molécule tensioactive, le sodium dodécyl sulfate (pour SDS) afin de dénaturer la conformation des protéines. Le SDS est composé d'une longue chaîne alkyl apolaire et d'un groupement sulfate chargé négativement. Par sa chaîne alkyl apolaire, le SDS peut se fixer au niveau des zones hydrophobes de la protéine et les « solubiliser ». Les protéines sont ainsi dépliées et chargées négativement. La charge de la protéine dépend alors de la quantité de SDS liée à sa surface ; c'est à dire :

- de la longueur de la protéine
- de la quantité d'acides aminés hydrophobes sur la protéine
- de l'état de glycosylation de la protéine

En général, la répartition de SDS sur les protéines étant assez uniforme, on considère que la séparation se fait en fonction de la masse moléculaire *apparente* de la protéine. Afin d'être dans des conditions totalement dénaturantes, on ajoute un réducteur de pont disulfures à l'échantillon (ex :  $\beta$ -mercaptoéthanol) et on le chauffe à 100°C pendant quelques minutes pour rompre les liaisons hydrogènes. Dans le cas du collagène, on fait migrer des chaînes  $\alpha$  et des dimères de chaînes  $\alpha$  notés «  $\beta$  ».

Les protéines migrent au sein d'un gel de polyacrylamide réticulés par des monomères bis-acrylamides. En modifiant la concentration en monomère acrylamide ou le rapport acrylamide/bis-acrylamide, on module la porosité du gel. Le contrôle de cette porosité permet de définir la gamme de poids moléculaire que l'on souhaite discriminer. Un gel dense, avec de petits pores, est efficace pour séparer des protéines de faible poids moléculaire. A l'inverse, on utilise un gel lâche avec de gros pores pour caractériser des protéines de haut poids moléculaire.

Dans le système développé par Ornstein et Davis, les protéines migrent successivement à travers deux gels :

- **un gel de concentration** sur la partie haute. Il s'agit d'un gel lâche (5% en acrylamide, pH = 6,8) dans lequel on ajoute de la glycine, un composé qui migre plus lentement que les protéines. Sous l'effet du champ électrique, le déplacement de la glycine permet de concentrer spatialement les protéines (indifféremment de leur masse moléculaire). Le but est d'aligner les protéines avant de les faire migrer en fonction de leur masse.
- **un gel de migration** sur la partie basse. Ce gel est plus dense (10% en acrylamide) et a un pH différent (pH = 8,8) du gel de concentration. Il en résulte que la glycine migre plus vite que les protéines dans le gel de migration. En changeant de gel, on commence réellement la séparation de protéines en fonction de leur masse moléculaire apparente.

Après la migration, les protéines sont révélées par une coloration au bleu de Coomassie. En comparant leur migration à celles de marqueurs de poids moléculaire et en utilisant la relation (1), on peut alors attribuer une masse moléculaire à chaque bande.

$$\log (\text{masse moléculaire}) = a (\text{mobilité relative}) + b \quad (1)$$

où la mobilité relative d'une protéine est définie comme le rapport entre sa distance de migration et la distance de migration du front.

## II – Protocole de l'électrophorèse.

### 1 – Préparation des plaques – Montage.

- Laver soigneusement avec de l'éthanol une plaque support et une plaque fine en verre pour chaque gel. Sécher.
- Installer les plaques sur le support de montage. Vérifier l'étanchéité avec de l'eau déionisée.
- Remplir de **gel de migration** jusqu'à 4-5 mm de la ligne verte inférieure.
- Ajouter **doucement** de l'eau déionisée jusqu'en haut des plaques pour chasser les bulles d'air à l'interface eau/gel.
- Attendre la polymérisation complète du **gel de migration**.
- Vider l'eau au-dessus des gels par retournement des plaques.
- Ajouter le **gel de concentration** (micropipette) jusqu'à 2-3 mm du bord supérieur. Aspirer les bulles d'air.
- Mettre un peigne 10 puits sur les plaques et laisser polymériser le **gel de concentration**.

### 2 – Préparation des cuves à électrophorèse.

- Transférer les plaques sur le support prévu pour l'électrophorèse, plaques fines orientées vers l'intérieur. Mettre ensuite ce support dans la cuve.
- Remplir la cuve de tampon de migration (1X) jusqu'au ras des plaques.

### 3 – Préparation des échantillons.

- Diluer les solutions de collagène dans l'acide acétique 500 mM (1/2 ; 1/5 ; 1/10).
- Pour chaque échantillon, mélanger 10 µL de solution échantillon avec 10 µL de tampon échantillon (Tampon Laemmli) dans un eppendorf, vortexer et centrifuger (2 min à 5000 g).
- Fermer hermétiquement les eppendorfs et les mettre dans un bain d'eau à ébullition pendant 3 minutes. Placer ensuite les eppendorfs pendant 5

minutes dans la glace puis les mettre à centrifuger pendant 2 minutes à 5000 g.

#### 4 – Dépôts des échantillons.

- Déposer un échantillon dans chaque puit.
- Réserver un échantillon pour le marqueur de poids moléculaire (Rainbowmix, code RPN756) et/ou pour un échantillon témoin de collagène.

#### 5 – Migration.

- Recouvrir la cuve de son couvercle en respectant les polarités des électrodes.
- Relier les électrodes au générateur.
- Migration en 2 temps :
  - Régler le générateur sur 80 volts et le mettre en marche (apparition de petites bulles dans le tampon de migration).
  - Laisser 10 à 20 minutes jusqu'à ce que les dépôts soient compactés en une seule ligne (concentration des protéines).
  - Régler alors le générateur sur 160 volts pour que la migration proprement dite démarre.
  - Arrêter la migration quand le front de migration (Bleu de bromophénol) est proche du bas de la plaque.

#### 8 – Coloration.

- Démouler les gels.
- Mettre chaque gel dans une solution de coloration comprenant du bleu de Coomassie.
- Agiter pendant 1 heure.
- Ôter la solution de bleu de Coomassie.

#### 9 – Décoloration/lavage.

##### Décoloration rapide :

- Prendre les gels et les mettre dans la solution de décoloration rapide.
- Agiter pendant 1 heure
- Jeter la solution de décoloration (devenue bleutée).

##### Décolorant de conservation :

- Ajouter 50 à 100 mL du décolorant de conservation.
- Agiter 1 nuit.



- Jeter le colorant.
- Recommencer cette étape si le gel est encore trop « bleu ».

Réhydratation :

Mettre les gels dans l'eau déionisée pour les laver du décolorant et leur faire reprendre leur taille initiale.

III – Composition des solutions de réactifs utilisées au cours de l'électrophorèse.

1 – Composition des gels :

<b>Gel de migration – Composition pour 2 gels (<math>V_{\text{totale}} = 20 \text{ mL}</math>).</b>	
H <sub>2</sub> O	8,1 mL
Tris HCl 1,5 M (pH = 8,8)	5 mL
Acrylamide / Bis 30%	6,6 mL
SDS 10%	200 $\mu\text{L}$
Persulfate d'ammonium 10%	100 $\mu\text{L}$
Tétraméthyléthylènediamine (TEMED)	10 $\mu\text{L}$

<b>Gel de migration – Composition pour 2 gels (<math>V_{\text{totale}} = 10 \text{ mL}</math>).</b>	
H <sub>2</sub> O	5,7 mL
Tris HCl 0,5 M (pH = 6,8)	2,5 mL
Acrylamide / Bis 30%	1,7 mL
SDS 10%	100 $\mu\text{L}$
Persulfate d'ammonium 10%	50 $\mu\text{L}$
Tétraméthyléthylènediamine (TEMED)	10 $\mu\text{L}$

Le TEMED étant le catalyseur, il doit être ajouter juste avant de couler les gels.

2 – Tris-HCl 1,5 mM (pH = 8,8) :

Pour 100 mL de solution, solubiliser 18,171 g de Tris Amino dans 70 mL d'eau déionisée. Mesurer le pH et l'ajuster à 8,8 à l'aide de solutions concentrées

d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium. Compléter avec de l'eau déionisée jusqu'à 100 mL.

### 3 – Tris-HCl 0,5 mL (pH = 6,8) :

Pour 100 mL de solution, solubiliser 6,057 g de Tris Amino dans 70 mL d'eau déionisée. Mesurer le pH et l'ajuster à 6,8 à l'aide de solutions concentrées d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium. Compléter avec de l'eau déionisée jusqu'à 100 mL.

### 4 – SDS 10% :

Solubiliser, dans un bain marie à 45°C, 10 g de SDS dans 50 mL d'eau déionisée. Compléter ensuite avec de l'eau déionisée jusqu'à 100 mL.

### 5 – Acrylamide/Bisacrylamide 30% :

Solution prête à l'emploi et conservée à 4°C (Sigma-Aldrich).

### 6 – Tampon échantillon (tampon Laemmli) :

- Tris-HCl 0,5mM (pH = 6,8) : 1,25 mL
- β-Mercapto Ethanol : 0,45 mL
- SDS 10% : 2 mL
- Bleu de Bromophénol 0,05% (p/v) : 2,5 mg
- Glycérol : 1 mL
- EDTA : 3,72 mg
- H<sub>2</sub>O déionisée : compléter jusqu'à 5 mL

### 7 – Tampon de migration 10X :

- Tris : 30 g
- SDS : 10 g
- Glycine : 144 g
- H<sub>2</sub>O déionisée : compléter jusqu'à 1000 mL

### 8 - Bleu de Coomassie :

Solution prête à l'emploi et conservée à 4°C (Biorad).

9 – Décolorant rapide :

- Ethanol : 400 mL
- H<sub>2</sub>O déionisée : 500 mL
- Acide acétique glacial : 100 mL

10 – Décolorant de conservation :

- Ethanol : 100 mL
- H<sub>2</sub>O déionisée : 825 mL
- Acide acétique glacial : 75 mL

## Annexe 4 : Protocole de préparation des échantillons pour le MET.

### I – Principe du protocole de préparation.

La préparation des échantillons s'effectue en 4 étapes : La fixation, la déshydratation, l'infiltration et l'inclusion.

- **La fixation.** Pour éviter une modification de la structure lors de l'étape de déshydratation ou d'inclusion, les matériaux biologiques sont réticulés chimiquement. On réalise une première étape de fixation avec une solution de glutaraldéhyde (ou de paraformaldéhyde) dans un tampon à pH neutre. Le glutaraldéhyde est un réticulant idéal pour les protéines puisqu'il réagit les fonctions amines libres. Après un lavage de l'échantillon, on effectue la deuxième étape de fixation. On utilise cette fois-ci du tétraoxyde d'osmium qui réagit sur le matériau en l'oxydant. L'utilisation de tétraoxyde d'osmium permet également d'augmenter le contraste en microscopie électronique.
- **La déshydratation.** Il s'agit d'une étape de substitution progressive de l'eau du matériau par de l'éthanol. Cette étape permet de rendre le matériau plus hydrophobe et de faciliter les substitutions avec des solvants apolaires.
- **L'infiltration.** Il s'agit d'une série de substitutions de solvant organiques permettant l'infiltration de la résine araldite, hydrophobe, dans tout le matériau. En plusieurs bains, on passe de l'éthanol à l'oxyde propylène puis à la résine pure. Cette étape est importante puisque le matériau doit être totalement imprégné de résine afin d'être solidaire de son bloc.
- **L'inclusion.** Après avoir coulé la résine dans des moules rectangulaires (blocs), on dispose un morceau d'échantillon dans chaque bloc. La résine est ensuite polymérisée à chaud (60°C) pendant 3 jours.

Les blocs, pavés rigides et transparents contenant l'échantillon, peuvent ensuite être découpés en fines coupes (environ 30 nm) à l'aide d'un ultramicrotome (EM UC7, Leica). Cette opération très technique est réalisée par Bernard Haye dans notre laboratoire. Les coupes ultrafines sont finalement « contrastées » par une solution d'acétate d'uranyl. Les matériaux biologiques étant constitués d'atomes légers, ils sont relativement transparents aux électrons. Pour l'observation au MET, il est souvent nécessaire de les imprégner avec des atomes lourds (ex : uranium, plomb, osmium, etc.).

La préparation des échantillons pour l'ultramicrotomie peut introduire de nombreux artefacts : le matériau n'est pas observé dans son d'origine, la structure du matériau peut-être sévèrement altérée par la déshydratation, des composés hydrophobes (lipides) sont potentiellement dans les solvants organiques utilisés au cours de l'infiltration, etc. Les contraintes mécaniques induites par la coupe peuvent également être délétères pour l'échantillon. Pour minimiser les problèmes lors de la coupe, le choix de la résine est extrêmement important. Dans l'idéal, il faut que la résine polymère et le matériau aient les mêmes propriétés mécaniques. Enfin, il est absolument nécessaire que la résine

soit bien imprégnée dans l'échantillon : la résine polymérisée et l'échantillon doivent former un continuum pour réaliser une coupe propre.

## II – Protocole de préparation des échantillons pour le MET.

### 1 – Fixation chimique (environ 24h).

- Prélever l'échantillon le plus rapidement possible et le couper en petits fragments d'environ 1mm de côté sous forme de cube si l'orientation est aléatoire ou sous forme de parallélépipède.
- Placer les fragments dans des salières et les immerger directement dans une solution aqueuse à 8% en paraformaldéhyde (pH = 7). Les laisser pendant 1 nuit à 4°C.
- Ôter le paraformaldéhyde et le remplacer par une solution à 2,5% en glutaraldéhyde et à 0,035 M en tampon cacodylate (pH = 7,4). Laisser les fragments pendant 1h à 4°C.
- Les rincer 3 x 10 minutes avec la solution de lavage (saccharose dans un tampon cacodylate).
- Les plonger, ensuite, pendant 1h à 4°C dans une solution contenant 2% (masse) de tétraoxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ ), 0,15 M de saccharose et 0,1 M de tampon cacodylate (pH = 7,4).
- Les rincer 3 x 10 minutes avec la solution de lavage (saccharose dans un tampon cacodylate).

### 2 – Déshydratation (environ 1h).

Faire incuber les échantillons dans différents bains d'alcool :

- dans l'éthanol à 50%, 1 x 5 minutes,
- dans l'éthanol à 70%, 1 x 5 minutes,
- dans l'éthanol à 95%, 1 x 5 minutes,
- enfin, 2 x 10 minutes dans l'éthanol absolu.

Les fragments restent dans leur salière, on ajoute et on retire successivement chacun des bains.

### 3 – Enrobage ou inclusion en résine (environ 24h)

- Placer les échantillons 1 x 10 minutes dans un mélange 1:1 d'oxyde de propylène et d'éthanol absolu.
- Rincer les échantillons 1 x 5 minutes dans l'oxyde de propylène pur.
- Sous hotte, les laisser 1 heure dans un mélange 2:1 oxyde de propylène et résine.
- Placer les échantillons dans un mélange 1:2 oxyde propylène et résine et les laisser s'imprégner de la résine pendant une nuit, à 4°C.

- Ôter le mélange oxyde de propylène/résine et le remplacer par de la résine fraîchement préparée. Laisser les échantillons s'imprégner pendant 1 heure à température ambiante.
- Remplacer la résine souillée par l'oxyde de propylène par une résine propre et laisser incuber les échantillons pendant 2 heures à température ambiante.
- Placer l'échantillon dans un moule ou une gélule et le recouvrir de résine nouvelle.
- Déposer les moules dans une étuve à 60°C afin d'induire la polymérisation de la résine. La matrice est polymérisée au bout de 3 à 4 jours.

### III – Composition des solutions utilisées au cours du protocole de préparation des échantillons de MET.

#### 1 – Tampon cacodylate (Caco), 0,4 M (pH = 7,4).

- Peser 8,56 g de cacodylate de sodium tri-hydraté (CAS : 6131-99-3) dans une fiole jaugée de 100 mL et ajouter 90 mL d'eau milliQ.
- Agiter pour solubiliser le sel de cacodylate.
- Vérifier le pH et ajuster à 7,4 si nécessaire (ajout de HCl si le pH est trop élevé, de NaOH si le pH est trop bas).
- Compléter jusqu'à 100 mL avec de l'eau milliQ.
- Filtrer et conserver dans une bouteille **PROPRE** à 4°C (frigo).

Pour préparer les tampons Caco à 0,1 M et 0,05 M, il suffit simplement de diluer convenablement cette solution mère.

#### 2 – Solution de glutaraldéhyde (2,5%) dans Caco 0.035 M (pH = 7.4).

- Pour 3,2 mL de solution, mélanger **1 mL d'une solution de glutaraldéhyde à 8%** (prête à l'emploi, Electron Microscopy Science) avec **2,2 mL de tampon Caco à 0,05 M (pH = 7,4)**.
- Agiter et stocker dans un flacon propre à 4°C.

On évitera de conserver les solutions de glutaraldéhyde dans le tampon cacodylate trop longtemps. Le glutaraldéhyde est un composé qui se dégrade assez vite dans ces conditions et il est donc préférable de préparer une solution fraîche avant chaque inclusion.

#### 3 – Solution de saccharose (0,6 M).

Solubiliser 20,54 g de saccharose dans 60 mL d'eau déionisée. Agiter pour homogénéiser et compléter avec de l'eau déionisée jusqu'à 100 mL. Cette

solution est à conserver dans un flacon propre à 4°C. Faire attention aux contaminations biologiques !

#### 4 – Solution de lavage.

Mélanger 1 volume de tampon Caco 0,1 M avec 1 volume de solution saccharose 0,6 M. Agiter et conserver à 4°C.

#### 5 – Solution de tétraoxyde d'osmium (OsO<sub>4</sub>).

Mélanger ensemble :

- 2 volumes de solution de tétraoxyde d'osmium à 4% (mélange prêt à l'emploi, Electron Microscopy Science).
- 1 volume de solution de saccharose à 0,6 M.
- 1 volume de tampon Caco à 0,4 M.

OsO<sub>4</sub> se dégrade très rapidement à l'air libre. Il est donc préférable de préparer une solution fraîche avant chaque immersion.

#### 6 – Résine.

Mélanger ensemble :

- 40 mL d'EMbed 812 (solution commerciale, substitut pour l'Epon 812).
- 31 mL de DDSA (Dodecyl Succinic Anhydride, CAS : 19532-92-4).
- 17 mL de NMA (Methyl Nadic Anhydride, CAS : 25134-21-8).
- 2,6 mL de BDMA (N-BenzylDiMethylAmine, CAS : 103-83-3).

Tous les produits proviennent de EMS (Electron Microscopy Science). Après utilisation, la résine restante peut être conservée à -20°C pour préparer des mélanges résine/oxyde de propylène. Il est également possible de modifier les proportions d'EMbed et de DDSA afin d'ajuster la dureté de la résine polymérisée à celle de l'échantillon.

## Annexe 5 : Protocole de préparation des solutions diluées pour l'injection en microcellule.

### I – Préparation des solutions de gélatine A.

On commence tout d'abord par préparer une solution de gélatine A à 0,5% en masse dans l'acide acétique 500 mM. Typiquement, 1g de gélatine A sont dispersés dans 199g d'une solution aqueuse d'acide 500 mM. La solution, sous agitation, est alors plongée dans un bain marie à 45°C pendant 15 minutes pour permettre la solubilisation des microgels de gélatine. La solution tiède de gélatine est ensuite immédiatement filtrée pour la stériliser (unité de filtration stérile, porosité de 0,2 microns). Finalement, le filtrat est dialysé (Porosité 12 kDa, Cellulose régénérée, Spectrum Labs) contre le solvant d'intérêt ce qui permet également de se débarrasser des résidus de faible masse molaire.

Après 5 bains de dialyse (contre le solvant d'intérêt), la concentration en gélatine est déterminée par un dosage de l'hydroxyproline (cf Annexe 2). Fort heureusement, la proportion d'hydroxyproline est la même pour le collagène et la gélatine de type A. La concentration connue, on peut alors procéder à une éventuelle dilution afin d'atteindre la composition souhaitée.

Les solutions de gélatine sont stockées à 4°C et peuvent être conserver plusieurs mois sans antibiotiques ou antifongiques si elles sont manipulées avec soin sous une hotte à flux laminaire. La liste des solutions de gélatine A étudiées en microcellule est indiquée dans le tableau ci-dessous.

Condition	[gélatine] <sub>initiale</sub> (mg/mL)	[CH <sub>3</sub> COOH] <sub>initiale</sub> (mM)	[HCl] <sub>initiale</sub> (mM)	pH <sub>initiale</sub>
Condition 1	2	500	0	2,5
Condition 2	0,2	500	0	2,5
Condition 3	0,2	5	0	3,5
Condition 4	0,2	0	3	2,5
Condition 5	0,2	0	0,3	3,5
Condition 6	0,2	2,5	0,15	3,5

### II – Préparation des solutions de collagène.

L'extraction du collagène à partir des tendons de queue de rat est décrite dans l'annexe 1. A la fin de cette procédure, on obtient du collagène en solution dans l'acide acétique 500 mM, notre solution mère de collagène. Il est ensuite facile d'échanger le solvant de cette solution en la dialysant (Porosité 12 kDa, Cellulose régénérée, Spectrum Labs) contre le solvant d'intérêt. En général, nous dialysons les solutions de collagène contre 5 bains du solvant d'intérêt.

La concentration du collagène, après dialyse, est à nouveau estimée par un dosage de l'hydroxyproline (cf annexe 2). La concentration connue, on peut



alors procéder à une éventuelle dilution afin d'atteindre la composition souhaitée.

### III – Préparation des mélanges dilués collagène/gélatine.

Les solutions de collagène seul (**g0%**) et de gélatine A seule (**g100%**) ont été préalablement préparées en suivant respectivement les protocoles décrits en II et I. Les mélanges dilués collagène/gélatine (**g5%** à **g95%**) ont ensuite été préparés en mélangeant les solutions **g0%** et **g100%** dans des proportions appropriées. Le tableau ci-dessous récapitule les différents mélanges collagène/gélatine étudiés en microcellule.

Condition	% gélatine	% collagène	[Protéines] <sub>initiale</sub> (mg/mL)	CH <sub>3</sub> COOH/HCl (mM)
<b>g0%</b>	0	100	2	10/0,3
<b>g5%</b>	5	95	2	10/0,3
<b>g15%</b>	15	85	2	10/0,3
<b>g25%</b>	25	75	2	10/0,3
<b>g50%</b>	50	50	2	10/0,3
<b>g75%</b>	75	25	2	10/0,3
<b>g85%</b>	85	15	2	10/0,3
<b>g95%</b>	95	5	2	10/0,3
<b>g100%</b>	100	0	2	10/0,3

## **Annexe 6 : Protocole de préparation des matrices denses collagène/gélatine pour la DSC et l'IRM.**

### **I – Préparation des matrices denses collagène/gélatine pour la DSC.**

Les mélanges dilués collagène/gélatine d'intérêt sont réalisées en suivant le protocole décrit en annexe 5 (partie III). Ces mélanges sont ensuite concentrés en utilisant des tubes de centrifugation/filtration de la taille d'un eppendorf (Nanosep 30K Omega, Pall). Ces tubes comportent une membrane de porosité 30 kDa permettant la rétention du collagène et de la gélatine. L'avancement de l'opération de concentration est vérifié en pesant régulièrement les tubes (après avoir enlevé le solvant présent dans le compartiment du bas). Lorsque l'on arrive à la concentration désirée, les parties supérieures des tubes (contenant le mélange dense) sont alors directement placées dans un dessiccateur saturé en vapeur d'ammoniac pendant 1 nuit. On induit ainsi la fibrillation des mélanges. Les matrices sont finalement récupérées sans dommage en ôtant le filtre sur lequel ils reposent. Elles sont lavées 3 à 4 fois dans de larges volumes d'eau déionisée puis sont conservées dans l'eau à 4°C. Chacune des matrices, après équilibration dans l'eau, a été dosée afin de déterminer la quantité de protéines (collagène + gélatine) les composant. Nous avons considéré que la proportion collagène/gélatine ne varie pas au cours de la préparation des matrices.

### **II – Préparation des matrices denses collagène/gélatine pour l'IRM.**

Les mélanges dilués collagène/gélatine d'intérêt sont réalisées en suivant le protocole décrit en annexe 5 (partie III). Ces mélanges sont ensuite concentrés en utilisant des tubes de centrifugation/filtration de 20 mL (Vivaspin 20, Sartorius). Ces tubes comportent une membrane de porosité 30 kDa permettant la rétention du collagène et de la gélatine. L'avancement de l'opération de concentration est vérifié en pesant régulièrement les tubes (après avoir enlevé le solvant présent dans le compartiment du bas). Lorsque l'on arrive à la concentration désirée, le mélange dense est prélevé et déposée dans un tube de RMN (10 mm de diamètre externe). Pour un tube de RMN, on utilise environ 1 gramme de mélange collagène/gélatine. Les tubes de RMN sont ensuite centrifugés (2h, 20°C à 3500 g) pour ôter les éventuelles bulles d'air. Les tubes sont ensuite directement placés dans un dessiccateur saturé en vapeur d'ammoniac pendant 1 nuit. On induit ainsi la fibrillation des mélanges. Les matrices ainsi formées sont lavées 3 à 4 fois en remplissant les tubes d'eau déionisée. Les tubes sont conservés à 20°C en laissant une couche d'eau au-dessus des matrices pour éviter leur dessèchement (sauf pour la matrice m100%).

La liste des matrices réalisées pour la DSC et l'IRM est indiquée dans le tableau ci-dessous. Ce sont les matrices préparées pour l'IRM qui ont été ensuite observées en SHG et en MET (après avoir subi le protocole de préparation des échantillons pour le MET, annexe 4).

Condition	% gélatine	% collagène	C <sub>protéine</sub> (mg/mL)	CH <sub>3</sub> COOH/HCl (mM)	DSC	IRM
	0	100	100	10/0,3		
<b>m5%</b>	5	95	100	10/0,3		
<b>m15%</b>	15	85	100	10/0,3		
<b>m25%</b>	25	75	100	10/0,3		
<b>m50%</b>	50	50	100	10/0,3		
<b>m75%</b>	75	25	100	10/0,3		
<b>m85%</b>	85	15	100	10/0,3		
<b>m95%</b>	95	5	100	10/0,3		
<b>m100%</b>	100	0	100	10/0,3		

## Annexe 7 : Préparation des gels de collagène conjugué rifamycine.

### I – Description des deux protocoles de préparation.

La conjugaison de la rifamycine sur le collagène s'effectue de manière simple en soumettant un mélange des deux composés à des vapeurs d'ammoniac. La montée de pH provoquée par la solubilisation de l'ammoniac induit simultanément la fibrillogenèse du collagène. Nous avons donc élaboré deux protocoles de préparation :

- **La fibrillogenèse et la conjugaison ont lieu simultanément.** La rifamycine est préalablement solubilisée dans une solution acide de collagène (acide acétique 500 mM). Cette solution est ensuite mise sous vapeur d'ammoniac. Les gels préparés avec ce protocole sont appelés **gels FeC** (Fibrillation et Conjugaison).
- **La fibrillogenèse et la conjugaison sont deux réactions distinctes.** La solution acide de collagène (acide acétique 500 mM) est tout d'abord mise sous vapeur d'ammoniac pour former des hydrogels. Ces gels sont lavés pour ôter l'ammoniaque puis on les laisse à imbiber pendant une nuit dans une solution de rifamycine. L'ensemble est enfin mis sous vapeur d'ammoniac afin d'induire la conjugaison de la rifamycine sur le collagène. Les gels préparés avec ce protocole sont appelés **gels FpC** (Fibrillation puis Conjugaison).

Dans le tableau ci-dessous, on a reporté les différents gels de collagène conjugués rifamycine étudiés dans la partie C, chapitre II.

Condition	Protocole	C <sub>collagène</sub> (mg/mL)	C <sub>rifamycine</sub> (mg/mL)	Ratio rifamycine/collagène	Solvant de lavage
<b>FpC 1</b>	FpC	10	1	0,1	PBS 1X
<b>FpC 2</b>	FpC	10	1	0,1	H <sub>2</sub> O
<b>FpC 3</b>	FpC	100	10	0,1	PBS 1X
<b>FeC 1</b>	FeC	10	1	0,1	PBS 1X
<b>FeC 2</b>	FeC	10	1	0,1	H <sub>2</sub> O
<b>FeC 3</b>	FeC	100	10	0,1	PBS 1X

### II – Protocole de préparations des gels de collagène conjugué rifamycine.

Les gels contenant une faible quantité de collagène ( $C_{\text{collagène}} = 10 \text{ mg/mL}$ ) ont été les premiers à être préparés et caractérisés (rhéologie, DSC...). Nous avons opté pour des gels de 3 g dont le diamètre est d'environ 35 mm afin d'utiliser une géométrie plane de 25 mm. Les solutions à l'origine de ces gels ont été concentrées par évaporation car cette technique est adaptable pour de grandes quantités de solution.

Toutefois, quand nous avons réalisé les gels riches en collagène ( $C_{\text{collagène}} = 100 \text{ mg/mL}$ ), nous avons dû réduire drastiquement la taille de nos gels pour des raisons budgétaires. En utilisant une nouvelle géométrie sablée de 8 mm de diamètre, nous avons ainsi pu produire des gels pesant 0,7 g et dont le diamètre est d'environ 10 mm. Contrairement aux premiers gels, les solutions ont été concentrées à l'aide de tube de centrifugation/filtration (Vivaspin 20, 30 kDa, Sartorius).

1 – Préparation des gels témoins sans rifamycine avec  $C_{\text{collagène}} = 10 \text{ mg/mL}$ .

Les solutions de collagène obtenues à partir de tendons de queues de rat (voir annexe 1) ont généralement une concentration en collagène comprise entre 2 et 4 mg/mL. Nous avons donc tout d'abord concentré cette solution en utilisant la méthode de l'évaporation : la solution est versée dans une boîte de pétri stérile, sous une hotte à flux laminaire et on laisse le solvant (Acide acétique 500 mM dans l'eau) progressivement s'évaporer. L'avancement de cette étape de concentration est vérifié en pesant régulièrement la boîte de Pétri. Pour éviter la formation d'une croûte de collagène en surface, on mélange régulièrement (toutes les trois heures) la solution à l'aide d'un ustensile stérile (ex : « cell scraper » utilisé en culture cellulaire). L'évaporation permet de concentrer des quantités importantes de collagène.

Après avoir atteint la concentration désirée en collagène, la solution est ensuite coulée dans un moule en silicone souple de forme cylindrique (diamètre : 35 mm et épaisseur 10 mm). Dans chaque moule, on verse 3 g de solution de collagène. Le moule est ensuite placé dans un dessiccateur saturé en vapeur d'ammoniac pour une nuit, induisant ainsi la fibrillation du collagène. Finalement, les gels sont démoulés sans dommage, en déformant le moule, puis ils sont lavés et équilibrés dans le solvant désiré (eau ou PBS 1X).

2 – Préparation des gels **FpC 1** et **FpC 2**.

La synthèse de ces gels nécessite tout d'abord la préparation de gels de collagène fibrillé avant de passer ensuite à l'étape de conjugaison. On suit donc le protocole décrit ci-dessus pour préparer les gels de collagène à 10 mg/mL sans rifamycine. Au cours de la dernière étape, les gels **FpC 1** et **FpC 2** sont respectivement lavés dans le PBS 1X et dans l'eau déionisée.

Les gels **FpC 1** (resp. **FpC 2**) sont ensuite immergés dans une solution de rifamycine SV solubilisée dans le PBS 1X (resp. l'eau déionisée). Pour 6 gels, on utilise 100 mL de solution de rifamycine. La concentration en rifamycine, après ajout des gels, est de 1 mg/mL. On laisse les gels dans cette solution pendant 10 heures afin qu'ils soient imprégnés de rifamycine. Le cristallisateur contenant les gels et la solution de rifamycine est ensuite placé dans un dessiccateur saturé en vapeur d'ammoniac pour une nuit. On induit ainsi la réaction de conjugaison. Les gels sont finalement lavés en ôtant la solution de rifamycine et en la remplaçant par des bains de PBS 1X (resp. des bains d'eau déionisée).

### 3 – Préparation des gels **FeC 1** et **FeC 2**.

A la différence des gels **FpC**, la rifamycine est introduite au cours de la concentration du collagène pour les gels **FeC**. On dissout tout d'abord la rifamycine SV dans l'eau pour obtenir une solution à 5 mg/mL. Cette solution est ensuite diluée 10 fois dans une solution d'acide acétique afin d'obtenir une solution de rifamycine à 0,5 mg/mL dans 500 mM d'acide acétique. La solution de rifamycine est stérilisée par filtration puis ajoutée à une solution de collagène dans l'acide acétique 500 mM. La quantité de rifamycine additionnée est calculée pour qu'après l'étape de concentration on soit à une concentration finale en rifamycine de 1 mg/mL et à concentration finale en collagène de 10 mg/mL. Typiquement, si je souhaite obtenir 10 mL de solution collagène/rifamycine, je vais ajouter 20 mL de solution de rifamycine à 0,5 mg/mL. La solution collagène/rifamycine est finalement mise à évaporer sous une hotte à flux laminaire (cf préparation des gels témoins).

Après avoir atteint la concentration désirée en collagène et en rifamycine, la solution est alors coulée dans un moule en silicone souple de forme cylindrique (diamètre : 35 mm et épaisseur 10 mm). Dans chaque moule, on verse 3 g de solution de collagène/rifamycine. Le moule est ensuite placé dans un dessiccateur saturé en vapeur d'ammoniac pour une nuit. On induit la fibrillation du collagène ainsi que la conjugaison de la rifamycine. Finalement, les gels sont démoulés sans dommage en déformant le moule puis ils sont lavés et équilibrés dans le solvant désiré : PBS 1X pour **FeC 1** et eau déionisée pour **FeC 2**.

### 4 – Préparation des gels riches en collagène ( $C_{\text{Collagène}} = 100 \text{ mg/mL}$ ).

La préparation de ces gels est similaire à la préparation des gels pauvres en collagène (voir 1, 2 et 3 ci-dessus). Seule l'étape de concentration diffère puisqu'on utilise cette fois-ci des tubes de centrifugation-filtration (Vivaspin 20, 30 kDa, Sartorius).

Après l'étape de concentration, les solutions denses et très visqueuses sont prélevées à l'aide d'une spatule. Pour mouler les gels, on dépose 0,7 g de solution dans le puit d'une boîte 24 puits (environ 1 cm de diamètre) qui est ensuite centrifugée (2h, 3000 g) afin de chasser les bulles d'air présentes dans les solutions. Les boîtes sont alors placées dans un dessiccateur saturé en vapeur d'ammoniac afin d'induire la fibrillogénèse et/ou la conjugaison avec la rifamycine. Finalement, les gels sont lavés et équilibrés dans le PBS 1X.

## Annexe 8 : Protocole pour réaliser un antibiogramme.

### I – Principe de l'antibiogramme et application à notre système.

L'activité antibactérienne des gels a été vérifiée en évaluant leur capacité à inhiber la croissance d'une souche bactérienne de *Staphylococcus Aureus* (ATCC 29213). Cette bactérie est souvent présente au niveau des plaies chroniques et elle est sensible à la rifamycine. Pour chaque type de gels, nous avons réalisé des antibiogrammes en utilisant la méthode de Kirby-Bauer.

Cette méthode est basée sur la diffusion de substances antibiotiques imprégnées sur des disques en papier préalablement séchés qui doivent être déposés à la surface d'un gel de LB-agar. Les disques appliqués sur l'agar absorbent une quantité d'eau suffisante pour dissoudre l'antibiotique qui diffuse ainsi progressivement dans le milieu, suivant les lois physiques de diffusion des molécules à travers un gel. Il se forme ainsi un gradient de concentration de l'antibiotique autour de chaque disque. Tandis que le mécanisme de diffusion se produit, la multiplication des bactéries ensemencées à la surface de l'agar intervient. Au moment où se manifeste la phase logarithmique de croissance, les bactéries se multiplient plus rapidement que la diffusion de l'antibiotique ne peut progresser et les cellules bactériennes non inhibées continuent à se multiplier jusqu'à ce que la culture puisse être visualisée. Aucune croissance n'apparaît lorsque l'antibiotique est présent aux concentrations inhibitrices. Il est alors possible de mesurer le diamètre de la zone d'inhibition.

*Staphylococcus Aureus* est une bactérie incapable de dégrader les fibrilles de collagène. Dans les gels conjugués à la rifamycine, l'antibiotique est lié de manière covalente au collagène. Il ne peut donc pas diffuser librement et nous supposons par conséquent que les gels intacts n'auraient pas d'activité antibactérienne. Cette hypothèse a été vérifiée en plaçant des morceaux de gels (**FeC**, **FpC** et sans rifamycine) de même forme et de même taille que les disques de papier sur un gel de LB-agar imprégné de *S. Aureus*.

Pour démontrer que la conjugaison de la rifamycine n'a pas altérée ses propriétés antibactériennes et que les produits de dégradation des gels peuvent inhiber la croissance de *S. Aureus*, nous avons également mimé la dégradation des matrices *in vitro*. Nous avons eu recours à une enzyme bactérienne capable de cliver le collagène fibrillé : la collagénase. Les gels sont mis à incuber dans une solution de collagénase pendant deux heures, à 37°C. On obtient alors des solutions de débris de collagène dont des peptides conjugués à la rifamycine. On peut alors imprégner des disques de papier de ces solutions pour en tester l'effet antibiotique.

Pour chaque condition, nous avons testé quatre échantillons (disque ou gel) sur deux inocula différents. Pour chaque inoculum, nous avons également déposé une série de disques de concentration connue en rifamycine. Ces disques permettent de relier le diamètre de la zone d'inhibition à la quantité de rifamycine relarguée. Ils nous indiquent également si les bactéries de l'inoculum sont devenues résistantes à l'antibiotique. Ce point est très important puisque *S. Aureus* est connue pour son habilité à développer facilement des résistances aux antibiotiques.

## II – Protocole pour réaliser un antibiogramme.

Tout d'abord, on prépare un *inoculum* en mettant à incuber 100  $\mu\text{L}$  de milieu concentré en *Staphylococcus Aureus* (ATCC 29213) dans 10 mL de milieu LB pendant une nuit à 37°C. La pureté de l'*inoculum* est vérifiée en effectuant la méthode des 4 quadrants. On étale ensuite 200  $\mu\text{L}$  de l'*inoculum* fraîchement préparé sur un gel de LB agar. On place alors sur ce gel les disques imprégnés d'antibiotique, de solution de collagène enzymatiquement clivés ou bien encore des morceaux de matrices de collagène. Finalement, les gels sont placés dans une étuve à 37°C, entre 18 à 24h, afin de permettre leur colonisation par les bactéries. On observe alors la présence (ou non) de halos d'inhibition.

Les disques ont été préalablement imprégnés en déposant dessus une goutte de 10  $\mu\text{L}$  de la solution désirée. Les concentrations des solutions de rifamycine utilisées pour réaliser la gamme étalon sont 0,3 ; 0,6 ; 1,2 ; 2,5 ; 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ces solutions sont préparées dans le PBS 1X.

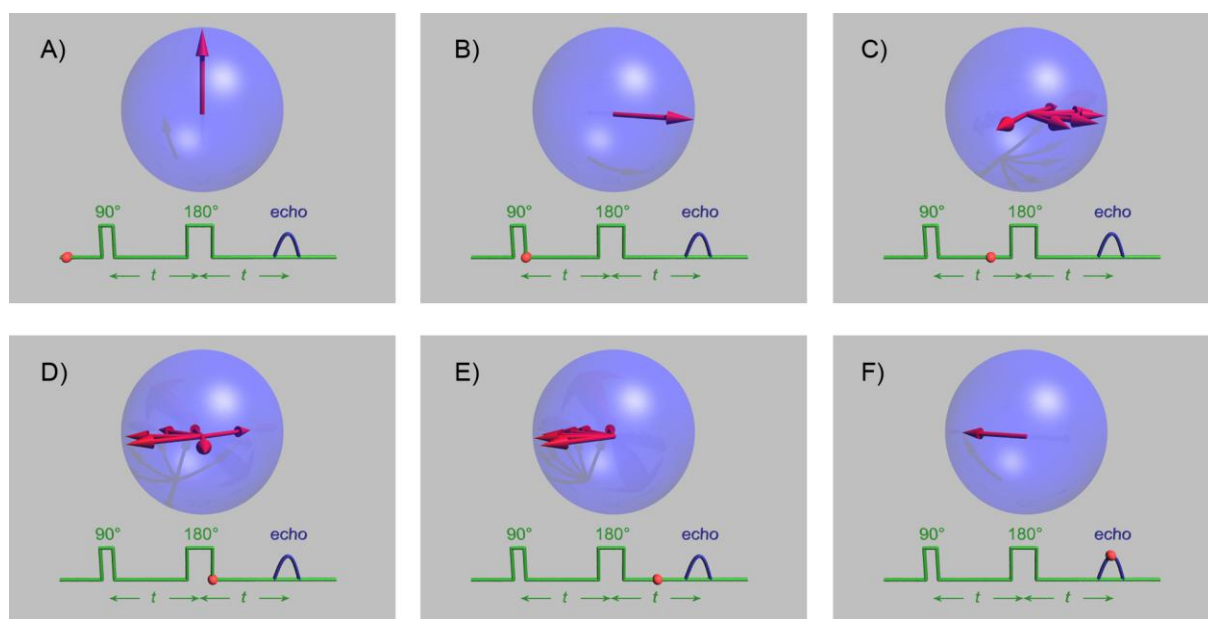


## Annexe 9 : Séquences utilisées pour réaliser les expériences d'IRM.

### I – Séquence de base en IRM : la séquence d'écho de spin.

Nous avons montré, dans la partie IRM de ce manuscrit (cf Partie A – Chapitre 2 – III), que la relaxation transversale correspond au déphasage de la composante transversale du moment magnétique des spins excités. Ce déphasage est dû aux inhomogénéités locales du champ magnétique. En pratique, on peut distinguer les inhomogénéités d'origine moléculaire et les inhomogénéités d'origine matérielle, c'est-à-dire celles liées au champ  $\mathbf{B}_0$ . Afin de s'affranchir des inhomogénéités propres à  $\mathbf{B}_0$ , Hahn a proposé, en 1955, d'introduire une séquence supplémentaire : la séquence d'écho de spin.

Comme précédemment, on applique un premier pulse  $\mathbf{B}_1$  de  $90^\circ$  qui permet de faire basculer le moment magnétique dans le plan transverse (excitation). Après un temps  $t = T_E/2$ , on applique un second pulse  $\mathbf{B}_1$  de  $180^\circ$  qui inverse la position des spins sans modifier la vitesse ni le sens de leur précession (voir figure 1). Par conséquent, au bout d'un temps  $T_E$ , pour temps d'écho, on annule l'effet des inhomogénéités du champ  $\mathbf{B}_0$ . Toutefois, ce rephasage n'est que partiel puisque l'écho de Hahn ne permet pas de s'affranchir des inhomogénéités d'origine moléculaire (liées à la diffusion de spins.).



*Figure 1* : Illustration du phénomène d'écho de spins. En A, les spins sont alignés (selon z) sous l'effet du champ  $\mathbf{B}_0$  (effet Zeeman). En B, après application d'un premier pulse  $\mathbf{B}_1$  de  $90^\circ$ , l'aimantation bascule dans le plan transverse. En C, on observe la relaxation transversale (décohérence) due aux inhomogénéités locales du champ magnétique. En D, l'application d'un pulse  $\mathbf{B}_1$  de  $180^\circ$  permet d'inverser la position des spins sans modifier la vitesse ni le sens de leur précession. En E et F, on observe le rephasage progressif mais partiel des spins. Au temps d'écho ( $T_E = 2t$ ), les inhomogénéités liées au champ  $\mathbf{B}_0$  sont annulées. La figure originale ainsi que trois animations représentant l'écho de spin sont consultables sur la page internet suivante : [https://en.wikipedia.org/wiki/Spin\\_echo](https://en.wikipedia.org/wiki/Spin_echo)

La séquence d'écho de spin est la séquence de base en IRM. A l'aide de gradients (de fréquence ou de phase), on sélectionne spatialement le voxel que l'on souhaite imager dans l'échantillon puis on excite les protons (pulse  $\mathbf{B}_1$   $90^\circ$ ) et on effectue l'écho de spin (pulse  $\mathbf{B}_1$   $180^\circ$ ). On répète ensuite cette séquence pour chaque voxel ce qui permet de constituer une image.

## II – Pondération des images en $T_1$ , $T_2$ et densité de protons.

En utilisant une séquence d'écho de spins, il est possible de pondérer les images en  $T_1$ , en  $T_2$  ou en densité de protons en jouant sur deux paramètres :

- **Le temps d'écho** ou  $T_E$  qui correspond à la durée entre l'excitation et le rephasage partiel des spins (voir ci-dessus).
- **Le temps de répétition** ou  $T_R$  qui correspond à la durée entre deux pulses d'excitations. Il s'agit du temps laissé au système pour relaxer avant de basculer à nouveau l'aimantation dans le plan transverse. Il porte donc également le nom de **temps de repousse** (repousse de la composante  $\mathbf{M}_z$ ).

### 1 – Influence du temps de répétition ( $T_R$ ).

Rappelons tout d'abord que le niveau du signal FID après bascule dans le plan transverse correspond à la norme de  $\mathbf{M}_z$  avant le pulse d'excitation. Or, la norme de  $\mathbf{M}_z$  dépend directement du temps laissé au système pour relaxer longitudinalement. Par conséquent, en fixant le  $T_R$ , on fixe directement l'amplitude du signal de RMN enregistré.

Si le  $T_R$  est très long, tous les spins ont le temps de relaxer indépendamment de leur  $T_1$ . Le contraste en  $T_1$  est donc fortement réduit voir nul.

Au contraire, si le  $T_R$  est très court, seuls les spins à  $T_1$  court ont le temps de relaxer longitudinalement. Il est alors possible de différencier les populations de spins en fonction de leur  $T_1$ .

### 2 – Influence du temps d'écho ( $T_E$ ).

Nous avons vu que l'écho permet de s'affranchir des inhomogénéités liées au champ  $\mathbf{B}_0$  mais pas des inhomogénéités d'origine moléculaire. Par conséquent, pendant la durée  $T_E$ , la composante  $\mathbf{M}_{xy}$  décroît exponentiellement en  $T_2$ . Le signal FID enregistré au niveau de l'écho a donc une amplitude plus faible que le signal FID observé juste après l'excitation.

En optant pour un  $T_E$  très court, le déphasage des spins est alors négligeable et le contraste en  $T_2$  est donc quasiment nul.

Cependant, en allongeant le  $T_E$ , on accentue la différence entre les spins à  $T_2$  court et à  $T_2$  long :

- Les spins à  $T_2$  court déphasent rapidement et ont par conséquent un signal FID très faible.
- Les spins à  $T_2$  long ont peu relaxé et ont donc un signal FID élevé.

Enfin, si on sélectionne un  $T_E$  très long, tous les spins ont relaxé indépendamment de leur  $T_2$  et il n'est alors plus possible d'enregistrer un signal FID.

### 3 – Pondération en $T_1$ , $T_2$ et densité protonique.

Si on reprend les explications données ci-dessus, on peut alors pondérer les séquences en jouant simplement sur le  $T_E$  et le  $T_R$  de notre séquence de base :

- Une séquence pondérée en  $T_1$  favorise le contraste en  $T_1$  tout en minimisant le contraste en  $T_2$ . Il s'agit donc d'une séquence à  $T_E$  et à  $T_R$  court. Les spins « rapides » ( $T_1$  courts) ont un signal FID intense (hypersignal) alors que le signal FID des spins « lents » est difficilement observable (hyposignal).
- Une séquence pondérée en  $T_2$  favorise le contraste en  $T_2$  tout en minimisant le contraste en  $T_1$ . Il s'agit donc d'une séquence à  $T_E$  et à  $T_R$  long. Les spins « lents » ( $T_2$  long) ont un signal FID intense (hypersignal) alors que le signal FID des spins « rapides » est difficilement observable (hyposignal).
- La séquence pondérée en densité de protons est une séquence qui minimise à la fois le contraste en  $T_1$  et en  $T_2$ . Il s'agit d'une séquence à  $T_E$  court et à  $T_R$  long. Les zones riches en protons présentent alors un signal FID plus intense (hypersignal) que les zones appauvries en protons (hyposignal).

Pour imager les matrices denses collagène/gélatine (partie B – Chapitre 3), nous avons tout d'abord réalisé des images pondérées en densité de protons qui se sont révélées être homogène. Nous avons ensuite optimisé le  $T_E$  et le  $T_R$  pour maximiser le contraste. Au final, le  $T_R$  choisi est de l'ordre du  $T_1$  des protons présents dans l'échantillon. Il s'agit donc d'un  $T_R$  assez court ( $T_R = 100$  ms). D'un autre côté, le  $T_E$  fixé est plutôt long ( $T_E = 20$  ms). Par conséquent, pour nos échantillons, on obtient le meilleur contraste en pondérant à la fois en  $T_1$  et en  $T_2$ .

## **Bibliographie générale**

## Bibliographie générale.

### Introduction générale :

- [1] – Tendon anatomy. In : *Physiopedia* (en ligne). Consulté le 11/09/16. Disponible à l'adresse : [http://www.physio-pedia.com/Tendon\\_Anatomy](http://www.physio-pedia.com/Tendon_Anatomy)
- [2] – HULMES D.J.S. Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In : FRATZL P. (dir.). *Collagen – Structure and Mechanics*. New York : Springer US, 2008, chapitre 2, p. 15-47. ISBN : 978-0-387-73905-2.
- [3] – Sculpture de Nathan Sawaya. Exposition « the Art of the brick ».

### Partie A – Chapitre 1 :

- [1] – FRATZL P. Collagen : Structure and Mechanics, an Introduction. In : FRATZL P. (dir.). *Collagen – Structure and Mechanics*. New York : Springer US, 2008, chapitre 1, p. 1-13. ISBN : 978-0-387-73905-2
- [2] – IZQUIERDO E. *Caractérisation des effets de la chaleur sur des cuirs de tannage végétal et développement d'une stratégie de restauration par voie enzymatique*. Thèse de doctorat : Science de la vie et de la santé, spécialité Biochimie. Université de Cergy-Pontoise : 2016.
- [3] – WANG Y., AZAÏS T., ROBIN M., VALLEE A., CATANIA C., LEGRIEL P., PEHAU-ARNAUDET G., BABONNEAU F., GIRAUD-GUILLE M.M., NASSIF N. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nature Materials*, 2012, vol 11, p. 724-733. DOI : 10.1038/nmat3362.
- [4] – TIDU A., GHOUBAY-BENALLAOUA D., LYNCH B., HAYE B., ILLOUL C., ALLAIN J.M., BORDERIE V., MOSSER G. Development of human corneal epithelium on organized fibrillated transparent collagen matrices synthesized at high concentration. *Acta Biomaterialia*, 2015, vol 22, p. 50-58. DOI : 10.1016/j.actbio.2015.04.018.
- [5] – SWEENEY S.M., ORGEL J.P., FERTALA A., Mc AULIFFE J.D., TURNER K.R., DI LULLO G.A., CHEN S., ANTIPOVA O., PERUMAL S., ALA-KOKKO L., FORLINO A., CABRAL W.A., BARNES A.M., MARINI J.C., SAN ANTONIO J.D. Candidate Cell and Matrix Interaction Domains on the Collagen Fibril, the Predominant Protein of Vertebrates. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, vol 283, n°30, p. 21187-21197. DOI : 10.1074/jbc.M709319200.
- [6] – ECKES B., NISCHT R., KRIEG T. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 2010, vol 4, n°3. DOI : 10.1186/1755-1536-3-4
- [7] – GRINNELL F. Fibroblast biology in three dimensional collagen matrices. *TRENDS in Cell Biology*, 2003, vol 13, n°5, p. 264-269. DOI : 10.1016/S0962-8924(03)00057-6
- [8] – LEE C.H., SINGLA A., LEE Y. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, vol 221, p. 1-22. PII : S0378-5173(01)00691-3
- [9] – ABOU NEEL E.A., BOZEC L., KNOWLES J.C., SYED O., MUDERA V., DAY R., KEUN HYUN J. Collagen - Emerging collagen based therapies hit the patient. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, vol 65, p. 429-456. DOI : 10.1016/j.addr.2012.08.010

- [10] – HELARY C., PANDIT A. Collagen-based biomaterials for regenerative medicine. In : MANO J.F. (dir.). *Biomimetic approaches for biomaterials development*. Wiley, 2012, chapitre 3, p. 55-74. ISBN: 9783527329168. DOI : 10.1002/9783527652273.ch3
- [11] – ALVAREZ G.S., HELARY C., MEBERT A.M., WANG X., CORADIN T., DESIMONE M.F. Antibiotic-loaded silica nanoparticle–collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. *Journal of Material Chemistry B*, 2014, vol 2, p. 4660-4670. DOI : 10.1039/c4tb00327f
- [12] – HULMES D.J.S. Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In : FRATZL P. (dir.). *Collagen – Structure and Mechanics*. New York : Springer US, 2008, chapitre 2, p. 15-47. ISBN : 978-0-387-73905-2.
- [13] – GOBEAUX F. *Phases denses de collagène de type I : Transition isotrope/cholestérique, fibrillogénèse et minéralisation*. Thèse de doctorat : Biophysique Moléculaire. Paris, Université Pierre et Marie Curie : 2007.
- [14] – RAMACHANDRAN J.N. Stereochemistry of collagen. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1988, vol 31, p. 1-16.
- [15] – PROCKOP D.J., FERTALA A. Inhibition of the self-assembly of collagen I into fibrils with synthetic peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, vol 273, n°25, p. 15598-15604.
- [16] – MU C., LI D., LIN W., DING Y., ZHANG G. Temperature induced denaturation of collagen in acidic solution. *Biopolymers*, 2007, vol 86, n°4, p. 282-287. DOI : 10.1002/bip.20742.
- [17] – BHATNAGAR R.S., GOUGH C.A. Circular dichroism of collagen and related polypeptides. In : FASMAN G.D. (dir.). *Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. New York : Plenum Press, 1996, chapitre 6, p. 183-199. ISBN : 978-1-4419-3249-5
- [18] – DE SA PEIXOTO P., LAURENT G., AZAÏS T., MOSSER G. Solid-state NMR Study Reveals Collagen I Structural modifications of amino acid side chains upon fibrillogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, vol 288, n°11, p. 7528-7535. DOI : 10.1074/jbc.M112.390146.
- [19] – BERISIO R., DE SIMONE A., RUGGIERO A., IMPROTA R., VITAGLIANO L. Role of side chains in collagen triple helix stabilization and partner recognition. *Journal of peptide science*, 2009, vol 15, p. 131-140. DOI : 10.1002/psc.1082.
- [20] – LI Y., ASADI A., MONROE M.R., DOUGLAS E.P. pH effects on collagen fibrillogenesis in vitro: Electrostatic interactions and phosphate binding. *Materials Science and Engineering C*, 2009, vol 29, p. 1643-1649. DOI : 10.1016/j.msec.2009.01.001
- [21] – OECHSLE A.M., WITTMANN X., GIBIS M., KOHLUS R., WEISS J. Collagen entanglement influenced by the addition of acids. *European Polymer Journal*, 2014, vol 58, p. 144-156. DOI : 10.1016/j.eurpolymj.2014.06.015.
- [22] – OECHSLE A.M., WITTMANN X., GIBIS M., KOHLUS R., WEISS J. Modulation of collagen by addition of Hofmeister salts. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, vol 79, p. 518-526. DOI : 10.1016/j.ijbiomac.2015.05.023.
- [23] – BRODSKY B., PERSIKOV A. Molecular structure of the collagen

- triple helix. *Advances in protein chemistry*, 2005, vol 70, p. 301-339. DOI : 10.1016/S0065-3233(04)70009-1.
- [24] – ROSENBLOOM J., HARSCH M., JIMENEZ S. Hydroxyproline content determines the denaturation temperature of chick tendon collagen. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1973, vol 158, p. 478-484.
  - [25] – TERRIEN A. *Synthèse et étude structurale multi-échelle de peptides mimes de collagène*. Thèse de doctorat : Biochimie. Paris, Université Pierre et Marie Curie : 2015.
  - [26] – ABOU NEEL E.A., BOZEC L., KNOWLES J.C., SYED O., MUDERA V., DAY R., HYUN J.K. Collagen — Emerging collagen based therapies hit the patient. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, vol 65, p. 429-456.
  - [27] – RESORBA Medical GmbH (en ligne). Consulté le 11/05/16. Disponible à l'adresse : <http://www.resorba.com/index.php>
  - [28] - LE JOLIF J.C., HUC A. Le collagène. In : *L'observatoire des Cosmétiques* (en ligne). Publié le 27/01/16. Consulté le 11/05/16. Disponible à l'adresse : <http://www.observatoiredescosmetiques.com/pro/actualite/ingredients/le-collagene-3435>
  - [29] - Japon. La bière au collagène qui nous rend plus beaux. In : *Ouest France* (en ligne). Publié le 24/04/15. Consulté le 4/06/15. Disponible à l'adresse : <http://www.ouest-france.fr/insolite/la-biere-au-collagene-qui-nous-rend-plus-beaux-3347720>
  - [30] – LANGTON A.K., GRIFFITHS C.E.M., SHERRATT M.J., WATSON R.E.B. Cross-linking of structural proteins in ageing skin: an in situ assay for the detection of amine oxidase activity. *Biogerontology*, 2014, vol 14, p. 89-97. DOI : 10.1007/s10522-012-9394-3.
  - [31] – WERKMEISTER J.A., RAMSHAW J.A.M. Recombinant protein scaffolds for tissue engineering. *Biomedical Materials*, 2012, vol 7. DOI : 10.1088/1748-6041/7/1/012002.
  - [32] – NEUBAUER A., NEUBAUER P., MYLLYHARJU J. High-level production of human collagen prolyl 4-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Matrix Biology*, 2005, vol 24, p. 59-68. DOI : 10.1016/j.matbio.2004.11.004.
  - [33] – FibroGen (en ligne). Consulté le 25/04/2016. Disponible à l'adresse : <http://www.fibrogen.com>
  - [34] – JOHN D.C.A., WATSON R., KIND A.J., SCOTT A.R., KADLER K.E., BULLEID N.J. Expression of an engineered form of recombinant procollagen in mouse milk. *Nature Biotechnology*, 1999, vol 17, p. 385-389.
  - [35] – ADACHI T., WANG X., MURATA T., OBARA M., AKUTSU H., MACHIDA M., UMEZAWA A., TOMITA M. Production of a non-triple helical collagen a chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, vol 106, n°6, p. 860-870. DOI : 10.1002/bit.22752.
  - [36] – KATO T., KAJIKAWA M., MAENAKA K., PARK E.Y. Silkworm expression system as a platform technology in life science. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, vol 85, p. 459-470. DOI : 10.1007/s00253-009-2267-2.

- [37] – RUGGIERO F., EXPOSITO J.Y., BOURNAT P., GRUBER V., PERRET S., COMTE J., OLAGNIER B., GARRONE R., THEISEN M. Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Letters*, 2000, vol 469, p. 132-136. PII : S0014-5793(00)01259-X
- [38] – PERRET S., MERLE C., BERNOCCO S., BERLAND P., GARRONE R., HULMES D.J.S., THEISEN M., RUGGIERO F. Unhydroxylated triple helical collagen I produced in transgenic plants provides new clues on the role of hydroxyproline in collagen folding and fibril formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol 276, n°47, p. 43693-43698. DOI : 10.1074/jbc.M105507200.
- [39] – STEIN H., WILENSKY M., TSAFRIR Y., ROSENTHAL M., AMIR R., AVRAHAM T., OFIR K., DGANY O., YAYON A., SHOSEYOV O. Production of bioactive, post-translationally modified, heterotrimeric, human recombinant type-I collagen in transgenic tobacco. *Biomacromolecules*, 2009, vol 10, p. 2640-2645. DOI : 10.1021/bm900571b.
- [40] – CollPlant (en ligne). Consulté le 25/04/2016. Disponible à l'adresse : <http://www.collplant.com>
- [41] – EASTOE J.E. The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochemical Journal*, 1955, vol 61, n°4 p. 589-600. DOI : 10.1042/bj0610589.
- [42] – DA SILVA C.M.L., SPINELLI E., RODIGUES S.V. Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/ hydroxyproline assay. *Food Chemistry*, 2015, vol 173, p. 619-623. DOI : 10.1016/j.foodchem.2014.10.073.
- [43] – Overview for electrophoresis and western blotting (en ligne). Consulté le 25/04/2015. Disponible à l'adresse : [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/appendix/elec\\_blotting/overview.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/appendix/elec_blotting/overview.pdf)
- [44] – Extracellular Matrix of Animal Cells (en ligne). Consulté le 31/08/2016. Disponible à l'adresse : <https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/cell-structure-4/connections-between-cells-and-cellular-activities-63/extracellular-matrix-of-animal-cells-324-11461/>
- [45] – SILVER F.H., HORVATH I., FORAN D.J. Mechanical implications of the domain structure of fibril forming collagens: comparison of the molecular and fibrillar flexibilities of the  $\alpha$ -chains found in types I, II, and III collagen. *Journal of Theoretical Biology*, 2002, vol 216, p. 243-254. DOI : 10.1006/jtbi.2002.2542.
- [46] – SILVER F.H., EBRAHIMI A., SNOWHILL P.B. Viscoelastic properties of self-assembled type I collagen fibers: molecular basis of elastic and viscous behaviors. *Connective Tissue Research*, 2002, vol 43, p. 569-580.

## Partie A - Chapitre 2 :

- [1] – BANCELIN S. *Imagerie quantitative du collagène par génération de seconde harmonique*. Thèse de doctorat : Biophysique. Ecole Polytechnique : 2013.
- [2] – GUSACHENKO I. *Polarization-resolved second harmonic microscopy in collagenous tissues : theoretical and experimental developments, and*



*application to microstructural imaging during biomechanical assays in tendon*. Thèse de doctorat : Physique. Ecole Polytechnique : 2012.

- [3] – STRUPLER M. *Imagerie du collagène par microscopie multiphotonique. Application aux fibres rénales*. Thèse de doctorat : Physique. Ecole Polytechnique : 2008.
- [4] – TEULON C. *Imagerie quantitative du collagène par microscopie par génération de seconde harmonique résolue en polarisation*. Thèse de doctorat : Biophysique. Ecole Polytechnique : 2016.
- [5] – TEULON C., TIDU A., PORTIER F., MOSSER G., SCHANNE-KLEIN M.-C. Probing the 3D structure of collagen liquid crystals with polarization-resolved SHG microscopy. *Optics Express*, soumis en avril 2016.
- [6] – DENISET-BESSEAU A., DE SA PEIXOTO P., MOSSER G., SCHANNE-KLEIN M.-C. Nonlinear optical imaging of lyotropic cholesteric liquid crystals. *Optics Express*, 2010, vol 18, n°2, p 1113-1121. DOI : 10.1364/OE.18.001113.
- [7] – BANCELIN S., AIME C., GUSACHENKO I., KOWALCZUK L., LATOUR G., CORADIN T., SCHANNE-KLEIN M.-C. Determination of collagen fibril size via absolute measurements of second-harmonic generation signals. *Nature Communications*, 2014, vol 5, article n°4920. DOI : 10.1038/ncomms5920.
- [8] – Xu Research Group – Biomedical Imaging (en ligne). Consulté le 31/08/2016. Disponible à l'adresse : <http://xu.research.engineering.cornell.edu/research>
- [9] – DE SA PEIXOTO P., DENISET-BESSEAU A., SCHMUTZ M., ANGLO A., ILLOUL C., SCHANNE-KLEIN M.-C., MOSSER G. Achievement of cornea-like organizations in dense collagen I solutions: clues to the physico-chemistry of cornea morphogenesis. *Soft Matter*, 2013, vol 9, p 11241-11248. DOI : 10.1039/C3SM52097H.
- [10]
- [11] – KASTLER B., VETTER D. *Comprendre l'IRM. Manuel d'auto-apprentissage, 7<sup>ème</sup> édition*. Paris : Elsevier Masson, 2011. Imagerie Médicale. ISBN : 9782294710445.

## Partie B – Introduction :

- [1] – *Gelatin Manufacturers in Europe* (en ligne). Consulté le 24/06/2016. Disponible à l'adresse : <http://www.gelatine.org/fr/applications/gelatine.html>
- [2] – ABDERRAZAK M., TREMBLIN G. *Abrégé de biochimie appliquée (2<sup>nde</sup> édition)*. EDP Sciences, 2015, Grenoble Sciences. ISBN: 9782759817764
- [3] – SANTORO M., TATARA A.M., MIKOS A.G. Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering. *Journal of controlled release*, 2014, vol 190, p 210-218. DOI : 10.1016/j.conrel.2014.04.014.
- [4] – BOULIGAND Y. Liquid crystals and biological morphogenesis : Ancient and new questions. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences - Chimie*, 2007, p 1-16. DOI : 10.1016/j.crci.2007.10.001.
- [5] – GIRAUD-GUILLE M.M., MOSSER G., BELAMIE E. Liquid crystallinity in collagen systems in vitro and in vivo. *Current opinion in colloid and*

*interface science*, 2008, vol 13, p 303-313. DOI : 10.1016/j.cocis.2008.03.002.

- [6] – DE SA PEIXOTO P., DENISET-BESSEAU A., SCHMUTZ M., ANGLO A., ILLLOUL C., SCHANNE-KLEIN M.-C., MOSSER G. Achievement of cornea-like organizations in dense collagen I solutions: clues to the physico-chemistry of cornea morphogenesis. *Soft Matter*, 2013, vol 9, p 11241-11248. DOI : 10.1039/C3SM52097H.
- [7] – MOSSER G., ANGLO A., HELARY C., BOULIGAND Y., GIRAUD-GUILLE M.-M. Dense tissue-like collagen matrices formed in cell-free conditions. *Matrix Biology*, 2006, vol 25, p 3-13. DOI : 10.1016/j.matbio.2005.09.002.

## Partie B – Chapitre 1 :

- [1] – WALKER A. A. Oldest Glue Discovered. In : *Archeology* (en ligne). 21 mai 1998. Consulté le 28/05/2016. Disponible à l'adresse : <http://archive.archaeology.org/online/news/glue.html>
- [2] – DJABOUROV M., LEBLOND J., PAPON P. I. Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. *Journal de physique*, 1988, vol 49, p 319-332.
- [3] – WRIGHT N.T., HUMPHREY J.D. Denaturation of collagen via heating : an irreversible rate process. *Annual review of biomedical engineering*, 2002, vol 4, p 109-128. DOI : 10.1146/annurev.bioeng.4.101001.131546
- [4] – BABEL W., SCHULZ D., GIESEN-WIESE M., SEYBOLD U., GAREIS H., DICK E., SCHRIEBER R., SCHOTT A., STEIN W. Gelatin. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2000. DOI : 10.1002/14356007.a12\_307.
- [5] – RBII K. *Formation d'agrégats de haut poids moléculaires dans la gélatine et comportement en solution aqueuse*. Thèse de doctorat : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition. Toulouse : Institut National Polytechnique de Toulouse, 2010.
- [6] – GIRAUD-GUILLE M.M. Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcified tissue international*, 1988, vol 42, p. 167-180. DOI : 10.1007/BF02556330.
- [7] – DEPALLEA B., QINA Z., SHEFELBINEB S.J., BUEHLER M. J. Influence of cross-link structure, density and mechanical properties in the mesoscale deformation mechanisms of collagen fibrils. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2015, vol 52, p. 1-13. DOI : 10.1016/j.jmbbm.2014.07.008.
- [8] – ELHARFAOUI N., DJABOUROV M., BABEL W. Molecular weight influence on gelatin gels : structure, enthalpy and rheology. *Macromolecular symposia*, 2007, vol 256, p. 149-157. DOI : 10.1002/masy.200751017
- [9] – RUGGIERO F., ROULET M., BONOD-BIDAUD C. Les collagènes du derme : au-delà de leurs propriétés structurales. *Journal de la société de Biologie*, 2005, vol 199, p. 301-311. DOI : 10.1051/jbio:2005031.
- [10] – CAMERON G. J., ALBERTS I. L., LAING J. H., WESS T.J. Structure of type I and type III heterotypic collagen fibrils : an X-Ray diffraction study. *Journal of structural biology*, 2002, vol 137, p. 15-22. DOI : 10.1006/jsbi.2002.4459.

- [11] – DUCONSEILLE A., ASTRUC T., QUINTANA N., MEERSMAN F., SANTE-LHOUTELLIER V. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution : a review. *Food hydrocolloids*, 2015, vol 43, p. 360-376. DOI : 10.1016/j.foodhyd.2014.06.006.
- [12] – HULMES D.J.S. Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In : FRATZL P. (dir.). *Collagen – Structure and Mechanics*. New York : Springer US, 2008, chapitre 2, p. 15-47. ISBN : 978-0-387-73905-2.
- [13] – HENKEL W., GLANVILLE R.W. Covalent crosslinking between molecules of type I and type III collagen. The Involvement of the N-Terminal, nonhelical regions of the  $\alpha$ (I) and  $\alpha$ (III) chains in the formation of intermolecular crosslinks. *European Journal of Biochemistry*, 1982, vol 122, p. 205-213.
- [14] – EASTOE J.E. The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochemical Journal*, 1955, vol 61, n°4 p. 589-600. DOI : 10.1042/bj0610589.
- [15] – HARRINGTON W.F., VENKATESWARA RAO N. Collagen structure in solution. I. Kinetics of helix regeneration in single-chain gelatins. *Biochemistry*, 1970, vol 9, n°19 p. 3714-3724.
- [16] – GUO L., COLBY R.H., LUSIGNAN C.P., WHITESIDES T.H. Kinetics of triple helix formation in semidilute gelatin solutions. *Macromolecules*, 2003, vol 36, p. 9999-10008.
- [17] – GUO L., COLBY R.H., LUSIGNAN C.P., HOWE A.M. Physical gelations of gelatin studied with rheo-optics. *Macromolecules*, 2003, vol 36, p. 10009-10020.

## Partie B – Chapitre 2 :

- [1] – The pitch drop experiment. In : *The university of Queensland, Australia* (en ligne). Consulté le 30/05/2016. Disponible à l'adresse : <http://www.thetenthwatch.com/feed/#>
- [2] – The pitch drop experiment. In : *Atlas Obscura* (en ligne). Consulté le 31/08/2016. Disponible à l'adresse : <http://www.atlasobscura.com/places/pitch-drop-experiment>
- [3] – Liquid crystals. In : *BeautifulChemistry.net* (en ligne). Consulté le 29/04/2016. Disponible à l'adresse : <http://www.beautifulchemistry.net/structure/#/liquid-crystals/>
- [4] – MITOV M. Cholesteric liquid crystals with a broad light reflection band. *Advanced Materials*, 2012, vol 424, p 6260-6276.
- [5] – TEULON C. *Imagerie quantitative du collagène par microscopie par génération de seconde harmonique résolue en polarisation*. Thèse de doctorat : Biophysique. Ecole Polytechnique : 2016.
- [6] – LEHMANN M., SELTMANN J. Low temperature enantiotropic nematic phases from V-shaped, shape-persistent molecules. *Beilstein Journal of organic chemistry*, 2009, vol 5, n° 73. DOI : 10.3762/bjoc.5.73
- [7] – Introduction to liquid crystal. In : *Barret Group – MacGill* (en ligne). Consulté le 15/06/2016. Disponible à l'adresse : [http://barrett-group.mcgill.ca/tutorials/liquid\\_crystal/LC03.htm](http://barrett-group.mcgill.ca/tutorials/liquid_crystal/LC03.htm)

- [8] – BAEZ J. The butterfly, the gyroid and the neutrino (en ligne). Consulté le 24/06/2016. Disponible à l'adresse : <http://math.ucr.edu/home/baez/butterfly.html>
- [9] – HAMLEY I.W. Liquid crystal phase formation by biopolymers. *Soft Matter*, 2010, vol 6, p 1863-1871. DOI : 10.1039/b923942a
- [10] – CAU P., SEITE R. La membrane plasmique. In : CAU P. SEITE R. (dir.). *Cours de biologie cellulaire (4 édition)*. Paris : Ellipses, 2007, chapitre 4, p. 104-166. ISBN : 978-2-7298-3080-9.
- [11] – MYERS A. M., MORELL M.K., JAMES M.G., BALL S.G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Starch*, 2010, vol 62, p 389-420. DOI : 10.1002/star.201000013.
- [12] – PEREZ S., BERTOFT E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules : a comprehensive review. *Starch*, 2010, vol 62, p 389-420. DOI : 10.1002/star.201000013.
- [13] – WAIGH T.A., PERRY P., RIEKEL C., GIDLEY M.J., DONALD A.M. Chiral side-chain liquid-crystalline polymeric properties of starch. *Plant physiology*, 2000, vol 122, p 989-997. DOI : 10.1104/pp.122.4.989.
- [14] – VERDUGO P. Mucin exocytosis. *American review of respiratory diseases*, 1991, vol 144, Supplement Airway Mucin, p S33-S37. DOI : 10.1164/ajrccm/144.3\_pt\_2.S33.
- [15] – VINEY C., HUBER A.E., VERDUGO P. Liquid crystalline order in mucus. *Macromolecules*, 1993, vol 26, p 852-855. DOI : 10.1021/ma00056a044
- [16] – DENNY M.W., GOSLINE M. The physical properties of the pedal mucus of the terrestrial slug, *Ariolimax Columbianus*. *The journal of experimental biology*, 1980, vol 88, p 375-393.
- [17] – Mikrocopia.com (en ligne). Consulté le 30/06/2016. Disponible à l'adresse : <http://forum.mikrocopia.com/topic/6803-amidon-pomme-de-terre/?hl=%2Bamidon+%2Bpomme+%2Bde+%2Bterre>
- [18] –LIVOLANT F. Ordered phases of DNA in vivo and in vitro. *Physica A*, 1991, vol 176, p 117-137.
- [19] –WARD W.S., COFFEY D.S. DNA packing and organisation in mammalian spermatozoa : comparaison with somatic cells. *Biology of reproduction*, 1991, vol 44, p 569-574.
- [20] –VERMEY B.G, CHAPMAN M.G., COOKE S., KILANI S. The relationship between sperm head retardance using polarized light microscopy and clinical outcomes. *Reproductive biomedecine online*, 2015, vol 30, p 67-73.
- [21] –GIANAROLI L., MAGLI M.C., FERRARETTI A.P., CRIPPA A., LAPPI M., CAPITANI S., BACCETTI B. Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 2010, vol 93, n°93, p 807-813.
- [22] – FELSENFELD G., GROUDINE M. Controlling the double helix. *Nature*, 2003, vol 421, p 448-453.
- [23] – WOJCIESZAK M. *La soie, « modèle » de polymères naturels fibreux : analyse vibrationnelle et nano/micromécanique, de la fibre au composite*. Thèse de doctorat : Chimie. Paris : UPMC, 2014.

- [24] – KNIGHT D.P., VOLLRATH F. Biological liquid crystal elastomers. *Philosophical transactions of the royal society B*, 2002, vol 357, p 155-163.
- [25] – WALKER A.A., HOLLAND C., SUTHERLAND T.D. More than one way to spin a crystallite : multiple trajectories through liquid cristallinity to solid silk. *Proceedings of the royal society B*, 2015, vol 282. DOI : 10.1098/rspb.2015.0259
- [26] – VOLLRATH F., KNIGHT D. P. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature*, 2001, vol 410. DOI : 10.1038/35069000.
- [27] – HOLLAND C., VOLLRATH F., RYAN A.J., MYKHAYYK O.O. Silk and synthetic polymers reconciling 100 degrees of separation. *Advanced Materials*, 2012, vol 24, p 105-109. DOI : 10.1002/adma.201103664.
- [28] – ANDERSSON M., HOLM L., RIDDERSTRALE Y., JOHANSSON J., RISING A. Morphology and composition of the spider major ampullate gland. *Biomacromolecules*, 2013, vol 14, p 2945-2952. DOI : 10.1021/bm400898t.
- [29] –JIN H.J., KAPLAN D.L. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature*, 2003, vol 424, p 1057-1061. DOI : 10.1038/nature01809.
- [30] – DEVILLE S. The making of a paper – A praise for slow Science (en ligne). Mise en ligne en mars 2014. Consulté le 15/05/2016. Disponible à l'adresse : <https://sylvaindeville.net/2014/03/>.
- [31] – CARTWRIGHT J.H.E., CHECA A.G., ESCRIBANO B., SAINZ-DIAZ I. Spiral and target patterns in bivalve nacre manifest a natural excitable medium from layer growth of a biological liquid crystal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, vol 106, n° 26, p 10499-10504. DOI : 10.1073 pnas.0900867106.
- [32] – CARTWRIGHT J.H.E., CHECA A.G. The dynamics of nacre self-assembly. *Journal of the royal society interface*, 2007, vol 4, p 491-504. DOI : 10.1098/rsif.2006.0188.
- [33] – BOULIGAND Y. Liquid crystals and biological morphogenesis : Ancient and new questions. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences - Chimie*, 2007, p 1-16. DOI : 10.1016/j.crci.2007.10.001.
- [34] – CHUNG W.J., OH J.W., KWAK K., LEE B.Y., MEYER J., WANG E., HEXEMER A., LEE S.W. Biomimetic self-templating supramolecular structures. *Nature*, 2011, vol 478, p 364-368. DOI : 10.1038/nature.10513.
- [35] – GILBERT R.D., PATTON P.A. Liquid crystal formation in cellulose and cellulose derivatives. *Progress in polymer science*, 1983, vol 9, p 115-131.
- [36] – BELAMIE E., DAVIDSON P., GIRAUD-GUILLE M.M. Structure and chirality of the nematic phase in  $\alpha$ -chitin suspensions. *The journal of physical chemistry B*, 2004, vol 108, issue 39, p 14991-15000. DOI : 10.1021/jp048152u.
- [37] – GIRAUD-GUILLE M.M., MOSSER G., BELAMIE E. Liquid cristallinity in collagen systems in vitro and in vivo. *Current opinion in colloid and interface science*, 2008, vol 13, p 303-313. DOI : 10.1016/j.cocis.2008.03.002.
- [38] – DE SA PEIXOTO P., DENISET-BESSEAU A., SCHMUTZ M., ANGLO A., ILLOUL C., SCHANNE-KLEIN M.-C., MOSSER G. Achievement of cornea-like

- organizations in dense collagen I solutions: clues to the physico-chemistry of cornea morphogenesis. *Soft Matter*, 2013, vol 9, p 11241-11248. DOI : 10.1039/C3SM52097H.
- [39] – MOSSER G., ANGLO A., HELARY C., BOULIGAND Y., GIRAUD-GUILLE M-M. Dense tissue-like collagen matrices formed in cell-free conditions. *Matrix Biology*, 2006, vol 25, p 3-13. DOI : 10.1016/j.matbio.2005.09.002.
  - [40] – NASSIF N., GOBEAUX F., SETO J., BELAMIE E., DAVIDSON P., PANINE P., MOSSER G., FRATZL P., GIRAUD-GUILLE M-M. Self-assembled collagen-apatite matrix with bone-like hierarchy. *Chemistry of materials*, 2010, vol 22, p 3307-3309. DOI : 10.1021/cm903594n.
  - [41] – NASSIF N. Nouveaux composites hybrides à bases de collagène : une passerelle vers « l'os artificiel » (vidéo). In : *Collège de France* (en ligne). Mise en ligne : 11/2013. Consulté le 20/01/2014. Disponible à l'adresse : <http://www.college-de-france.fr/site/clement-sanchez/seminar-2013-11-20-17h00.htm>
  - [42] – UPMC, CNRS, EPHE. *Bone substitute et method for the preparation thereof*. Inventeurs : Nadine NASSIF, Frederic GOBEAUX, Marie-Madeleine GIRAUD-GUILLE, Gervaise MOSSER. USA, brevet : US8859008 (B2). 2014-10-14. Disponible à l'adresse : <http://www.google.com.ar/patents/US8859008>
  - [43] – TIDU A., GHOUWAY-BENALLAOUA D., LYNCH B., HAYE B., ILLOUL C., ALLAIN J.-M., BORDERIE V.M., MOSSER G. Development of human corneal epithelium on organized fibrillated transparent collagen matrices synthesized at high concentration. *Acta Biomaterialia*, 2015, vol 22, p 50-58. DOI : 10.1016/j.actbio.2015.04.018.
  - [44] – .
  - [45] – HARRINGTON W.F., VENKATESWARA RAO N. Collagen structure in solution. I. Kinetics of helix regeneration in single-chain gelatins. *Biochemistry*, 1970, vol 9, n°19 p. 3714-3724.
  - [46] – TIDU A. *Synthèse d'une cornée artificielle à base de collagène I. De la conception des matrices à l'intégration des cellules*. Thèse de doctorat : Physique et chimie des matériaux. Paris : UPMC, 2016.
  - [47] – GOBEAUX F. *Phases denses de collagène de type I : transition isotrope/cholestérique, fibrillogenèse et minéralisation*. Thèse de doctorat : Biophysique moléculaire. Paris : UPMC, 2007.
  - [48] – DE GENNES P.G., PROST J. *The physics of liquid crystals ( 2<sup>nd</sup> edition)*. Oxford University Press, International series of monographs on physics, 1993. ISBN : 0-19852024-7.
  - [49] – AGUILAR GUTIERREZ O.F., REY A.D. Structure characterisation method for ideal et non-ideal twisted plywoods. *Soft matter*, 2014, vol 10, p 9946-9453. DOI : 10.1039/C4SM01803F.
  - [50] – LEE D.B.N., JAMGOTCHIAN N., ALLEN S.G., ABELES M.B., WARD H.J. A lipid-protein hybrid model for tight junction. *American journal of physiology – Renal physiology*, 2008, vol 295, n°6, p 1601-1612. DOI : 10.1152/ajprenal.00097.2008.

## Partie B – Chapitre 3 :

- [1] – RAMIREZ-RODRIGUEZ G.B., IAFISCO M., TAMPIERI A., GOMES-MORALES J., DELGADO-LOPEZ J.M. pH-responsive collagen fibrillogenesis in confined droplets induced by vapour diffusion. *Journal of materials science : Materials in medicine*, 2014, vol 25, p 2305-2312. DOI : 10.1007/s10856-014-5189-1.
- [2] – WESS T.J. Collagen fibrillar structure and hierarchies. In : FRATZL P. (dir.). *Collagen – Structure and Mechanics*. New York : Springer US, 2008, chapitre 3, p. 49-80. ISBN : 978-0-387-73905-2.
- [3] – HODGE A.J., PETRUSKA J.A. Recent studies with the electron microscope on ordered aggregates of the tropocollagen molecule. In : RAMACHANDRA G.N. (dir.). *Aspects of protein chemistry*. London : Academic Press, 1963, p. 289-300.
- [4] – Extracellular structures. In : *Principles of cell biology* (en ligne). Consulté le 30/08/2016. Disponible à l'adresse : [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-17/17\\_15.jpg](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-17/17_15.jpg)
- [5] – HULMES D.J.S., WESS T.J., PROCKOP D.J., FRATZL P. Radial packing, order and disorder in collagen fibrils. *Biophysical journal*, 1995, vol 68, p 1661-1670. DOI : 10.1016/S0006-3495(95)80391-7.
- [6] – BOULIGAND Y., DENEFLÉ J.P., LECHAIRE J.P., MAILLARD M. Twisted architectures in cell-free assembled collagen gels : study of collagen substrates used for cultures. *Biology of the cell*, 1985, vol 54, issue 2, p 143-162. DOI : 10.1111/j.1768-322X.1985.tb00389.x
- [7] – BROWN A.I., KREPLAK L., RUTENBERG A.D. An equilibrium double-twist model for the radial structure of collagen fibrils. *Soft matter*, 2014, vol 10, p 8500-8511. DOI : 10.1039/c4sm01359j.
- [8] – HULMES D.J.S. Building collagen molecules, fibrils and suprafibrillar structures. *Journal of structural biology*, 2002, vol 137, p 2-10. DOI : 10.1006/jsbi.2002.4450.
- [9] – YOSHIOKA J., ITO F., TABE Y. Stability of a double twisted structure in spherical cholesteric droplets. *Soft matter*, 2016, vol 12, issue 8, p 2400-2408. DOI : 10.1039/c5sm02838h.
- [10] – CANTY G.E., MEADOWS R.S., SHAW M.K., HOLMES D.F., KADLER K.E. Coalignment of plasma membrane channels and protrusions (fibripositors) specifies the parallelism of tendon. *Journal of cell biology*, 2004, vol 165, n° 4, p 553-563. DOI : 10.1083/jcb.200312071
- [11] – HULMES D.J.S. Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In : FRATZL P. (dir.). *Collagen – Structure and Mechanics*. New York : Springer US, 2008, chapitre 2, p. 15-47. ISBN : 978-0-387-73905-2.
- [12] – KADLER K.E., HOJIMA Y., PROCKOP D.J. Assembly of collagen fibrils de novo by cleavage of the type I PCCollagen with procollagen C-Proteinase. Assay of critical concentration demonstrates that collagen self-assembly is a classical example of an entropy-driven process. *Journal of biological chemistry*, 1987, vol 260, n°32, p 15696-15701.
- [13] – COOPER A. Thermodynamic studies of the assembly in vitro of native collagen fibrils. *Biochemical journal*, 1970, vol 118, p 355-365.

- [14] – LEIKIN S., RAU D.C., PARSESIAN V.A. Temperature-favoured assembly of collagen is driven by hydrophilic not hydrophobic interactions. *Nature structural biology*, 1995, vol 2, issue 3, p 205-210. DOI : 10.1038/nsb0395-205.
- [15] – SHOULDERS M.D., RAINES R.T. Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*, 2009, vol 78, p 929-958. DOI : 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.
- [16] – BESSEAU L., GIRAUD-GUILLE M-M. Stabilization of fluid cholesteric phases of collagen to ordered gelled matrices. *Journal of molecular biology*, 1995, vol 251, issue 11, p 197-202. DOI : 10.1006/jmbi.1995.0426.
- [17] – ORGEL J.P.R.O., IRVING T.C., MILLER A., WESS T.J. Microfibrillar structure of type I collagen *in situ*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2006, vol 103, issue 24, p 9001-9005. DOI : 10.1073/pnas.0502718103.
- [18] – TIDU A. *Synthèse d'une cornée artificielle à base de collagène I. De la conception des matrices à l'intégration des cellules*. Thèse de doctorat : Physique et chimie des matériaux. Paris : UPMC, 2016.

#### **Partie B – Conclusions :**

- [1] – CARN F., DJABOUROV M., CORADIN T., LIVAGE J., STEUNOU N. Influence of decavanadate clusters on the rheological properties of gelatin. *Journal of physical chemistry B*, 2008, vol 112, p 12596-12605. DOI : 10.1021/jp802146g.

#### **Partie C – Introduction :**

- [1] – QUIGNARD S., COPELLO G.J., AIME C., BATAILLE I., HELARY C., DESIMONE M.F., CORADIN T. Influence of silification on the structural and biological properties of buffer-mediated collagen hydrogel. *Advanced biomaterials*, 2012, vol 15, n°3, p B51-B55. DOI : 10.1002/adem.201180063.
- [2] – HEINEMANN S., CORADIN T., DESIMONE M.F. Bio-inspired silica-collagen materials : applications and perspectives in the medical field. *Biomaterials science*, 2013, vol 1, p 688-702. DOI : 10.1039/c3bm00014a.
- [3] – DESIMONE M.F., HELARY C., MOSSER G., GIRAUD-GUILLE M.-M., LIVAGE J., CORADIN T. Fibroblast encapsulation in hybrid silica-collagen. *Journal of materials chemistry*, 2010, vol 20, p 666-668. DOI : 10.1039/b921572g.
- [4] – DESIMONE M.F., HELARY C., RIETVELD I.B., BATAILLE I., MOSSER G., GIRAUD-GUILLE M.-M., LIVAGE J., CORADIN T. Silica-collagen bionanocomposites as three-dimensional scaffolds for fibroblast immobilization. *Acta biomaterialia*, 2010, vol 6, p 3998-4004. DOI : 10.1039/b921572g.
- [5] – DESIMONE M.F., HELARY C., QUIGNARD S., RIETVELD I.B., BATAILLE I., COPELLO G.J., MOSSER G., GIRAUD-GUILLE M.-M., LIVAGE G., MEDDAHI-PELLE A., CORADIN B. In vitro studies and preliminary in vivo



- evaluation of silicified concentrated collagen hydrogels. *Applied and materiel interfaces*, 2011, vol 3, p 3831-3838. DOI : 10.102/am2000984.
- [6] – MEBERT A.M., AIME C., ALVAREZ G.S., SHI Y., FLOR S.A., LUCANGIOLI S.E., DESIMONE M.F., CORADIN T. Silica core-shell particles for the dual delivery of gentamycin and rifamycine antibiotics. *Journal of materials chemistry B*, 2016, vol 4, p 3135-3144. DOI : 10.1039/c6tb00281a.
  - [7] – GONZALEZ C.G., ALVAREZ G.S., CAMPOROTONDI D.E., FOGLIA M.L., AIME C., DIAZ L.E., CORADIN T., DESIMONE M.F. Preliminary evaluation of median lethal concentrations of Stöber silica particles with various sizes and surface functionalities towards fibroblast cells. *Silicon*, 2014, p 1-6. DOI : 10.1007/s12633-014-9203-5.
  - [8] – ALVAREZ G.S., HELARY C., MEBERT A.M., WANG X., CORADIN T., DESIMONE M.F. Antibiotic-loaded silica nanoparticle-collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. *Journal of materials chemistry B*, 2014, vol 2, p 4660-4670. DOI : 10.1039/c4tb00327f.

### Partie C – Chapitre 1 :

- [1] – Les pansements, indications et utilisations recommandées. In : *Haute Autorité de Santé* (en ligne). Consulté le 08/09/2016. Disponible à l'adresse : [http://www.has-sante.fr/portail/jcms/r\\_1438004/fr/les-pansements-indications-et-utilisations-recommandees-fiche-but](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/r_1438004/fr/les-pansements-indications-et-utilisations-recommandees-fiche-but)
- [2] – MENKE N.B., WARD K.R., WITTEN T.M., BONCHEV D.G., DIEGELMANN R.F. Impaired wound healing. *Clinics in dermatology*, 2007, vol 25, p 19-25. DOI : 10.1016/j.clindermatol.2006.12.005.
- [3] – FAIVRE B. Prise en charge des plaies chroniques. In : *Centre de traitement ambulatoire des plaies chroniques – CHU de Besançon* (en ligne). Consulté le 08/09/2016. Disponible à l'adresse : [https://www.chu-besancon.fr/geriatrie/5et6mai/2011\\_PlaiesChroniques\\_CapaciteGeriatrie\\_Besancon.pdf](https://www.chu-besancon.fr/geriatrie/5et6mai/2011_PlaiesChroniques_CapaciteGeriatrie_Besancon.pdf)
- [4] – ALVAREZ G.S., HELARY C., MEBERT A.M., WANG X., CORADIN T., DESIMONE M.F. Antibiotic-loaded silica nanoparticle-collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. *Journal of materials chemistry B*, 2014, vol 2, p 4660-4670. DOI : 10.1039/c4tb00327f.
- [5] – Le pied diabétique et ses affections. In : *Fédération Française des Diabétiques* (en ligne). Consulté le 08/09/2016. Disponible à l'adresse : <http://www.afd.asso.fr/diabete/complications/pieds>
- [6] – GURTNER G.C., WERNER S., BARRANDON Y., LONGAKER M.T., Wound repair and regeneration. *Journal of investigative dermatology*, 2007, vol 127, p 514-525. DOI : 10.1038/sj.jid.5700701.
- [7] – EMING S.A., KRIEG T., DAVIDSON J.M. Inflammation in wound repair : molecular and cellular mechanism. *Nature*, 2008, vol 435, p 314-321. DOI : 10.1038/nature07039.
- [8] – KOHL T.J., DI PIETRO L.A. Inflammation and wound healing : the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, 2013, vol 13. DOI : 10.1017/S1462399411001943.

- [9] – DEMARCHEZ M. La phase de prolifération et de réparation de la cicatrisation cutanée. In : *Biologie de la peau* (en ligne). Mise en ligne le 29/09/2015. Consulté le 08/09/2016. Disponible à l'adresse : <http://biologiedelapeau.fr/spip.php?article80>
- [10] – HELARY C., DESIMONE M.F. Recent advances in biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2015, vol 16, n° 7, p 1-11. DOI : 10.2174/138920101607150427112208.
- [11] – OVINGTON L.G. Advances in wound dressings. *Clinics in dermatology*, 2007, vol 25, p33-38. DOI : 10.1016/j.clindermatol.2006.09.003.
- [12] – ALVAREZ G.S., HELARY C., MEBERT A.M., WANG X., CORADIN T., DESIMONE M.F. Antibiotic-loaded silica nanoparticle-collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. *Journal of materials chemistry B*, 2014, vol 2, p 4660-4670. DOI : 10.1039/c4tb00327f.
- [13] – MENG X., TIAN F., YANG J., HE C.N., XING N., LI F. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *Journal of materials science : Materials in medicine*, 2010, vol 21, p 1751-1759. DOI : 10.1007/s10856-010-3996-6.
- [14] – CULLEN B., WATT P.W., LUNDQVIST C., SILCOCK D., SCHMIDT R.J., BOGAN D., LIGHT N.D. The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 2002, vol 32, p 1544-1556.
- [15] – MOURA L.I.F., DIAS A.M.A., ERMELINDO C.L., CARVALHO L., DE SOUSA H.C., CARVALHO E. Chitosan-based dressings loaded with neurotensin – an efficient strategy to improve early diabetic wound healing. *Acta biomaterialia*, 2014, vol 10, p 843-857. DOI : 10.1016/j.actbio.2013.09.040.
- [16] – MOURA L.I.F., DIAS A.M.A., SUESCA E., CASADIEGOS S., LEAL C.L., FONTANILLA M.R., CARVALHO L., DE SOUSA H.C., CARVALHO E. Neurotensin-loaded collagen dressings reduce inflammation and improve wound healing in diabetic mice. *Biochimica et biophysica acta*, 2014, vol 1842, p 32-43. DOI : 10.1016/j.bbadis.2013.10.009.
- [17] – ANUMOLU S.S., MENJOGE A.R., DESHMUKH M., GERECKE D., STEIN S., LASKIN J., SINKO P.J. Doxocycline hydrogels with reversible disulfide crosslinks for dermal wound healing of mustard injuries. *Biomaterials*, 2011, vol 32, p 1204-1217. DOI : 10.1016/j.biomaterials.2010.08.117.
- [18] – BRETT D. A review of collagen and collagen-based wound dressing. *Wounds* (en ligne). Consulté le 08/02/2016. Disponible à l'adresse : <http://www.woundsresearch.com/content/a-review-collagen-and-collagen-based-wound-dressings>
- [19] – PERCIVAL S.L., HILL K.E., WILLIAMS D.W., HOOPER S.J., THOMAS D.W., COSTERTON J.W. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound repair and regeneration*, 2012, vol 20, issue 5, p 547-557. DOI : 10.1111/j.1524-475X.2012.00836.x
- [20] – DI GIULIO A., BARRACCHINI A., CELLAI L., MARTUCCIO C., AMICOSANTE G., ORATORE A., PANTALEONI G.C. Rifamycins as inhibitors

of collagenase activity : their possible pharmacological role in collagen degradative diseases. *International journal of pharmaceutics*, 1996, vol 144, issue 5, p 27-35.

- [21] – SPISANI S., TRANIELLO S., MOCHI ONORI A., RIZZUTI O., MARTUCCIO C., CELLAI L. 3-(carboxyalkylthio)-rifamycin S and SV derivatives inhibit human neutrophil functions. *Inflammation*, 1998, vol 22, issue 5, p 459-469.

## Partie C – Chapitre 2 :

- [1] – KORZYBSKI T., KOWSZYK-GINDIFER Z., KURYLOWICZ W. *Antibiotics : origin, nature and properties*. Oxford : Pergamon Press, 2013. ISBN: 978-1-4831-9802-6.
- [2] – Rifamycine. In : *Wikipedia* (en ligne). Consulté le 29/08/2016. Disponible à l'adresse : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Rifamycine>
- [3] – ALMDAL K., DYRE J., HYIDT S., KRAMER O. Towards a phenomenological definition of the term « gel ». *Polymer gels and networks*, 1993, vol 1, issue 1, p 5-17. DOI : 10.1016/0966-7822(93)90020-I.
- [4] – MU C., LI D., LIN W., DING Y., ZHANG G. Temperature induced denaturation of collagen in acidic solution. *Biopolymers*, 2007, vol 86, n°4, p 282-287. DOI : 10.1002/bip.20742.
- [5] – PERCIVAL S.L., HILL K.E., WILLIAMS D.W., HOOPER S.J., THOMAS D.W., COSTERTON J.W. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound repair and regeneration*, 2012, vol 20, issue 5, p 547-557. DOI : 10.1111/j.1524-475X.2012.00836.x
- [6] – ALVAREZ G.S., HELARY C., MEBERT A.M., WANG X., CORADIN T., DESIMONE M.F. Antibiotic-loaded silica nanoparticle-collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. *Journal of materials chemistry B*, 2014, vol 2, p 4660-4670. DOI : 10.1039/c4tb00327f.
- [7] – LOWY F.D. Antimicrobial resistance : the example of *Staphylococcus Aureus*. *The journal of clinical investigation*, 2003, vol 111, issue 9, p 1265-1273. DOI : 10.1172/JCI200318535.
- [8] – EASTOE J.E. The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochemical Journal*, 1955, vol 61, n°4, p. 589-600. DOI : 10.1042/bj0610589.
- [9] – DE MESQUITA J.P., PATRICIO P.S., DONNICI C.L., PETRI D.F.S., DE OLIVEIRA L.C.A., PEREIRA F.V. Hybrid layer-by-layer assembly based on animal and vegetable structural materials : multilayered films of collagen and cellulose nanowhiskers. *Soft Matter*, 2011, vol 7, p. 4405-4413. DOI : 10.1039/C0SM01168A.

## **Table des figures**

## Table des figures.

### Introduction générale :

- Figure 1 : La structure hiérarchique du tendon (d'après [1])..... 9
- Figure 2 : Le collagène est la brique moléculaire à l'origine de la majorité des tissus humains [3]..... 10

### Partie A - Chapitre 1 :

- Figure 1 : Représentation schématique des interactions entre le fibroblaste et les constituants de la matrice extracellulaire (d'après [44]). ..... 15
- Tableau 1 : Répartition des collagènes en sous-famille (d'après [12]). .... 15
- Tableau 2 : Paramètres décrivant l'hélice  $\alpha$  et l'hélice PPII..... 16
- Figure 2 : structure en triple hélice du collagène. En A, vue axiale de l'hélice indiquant la conformation des carbones  $\alpha$  de chaque chaîne. On observe que les résidus glycines sont enfouis au centre de la triple hélice. En B, vue de côté du modèle compact de la triple hélice droite de collagène (d'après [12]). ..... 17
- Figure 3 : Diagramme illustrant la composition en acide aminé du collagène de type I (d'après [14]). ..... 18
- Figure 4 : Modification post-traductionnelle des chaînes  $\alpha$  dans le réticulum endoplasmique et association sous forme de procollagène (d'après [12]). ..... 20
- Figure 5 : Schéma d'une coupe transversale de queue de rat ..... 25
- Figure 6 : Gel d'électrophorèse en condition dénaturante. A gauche, solution de collagène. A droite, marqueur de poids moléculaire. .... 28

### Partie A - Chapitre 2 :

- Figure 1 : Préparation des échantillons pour le cryo-MET. .... 36
- Figure 2 : Diagrammes de Jablonski simplifiés des processus de fluorescence à 1 et 2 photons. .... 37
- Figure 3 : Distribution spatiale de l'intensité de fluorescence pour un phénomène d'absorption à un photon (A) et à deux photons (B). Les deux cuves contiennent la même solution de fluorescéine. Sur la figure B, on observe la propriété intrinsèque de sectionnement optique du 2-PEF (d'après [8]). ..... 38
- Figure 4 : Intensité en fonction du temps pour un laser continu (en haut) et un laser impulsionnel (en bas)..... 39
- Figure 5 : Intensité de fluorescence à deux photons en fonction de la concentration en collagène. Les mesures ont été effectuées sur deux lots de collagène. .... 40
- Figure 6 : Diagrammes de Jablonski simplifiés de la diffusion de Rayleigh et de la SHG. .... 40

- Figure 7 : Effet de l'orientation des harmonophores sur le signal SHG : cas de deux harmonophores orientées parallèlement (interférences constructives) ou anti-parallèlement (interférences destructives). ..... 42
- Figure 8 : Illustration d'un milieu permettant la SHG (a, milieu organisé) ou la diffusion hyper-Rayleigh (b, milieu isotrope) (d'après [1])..... 42
- Figure 9 : Effet de l'angle hors plan  $\psi$  sur l'intensité du signal SHG. Au centre, image en microscopie SHG d'une phase cristalline liquide de collagène. A l'aide du profil d'intensité à droite, on identifie une phase organisée en contre-plaqué (voir Partie II-Chapitre 2). Le collagène est alternativement dans le plan de l'image ou perpendiculaire au plan de l'image (d'après [4]). ..... 44
- Figure 10 : Principe des mesures résolues en polarisation et diagramme angulaire typique du collagène (d'après [4])..... 44
- Figure 11 : Angles  $\varphi$  et  $\psi$  caractérisant l'orientation moyenne des triples hélices dans le volume focal (d'après [4]). ..... 45
- Figure 12 : Schéma du microscope (d'après [4]). ..... 46
- Figure 13 : Illustration de l'effet Zeeman sur un ensemble de protons  $^1\text{H}$ . ..... 48
- Figure 14 : Approche énergétique de l'effet Zeeman : la levée de dégénérescence. .... 49
- Figure 15 : Approche quantique (partie haute) et classique (partie basse) du phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN)..... 50
- Figure 16 : Relaxation longitudinale ou relaxation  $T_1$ . La désexcitation des spins s'opère par échange thermique avec le milieu environnant. Il entraîne une repousse de l'aimantation longitudinale ( $M_z$ ). ..... 51
- Figure 17 : Relaxation transversale ou relaxation  $T_2$ . Les inhomogénéités locales du champ magnétique modifient légèrement la vitesse de précession des spins (partie haute) et induisent une perte de cohérence dans le plan transversal (milieu de la figure) à l'origine de la disparition de  $M_{xy}$  (partie basse). ..... 53

## Partie B - Chapitre 1 :

- Figure 1 : Procédé industriel d'extraction de la gélatine (A et B) à partir d'os de bœuf et de peau de porc. .... 62
- Figure 2 : Extrusion de bouillon concentré et gélifié de gélatine (d'après [5])..... 64
- Tableau 1 : Les domaines d'applications de la gélatine en fonction de l'indice bloom..... 65
- Figure 3 : Distribution des masses moléculaires pour 4 échantillons de gélatine B extrait d'os de bœuf. Seules les conditions d'extractions diffèrent entre les échantillons.  $\beta$  et  $\gamma$  correspondent respectivement aux dimères et trimères de chaînes  $\alpha$ . En notera également la présence d'objets de haut poids moléculaire appelés microgels. Ces microgels sont surtout présents dans l'échantillon LB4, le plus dégradé (d'après [8]). ... 66
- Figure 4 : La trimérisation de la gélatine. Le processus s'effectue en 2 étapes : la nucléation et l'enroulement. Les triples hélices peuvent se former entre 1, 2 ou 3 chaîne(s) en fonction de la concentration en

gélatine. La formation de boucles intramoléculaires étant énergétiquement défavorable, les triples hélices à 3 chaînes  $\alpha$  sont les plus stables..... 68

## Partie B - Chapitre 2 :

- Figure 1 : « The pitch drop experiment » (d'après [2]). ..... 72
- Figure 2 : Les deux types de mésophases. A gauche, le cristal liquide présente un ordre orientationnel 1D mais pas d'ordre positionnel. A l'inverse, à droite, le cristal plastique présente un ordre positionnel 2D mais pas d'ordre orientationnel. .... 73
- Figure 3 : Représentation schématique d'une phase nématique calamitique. Les mésogènes, figurés sous la forme de bâtonnets bleus, sont orientés selon le directeur. On note qu'il n'y a toutefois pas d'ordre positionnel (d'après [3])...... 74
- Figure 4 : Représentation schématique d'une phase nématique chirale calamitique ou phase cholestérique. Les mésogènes, figurés sous la forme de bâtonnets bleus, sont orientés selon le directeur. Le directeur effectue, quant à lui, une rotation continue autour d'un axe perpendiculaire aux plans des mésogènes. On note qu'il n'y a toutefois pas d'ordre positionnel (d'après [3])...... 75
- Figure 5 : Représentation schématique d'une phase contre-plaqué calamitique. Les mésogènes, polaires, sont figurés sous la forme de flèches roses. On observe l'alternance de lamelles nématiques dont le directeur est successivement orienté selon Y ou selon Z (d'après [5])...... 75
- Figure 6 : Nématique uniaxe (à gauche) et biaxe (à droite) (d'après [6]). 76
- Figure 7 : Représentation schématique d'une phase smectique calamitique. Les mésogènes, figurés sous la forme de bâtonnets bleus, sont orientés selon le directeur. De plus, ils s'associent pour former des couches équidistantes. On observe à la fois un ordre orientationnel et un ordre positionnel (d'après [3]). ..... 77
- Figure 8 : Phase smectique A (à gauche) et phase smectique C ou tiltée (à droite) (d'après [7])...... 77
- Figure 9 : A gauche, phase smectique C chirale. A droite, représentation de la rotation du directeur en passant d'une couche à une autre (d'après [7]). ..... 78
- Figure 10 : Les assemblages obtenus à partir de mésogènes amphiphiles dispersés dans l'eau (d'après [50]). En A, une micelle sphérique directe. En B, une micelle cylindrique directe. En C, une phase lamellaire..... 79
- Figure 11 : Sculpture représentant un gyroïde. En suivant les arêtes, on peut observer les courbures en forme de selle de cheval (d'après [8]). ... 79
- Figure 12 : L'amylopectine (Ap), un polysaccharide cristal-liquide en peigne. En A, structure chimique de l'amylopectine. La chaîne principale est constituée d'unités D-glucose liés par des liaisons osidiques  $\alpha$ -(1-4). Des branches de poly-D-glucose sont attachées à la chaîne principale par des liaisons osidiques  $\alpha$ -(1-6). Dans l'eau, les branches de l'amylopectine s'associent par deux et forment des doubles hélices. Ces doubles hélices sont des mésogènes capables de former des phases smectiques (B) (d'après [11]). ..... 81

- Figure 13 : Les différents niveaux de structuration de l'amylopectine au sein de l'amyloplaste (d'après [12])..... 81
- Figure 14 : L'amyloplaste, l'organe de stockage de la cellule végétale. A gauche, amyloplastides de pomme de terre observées en microscopie à lumière polarisée (MOP) entre polariseurs croisés (d'après [17]). L'organisation hiérarchisée de l'amylopectine est à l'origine de la biréfringence de l'amyloplaste. On distingue également une striation qui est due à l'alternance des couches amorphes et des couches de phase smectique. A droite, observation MEB d'amyloplastides matures au sein de cellules de pomme de terre. On distingue également les parois cellulaires végétales..... 82
- Figure 15 : L'organisation de l'ADN au sein de la chromatine d'une cellule eucaryote somatique (d'après [22])..... 84
- Figure 16 : Fécondation in vitro et biréfringence des têtes de spermatozoïdes. En utilisant un microscope optique inversé équipé de polariseurs, il est possible de sélectionner les spermatozoïdes en fonction de leur biréfringence. En A, on observe un spermatozoïde dont la totalité de la tête est biréfringente. Ce spermatozoïde possède donc encore son acrosome. En B, seule la partie basse de la tête présente une biréfringence. Ce spermatozoïde a perdu son acrosome et possède un noyau viable dont l'ADN est correctement compacté (d'après [21])..... 85
- Figure 17 : Schéma de la glande ampulacée majeure de l'araignée. La glande est composée de 5 parties. Les cellules épithéliales de la queue et du sac sécrètent les protéines séricigènes. Dans le sac, la solution dense de spidroïne se comporte comme une phase nématique. Cette solution est ensuite expulsée à travers l'entonnoir et le canal où les domaines hydrophobes de la spidroïne sont étirés et alignés sous la contrainte élongationnelle. Dans la partie finale du canal, la mésophase préalignée est stabilisée sous la forme d'une fibre de soie solide. La fibre est finalement expulsée à travers la filière (d'après [28])..... 86
- Figure 18 : Mise en forme de la soie à partir de mésophases de protéines séricigènes. A gauche, les longues protéines amphiphiles (ex : spidroïne, fibroïne de ver à soie.) se replient sous la forme de micelles capable de s'associer en mésophase. Soumises à une contrainte élongationnelle et après une modification progressive des conditions physico-chimiques (pH, concentration en ions, degré d'hydratation, etc.), les micelles se déplient et les protéines adoptent une conformation en feuillet  $\beta$  étendu. A droite, la structure en bâtonnet des petites protéines (ex : fibroïne d'abeille.) leurs confèrent directement un caractère de mésogène. Comme pour les micelles, la formation d'une mésophase permet de fluidifier et d'orienter les protéines séricigènes (d'après [25])..... 87
- Figure 19 : Nacre d'abalone observée au microscope électronique à balayage. Les plaquettes d'aragonite, d'épaisseur contrôlée, sont empilées régulièrement en une structure dite en « mur de brique ». La matrice organique n'est pas observable sur ce cliché (d'après [30]). ..... 89
- Figure 20 : Représentation schématique de la structure de la nacre chez les mollusques bivalves (d'après [31]). ..... 90
- Figure 21 : La structure de Bouligand. En A, coupe d'une carapace de crabe déminéralisée observée en MET [33]. La chitine, molécule



- majoritaire de la matrice organique du crabe, semble former des arceaux. En B, ces motifs en arceaux sont en fait la projection d'une structure en contre-plaqué « twisté », encore appelée « structure de Bouligand ». Cette structure ressemble fortement à une phase cholestérique [49]..... 91
- Figure 22 : Représentation schématique d'une microcellule (d'après [5]). Le volume en rouge correspond à l'espace occupé par la solution de protéines. Les flèches indiquent la direction du gradient de concentration en protéines (pointe de la flèche = zone de concentration élevée)..... 93
  - Tableau 1 : Liste des solutions de gélatine pure observées en microcellules. .... 93
  - Figure 23 : Microcellule observée au MOP entre polariseurs croisés. La solution injectée est une solution de gélatine à 2 mg/mL dans 500 mM d'acide acétique. A l'interface eau/air, on distingue une phase gélifiée (orange) et une phase nématique (grise).....94
  - Figure 24 : Microcellule observée au MOP entre polariseurs croisés. La solution injectée est une solution de gélatine à 0,2 mg/mL dans 500 mM d'acide acétique. A l'interface eau/air, on distingue une phase gélifiée (orange) et une phase nématique (grise).....94
  - Figure 25 : Microcellule observée au MOP entre polariseurs croisés. La solution injectée est une solution de gélatine à 0,2 mg/mL dans 5 mM d'acide acétique. On distingue une phase gélifiée (orange) et une phase nématique (grise) comportant des zones en « flammèche » (rose) identifiées comme des phases pré-nématiques..... 96
  - Figure 26 : Microcellule observée au MOP entre polariseurs croisés. La solution injectée est une solution de gélatine à 0,2 mg/mL dans 3 mM d'acide chlorhydrique. A l'interface eau/air, on distingue une phase gélifiée (orange) et une phase nématique (grise)..... 96
  - Figure 27 : Microcellule observée au MOP entre polariseurs croisés. La solution injectée est une solution de gélatine à 0,2 mg/mL dans 0,3 mM d'acide chlorhydrique. En A, on distingue, près de l'interface eau/air, une phase nématique présentant une striation périodique à plusieurs échelles (A et B). En B, observation de la phase nématique à un plus fort grossissement. .... 97
  - Figure 28 : Microcellule observée au MOP entre polariseurs croisés. La solution injectée est une solution de gélatine à 0,2 mg/mL dans 0,15 mM d'acide chlorhydrique et 2,5 mM d'acide acétique. A l'interface eau/air, on distingue une phase gélifiée (orange) et une phase nématique (grise). ... 98
  - Figure 29 : Etude de mésophase de gélatine après dénaturation thermique des segments de triples hélices. La microcellule est observée au MOP entre polariseurs croisés. La solution injectée est une solution de gélatine à 0,2 mg/mL dans 0,3 mM d'acide chlorhydrique. La microcellule est observée après deux semaines d'injection continue (A) avant d'être dénaturée thermiquement sur une plaque chauffante (10 minutes à 40°C). Suite au traitement thermique, la solution concentrée de gélatine ne présente plus de biréfringence (B). Le retour de la biréfringence est ensuite suivi pendant deux heures (C, D, E, F). Après deux heures, la mésophase présente une structure nématique similaire à celle observée avant la dénaturation. Sur chaque photo, l'interface eau/air est symbolisée par une ligne en pointillé rouge.....99

- **Figure 30** : Formation des mésophases de gélatine au sein d'une microcellule. Une solution acide et diluée de gélatine (0,2 mg/mL) est injectée dans la microcellule. Au niveau de l'injection, la gélatine n'est pas associée en triple hélice et se présente sous la forme d'une pelote statistique (cadran A). En s'éloignant de l'injection, la concentration en gélatine augmente graduellement, favorisant ainsi la formation de triple hélices (cadran B) puis de particules de gélatine (cadran C) et enfin de mésophase nématique de particules (cadran D). A plus haute concentration, les particules s'associent entre elles pour former un réseau infini : le gel de gélatine.....101
- **Figure 31** : Effet de l'ajout de gélatine sur une phase cristalline liquide de collagène. Après 4 jours d'injection, des microcellules contenant des phases denses collagène/gélatine à divers ratio (de 0 à 25% en gélatine) ont été observé au MOP entre polariseurs croisés (partie haute) et en P-SHG (partie basse). La striation caractéristique du contre-plaqué est observée en MOP et en P-SHG, à l'interface eau/air, jusqu'à un ratio de 20% en gélatine. Au delà, on observe toujours une phase biréfringente à l'interface eau/air mais les images en P-SHG indiquent une perte de la structure en contre-plaqué. Pour chaque ratio, six microcellules ont été réalisées. Sur les images de MOP, les barres d'échelles, en blanc, correspondent à 50 microns. Sur les images de P-SHG, les barres d'échelles, en noir, correspondent à 5,5 microns. ....103
- **Tableau 2** : Liste des mélanges collagène/gélatine observés en microcellules.....10
- **Figure 32** : Mélanges g25% (A) et g50% (B) observés au MOP et en P-SHG. A l'interface eau/air, les deux mélanges présentent une forte biréfringence synonyme d'une phase organisée (A1 et B1). Observée en P-SHG, le mélange g25% est constitué de domaines nématiques dont le directeur varie de manière aléatoire d'un domaine à un autre (A2). Pour le mélange g50%, on observe deux types de structures en P-SHG. Une première structure composée de grands domaines nématiques entrelacés (B3). La seconde structure est très localement organisée : elle est constituée d'une multitude de petits domaines nématiques (B2). Sur les images de P-SHG, on observe l'angle des triples hélices dans le plan de l'image. De plus, les barres d'échelle, en noir, correspondent à 10 microns.....104
- **Figure 33** : Mélanges g75% (à gauche), g85% (au milieu) et g95% (à droite) observés en P-SHG. Sur les images ci-dessus, on observe l'intensité SHG moyenne (polarisation circulaire). Dans les trois cas, on distingue des globules produisant un intense signal SHG au sein d'une matrice « noire ». Les barres d'échelle, en blanc, correspondent à 10 microns..... 106
- **Figure 34** : Utilisation de gélatine marquée pour démontrer la ségrégation de phase collagène/gélatine. La gélatine a été marquée avec de la fluorescéine pour émettre un signal plus intense que le collagène. Un mélange collagène/gélatine fluo (15%/85%) a ensuite été injecté dans une microcellule et observé après 4 jours en P-SHG et 2-PEF. Au milieu, en P-SHG, on observe des globules émettant un signal SHG intense inclus dans une matrice « noire ». A droite, en 2-PEF, le signal de fluorescence n'est plus homogène. On distingue des taches rondes moins intenses au

- sein d'un fond fortement fluorescent. Ces tâches coïncident avec les globules observés en P-SHG (image de droite). Les barres d'échelle, en blanc, représentent 10 microns. .... 106
- **Figure 35** : Courbe d'étalonnage  $I_{2-PEF} = f(C_{\text{Collagène}})$  pour la condition contre-plaqué. Deux séries de mesure ont été effectuées avec deux batchs de collagène différents. La courbe en rouge est une régression linéaire effectuée sur l'ensemble des mesures. Pour des concentrations inférieures à 250 mg/mL, l'intensité de fluorescence est une fonction affine de la concentration. Au dessus de 250 mg/mL, la courbe semble atteindre un plateau. .... 107
  - **Tableau 3** : Détermination de la concentration de transition isotrope/anisotrope pour la solution g0%. Les concentrations sont déterminées à partir de l'intensité de fluorescence à deux photons enregistrée en microscopie multiphoton (voir description de la méthode ci-dessus). Nous avons déterminé la concentration de transition pour 4 microcellules (A, B, C, D) en observant un nombre variable de zones pour chacune. .... 108
  - **Figure 36** : Détermination de la concentration de mise en forme. Une solution diluée de collagène, solubilisée dans 10 mM d'acide acétique et 0,3 mM d'acide chlorhydrique, a été concentrée à diverses concentrations. Les solutions concentrées ont ensuite été aspirées dans des capillaires plats afin de détecter la présence d'une biréfringence. A gauche, on observe l'absence de biréfringence pour la solution à 32 mg/mL. A droite, par contre, la solution à 35 mg/mL présente une biréfringence homogène. .... 109
  - **Figure 37** : Diagramme de phase des mélanges collagène-gélatine. Notre étude des mélanges concentrés collagène/gélatine en microcellule nous a permis de caractériser la structure des mélanges riches en collagène ( $r_{\text{gélatine}} < 25\%$ ) ainsi que des mélanges riches en gélatine ( $r_{\text{gélatine}} > 75\%$ ). L'organisation des mélanges intermédiaire n'est cependant pas encore bien comprise ( $25\% > r_{\text{gélatine}} > 75\%$ ). .... 110

### Partie B - Chapitre 3 :

- **Figure 1** : Fibrilles de collagène de type I observées au cryo-TEM. Sur chaque fibrille, on distingue une striation périodique, la période D de 67 nm (voir zoom). .... 118
- **Figure 2** : Organisation axiale des fibrilles de collagène selon le modèle de Petruska et al. Les molécules de collagène, alignées le long de l'axe de la fibrille, sont périodiquement décalées d'une distance  $\delta$  multiple de 67 nm. La présence d'un « gap », entre deux molécules de collagène consécutives, est l'origine de régions riche (overlap) et pauvre (gap) en électrons. C'est l'alternance de ces régions que l'on observe en microscopie électronique ou en diffraction aux rayons X (d'après [4]). .... 119
- **Figure 3** : La molécule de collagène est considérée comme étant constituée de cinq segments de longueur D (67 nm). Le cinquième segment est par conséquent plus court. Les microfibrilles, une sous structure de la fibrille composée de cinq molécule de collagène, sont représentés en orange. Pour décrire l'organisation transverse des fibrilles

- de collagène, Hulmes et al. ont proposé un modèle comprenant des régions cristallines séparées par des zones amorphes. La présence de zones désorganisées permet de concilier une structure cristalline avec la forme cylindrique de la fibrille. Dans l'encart à droite, le tropocollagène est disposé au sein d'un réseau quasi-hexagonal. (d'après [8]).....120
- **Figure 4 :** Structure « Double twist » proposée par Bouligand et al. pour décrire l'organisation transversale des fibrilles. Cette structure est également employée pour décrire un type particulier de mésophases : les phases bleues (d'après [9]).....120
  - **Figure 5 :** Schéma d'un tube de centrifugation-filtration. Le tube est composé de deux compartiments séparés par une membrane filtrante qui permet la rétention et la concentration des objets d'intérêt. Les deux compartiments peuvent être séparés ce qui permet une concentration de l'échantillon sur plusieurs décades (figure de F. Wendel). ..... 122
  - **Tableau 1 :** Liste des matrices réalisées et étudiées par DSC, IRM et TEM. Les cases vertes correspondent aux échantillons qui ont pu être analysés/observés par la technique indiquée..... 123
  - **Figure 6 :** Mélanges concentrés collagène/gélatine préparés pour les expériences d'IRM. Le diamètre externe du tube est de 10 mm. Les solutions s25% (tube de gauche) et s50% (tube de droite) sont turbides et ont un aspect hétérogène (« volutes »). Photographie originale et après optimisation de l'histogramme d'intensité permettant de faire ressortir les hétérogénéités au sein de solutions (resp. gauche et droite)..... 124
  - **Figure 7 :** Thermogrammes des matrices collagène/gélatine enregistrés par DSC entre 5°C et 70°C. Au cours de la montée en température, on observe successivement la dénaturation des triples hélices de gélatine (pics larges centrés sur 35°C) puis de collagène fibrillé (pics étroits et intenses centrés sur 50°C). Chaque thermogramme correspond à la moyenne sur les thermogrammes de 4 échantillons..... 125
  - **Figure 8 :** Thermogrammes des matrices collagène/gélatine enregistrés par DSC entre 5°C et 70°C. Agrandissement sur les pics de dénaturation du collagène fibrillé pour les échantillons m75%, m85% et m95%. ..... 126
  - **Figure 9 :** Analyse de la dénaturation des matrices collagène/gélatine par DSC. En haut, température (A) et enthalpie massique (B) de la transition pelote/hélice du pic de la gélatine en fonction du ratio de gélatine. En bas, température (C) et enthalpie massique (D) de la transition pelote/hélice du pic de collagène fibrillé en fonction du ratio de gélatine. Chaque valeur correspond à la moyenne sur 4 échantillons (barre d'erreur = écart type). ..... 127
  - **Figure 10 :** Observation au MOP (avec une lame lambda) de coupes semi-fines d'une matrice m0%. La coupe a été teinte avec de la toluidine pour marquer le collagène. L'ensemble de la coupe présente une biréfringence non-homogène rappelant plutôt une structure en bande [20]. La lame lambda permet d'observer les changements d'orientations moléculaires et révèle ici une alternance de grands domaines dont le directeur varie continument. .... 128
  - **Figure 11 :** Observation au MET de coupes ultrafines d'une matrice m0%. La matrice est constituée d'un réseau dense (A) de fines fibrilles alignées localement (B)..... 129

- **Figure 12** : Matrice m0% imagée en IRM à l'aide de la séquence RARE. Pour éviter son dessèchement, la matrice est recouverte d'eau déionisé. A une échelle macroscopique, le matériau n'est pas homogène. Cependant, l'origine de ce contraste observé n'est pas encore bien comprise dans le cas de cette matrice. Le tube utilisé a un diamètre interne de 8,3 mm et l'échelle de couleur a été optimisé pour obtenir le meilleur contraste... 129
- **Figure 13** : Observation au MET de coupes ultrafines d'une matrice m25%. Sur la plan large (A), on observe que la matrice est composée de deux phases continues : une phase riche en gélatine (gris clair) et une phase riche en collagène (gris foncé). La phase riche en collagène est constituée de fines fibrilles (B, C, D). Ces fibrilles sont alignées au sein de microdomaines structurés (C). Certains de ces domaines présentent la striation caractéristique du collagène (D). Les doubles flèches ajoutées sur la figure C représentent la direction des fibrilles au sein du domaine. .... 130
- **Figure 14** : Observation au MET de coupes ultrafines d'une matrice m25%. A fort grossissement, dans la phase riche en collagène, on distingue une matrice de gélatine plus claire autour des fibrilles de collagène. .... 131
- **Figure 15** : Observation en SHG de coupes semi-fines d'une matrice m25%. En rouge, signal de fluorescence à deux photons (2-PEF) et en vert, signal SHG. Le fond uniforme en 2-PEF indique une répartition homogène des protéines dans la matrice. En SHG, on distingue des taches de quelques microns de diamètre qui correspondent aux microdomaines riches en collagène observés au MET. La répartition de ces microdomaines n'est cependant pas homogène. La barre d'échelle, en blanc, correspond à 75 microns..... 131
- **Figure 16** : Matrice m25% imagée en IRM à l'aide de la séquence RARE. Pour éviter son dessèchement, la matrice est recouverte d'eau déionisé. A une échelle macroscopique, le matériau apparaît hétérogène. Le contraste observé est probablement dû à la répartition non-uniforme des microdomaines de collagène. Le tube utilisé a un diamètre interne de 8,3 mm et l'échelle de couleur a été optimisé pour obtenir le meilleur contraste. .... 132
- **Figure 17** : Observation au MOP (sans polariseurs) de coupes semi-fines d'une matrice m50%. La coupe a été teinte avec de la toluidine pour marquer le collagène et la gélatine. Le matériau présente deux phases : une phase riche en collagène (violet foncé) et une phase riche en gélatine (violet clair). .... 133
- **Figure 18** : Observation au MET de coupes ultrafines de matrice m50. Au sein de la phase riche en collagène, on observe deux types de structures. A gauche, la phase riche en collagène prend la forme de microdomaines denses constitués de fines fibrilles alignées. A droite, la phase riche en collagène est constituée de fines fibrilles de collagène plus ou moins compactées dans un fondu grisé que nous associons à la gélatine ..... 133
- **Figure 19** : Observation au MET de coupes ultrafines de matrice m50%. Comme pour m25%, on distingue une phase riche en gélatine (RG, gris clair) et une phase riche en collagène (RC, gris foncé). La phase riche en collagène est constituée de fibrilles (f) d'environ 20 nm de diamètre

compacté dans un fondu ou la présence de gélatine n'est pas exclue. La phase riche en gélatine RG est constituée d'un fondu vaguement texturé au sein duquel on trouve des fibrilles classiques (F) de collagène de d'environ 200 nm de diamètre. La photo du milieu montre que les domaines riches en collagène présentent des orientations spécifiques. En effet nous observons un changement d'orientation des fibrilles qui sont, dans un même domaine coupées soit longitudinalement  $RC_L$  soit transversalement  $RC_T$ . Ceci indique que la notion de twist est préservée au sein de ces domaines.....134

- **Figure 20 :** Observation en SHG de coupes semi-fines transverses d'une matrice m50%. En rouge, signal de fluorescence à deux photons (2-PEF) et en vert, signal SHG. Le fond uniforme en 2-PEF indique une répartition homogène des protéines dans la matrice. En SHG, on distingue des taches de quelques microns de diamètre qui correspondent aux domaines riches en collagène observés au MET. La répartition de ces microdomaines n'est cependant pas homogène. Les domaines riches en collagène sont beaucoup plus marqués que dans la condition m25%. La barre d'échelle, en blanc, correspond à 75 microns..... 135
- **Figure 21 :** Matrice m50% imagée en IRM à l'aide de la séquence RARE. Pour éviter son dessèchement, la matrice est recouverte d'eau déionisée. A une échelle macroscopique, le matériau apparaît hétérogène. Le contraste observé est probablement dû à la répartition non-uniforme des microdomaines de collagène. On note d'ailleurs que le contraste est plus marqué pour m50% que pour m25%. Le tube utilisé a un diamètre interne de 8,3 mm et l'échelle de couleur a été optimisée pour obtenir le meilleur contraste. .... 135
- **Figure 22 :** Observation au MET de coupes ultrafines de matrice m75%. A la différence m25% et m50%, la matrice m75% est composée d'une phase riche en collagène (microdomaines gris foncé de forme allongée) dispersée au sein d'une phase riche en gélatine (A). Les microdomaines sont constitués de fines fibrilles alignées et organisées en registre de telle sorte que la striation caractéristique du collagène en couvre la totalité. (B)..... 136
- **Figure 23 :** Observation en SHG de coupes semi-fines d'une matrice m75%. En rouge, signal de fluorescence à deux photons (2-PEF) et en vert, signal SHG. Le fond uniforme en 2-PEF indique une répartition homogène des protéines dans la matrice. En SHG, on distingue des microdomaines de forme allongée de quelques microns de long qui correspondent aux domaines riches en collagène observés au MET. Ces microdomaines sont alignés sur plusieurs centaines de microns. On observe également que la répartition de microdomaines n'est pas homogène. Leur quantité semble être plus importante à gauche qu'à droite de l'image, bien que la différence pourrait être due à une orientation perpendiculaire. La barre d'échelle, en blanc, correspond à 100 microns. .... 137
- **Figure 24 :** Observation au MOP (sans polariseurs) de coupes semi-fines d'une matrice m75%. La coupe a été teinte avec de la toluidine pour marquer le collagène et la gélatine. Sur cette coupe, on observe la présence de domaines constitués de microdomaines de collagène alignés

- selon un directeur (voir figure 22). Ce directeur varie brutalement d'un domaine à un autre, rappelant une structure cristalline-liquide en contre-plaqué. Sur la coupe, on note également la présence de zones sans microdomaines..... 138
- **Figure 25 :** Matrice m75% imagée en IRM à l'aide de la séquence RARE. Pour éviter son dessèchement, la matrice est recouverte d'eau déionisé. A une échelle macroscopique, le matériau apparaît hétérogène. Le contraste observé est probablement dû à la répartition non-uniforme des microdomaines de collagène. Le tube utilisé a un diamètre interne de 8,3 mm et l'échelle de couleur a été optimisé pour obtenir le meilleur contraste. .... 138
  - **Figure 26 :** En A, observation au MOP (sans polariseurs) d'une coupe semi-fine d'une matrice m100%. En B, observation au MET d'une coupe ultra-fine de m100%. En B, matrice m100% imagée en IRM à l'aide de la séquence RARE. Nous n'avons pas recouvert la matrice d'eau ici car la gélatine seule absorbe l'eau et gonfle. Le tube utilisé a un diamètre interne de 8,3 mm et l'échelle de couleur a été optimisé pour obtenir le meilleur contraste. Sur les 3 images (à trois échelles différentes), la matrice présente un aspect homogène et plutôt lisse. Au MET, on ne distingue pas de structuration de la gélatine..... 139
  - **Figure 27 :** Tentative d'illustration de l'organisation des matrices dense collagène/gélatine m25% et m50%. eC : A gauche, zone enrichie en collagène présentant des domaines riche en collagène RC et des domaines riches en gélatine RG. eG : A droite, zone enrichie en gélatine présentant des domaines riche en collagène RC et de domaines riche en gélatine RG. Notons la présence de fibrilles de collagène classiques au sein les domaines riches en gélatine..... 140
  - **Figure 28 :** Courbe  $T_{\text{dénaturation}}(\text{collagène}) = f(r_{\text{gélatine}})$ . La forme de cette courbe est directement liée à la structure du mélange biphasique collagène/gélatine (voir explication ci-dessus). La courbe en bleu a été tracée pour guider l'œil..... 142
  - **Figure 29 :** Observation au MET de coupes ultrafines d'une matrice collagène/gélatine comportant 5% de gélatine ( $C_{\text{protéines}} = 90 \text{ mg/mL}$ ). Au sein d'une phase en contre-plaqué de collagène fibrillé, on distingue la présence des globules de gélatine. La barre d'échelle, en rouge, correspond à 500 microns. .... 142

## Partie C - Chapitre 1 :

- **Figure 1 :** Les 3 phases de la cicatrisation cutanée : la phase inflammatoire (a), la phase de formation du nouveau tissu (b) et la phase de remodelage (c). En a, la phase inflammatoire 24h après la blessure. Cette phase débute immédiatement après l'apparition de la blessure et dure environ 48h. La plaie est alors un milieu hypoxique dans lequel s'est formé un caillot de fibrine et de plaquettes. Les neutrophiles migrent vers le lit de la plaie pour phagocyter les bactéries et ôter les tissus devitalisés. En b, la phase de formation du nouveau tissu entre 5 et 10 jours après la blessure. Une croûte s'est formée à la surface de la blessure et de nouveaux vaisseaux sanguins ont bourgeonné dans le tissu de granulation. On observe

également la migration de cellules épithéliales sous la croûte. En c, la phase de remodelage entre 1 mois et 1 an après la survenue de la blessure. Les fibroblastes du tissu de granulation ont progressivement remplacé la fibrine par une matrice désorganisée de collagène. Une partie de ces fibroblastes s'est différencié en myofibroblastes et a induit la contraction du tissu cicatriciel en surface. On note un renflement de l'épithélium au niveau de la cicatrice [6].....156

## Partie C - Chapitre 2 :

- Tableau 1 : Liste des conditions étudiées..... 165
- Figure 1 : Préparation de gels de collagène conjugués rifamycine par le protocole FeC. A droite, une solution FeC 1 a été mise pendant 30 minutes sous vapeur d'ammoniac. La solution FeC 1 a initialement une couleur jaune (partie basse de la cuve). En présence d'ammoniac, la solution prend une couleur orangée suite à la réaction de conjugaison entre la rifamycine et le collagène (partie haute de la cuve). La formation de fibrilles de collagène rend également la solution turbide. Ce phénomène est illustré par la cuve de gauche où une solution de collagène (sans rifamycine) a été mise sous vapeur d'ammoniac pendant 30 minutes...166
- Figure 2 : Photographies d'un gel FpC 1 après lavage. Les gels ont une teinte orange soutenue et présentent un aspect turbide..... 167
- Figure 3 : Forme neutre de la rifamycine SV (d'après [2]). La solubilité de cette molécule dans l'eau est due à la présence d'une fonction phénol acide dont le  $pK_A$  vaut 2,7 [1]..... 167
- Figure 4 : Structure hypothétique des gels de collagène conjugué rifamycine en milieu neutre (à gauche) et en milieu acide (à droite).....168
- Figure 5 : Modules élastique ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) des gels FeC 1, FpC 1 et du gel témoin sans rifamycine ( $C_{\text{collagène}} = 10 \text{ mg/mL}$ ) en fonction de la fréquence de sollicitation. Les modules sont obtenus en effectuant une expérience de cisaillement (plan/plan). Les gels ont été préalablement équilibrés dans le tampon PBS..... 169
- Figure 6 : Modules élastique ( $G'$ , à gauche) et visqueux ( $G''$ , à droite) des gels FeC (1 et 3), FpC (1 et 3) et des gels témoins sans rifamycine (fréquence 1 Hz et force normale 0,04 N) après équilibration dans le tampon PBS..... 170
- Figure 7 : Modules élastique ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) des gels FeC 1, FpC 1 en fonction de la fréquence de sollicitation. Les modules sont obtenus en effectuant une expérience de cisaillement (plan/plan). Les gels ont été préalablement équilibrés une solution d'acide chlorhydrique ( $\text{pH} = 2$ ). 170
- Figure 8 : Modules élastique ( $G'$ , à gauche) et visqueux ( $G''$ , à droite) des gels FeC 1 et FpC 1 (fréquence 1 Hz et force normale 0,04 N) après équilibration dans une solution d'acide chlorhydrique ( $\text{pH} = 2$ )..... 171
- Figure 9 : Suivi du module élastique  $G'$  des gels FeC 1 (à gauche) et FpC 1 (à droite) pour chaque cycle de descente/montée en pH. Fréquence 1 Hz et force normale 0,04 N..... 172
- Figure 10 : Thermogramme des gels FpC 1 et FeC 1 et du gel témoin sans rifamycine. Les gels ont tous été équilibrés, au préalable, dans le PBS 1X. Les thermogrammes du gel témoin et de FeC 1 comportent un seul pic lié



- à la dénaturation des fibrilles de collagène. Ce pic de dénaturation est similaire pour les deux gels. Pour le gel FpC 1, par contre, on note la présence de deux pics convolués. .... 173
- **Tableau 2 :** Température et enthalpie massique de dénaturation du collagène pour les gels FeC 1, FpC 1 et le gel témoin sans rifamycine. Tous les gels ont été préalablement équilibrés dans le PBS 1X. Pour chaque condition, nous avons moyenné les températures et les enthalpies de dénaturation de 4 échantillons. Les incertitudes sur chaque valeur correspondent aux écarts types sur ces 4 échantillons. .... 173
  - **Figure 11 :** Thermogramme des gels FpC 1 et FeC 1 après équilibration dans une solution d'acide chlorhydrique (pH = 2). Les thermogrammes des deux gels comportent un seul pic, un pic similaire au pic de dénaturation des triples hélices d'une solution acide de collagène [4]. . 174
  - **Tableau 3 :** Température et enthalpie massique de dénaturation du collagène pour les gels FeC 1, FpC 1. Tous les gels ont été préalablement équilibrés dans une solution d'acide chlorhydrique (pH = 2). Pour chaque condition, nous avons moyenné les températures et les enthalpies de dénaturation de 4 échantillons. Les incertitudes sur chaque valeur correspondent aux écarts types sur ces 4 échantillons. .... 175
  - **Tableau 4 :** Résultats des antibiogrammes pour les gels conjugués rifamycine. En rouge, les gels et les solutions (gels dégradés) qui n'ont pas démontré de propriétés antibiotiques. En vert, la solution de FeC 3 clivé pour laquelle on observe une zone d'inhibition. SR : Sans Rifamycine ; Case : Collagénase. .... 176
  - **Figure 12 :** Spectres UV-visible de solutions de rifamycine après passage sous vapeur d'ammoniac. De la courbe rouge à la courbe violette, la concentration initiale en rifamycine SV augmente régulièrement (5, 10, 25, 50, 100 et 250 µg/mL). Des courbes étalons Absorbance = f (C<sub>rifamycine</sub>) ont été réalisées pour les pics à 306 nm et 435 nm. .... 177
  - **Figure 13 :** Courbes étalons Absorbance = f (C<sub>rifamycine</sub>) réalisées à partir des valeurs d'absorbance des pics à 306 nm (carrées bleues) et 435 nm (losanges oranges). .... 178
  - **Figure 14 :** Protocole de préparation des gels conjugués rifamycine pour la RMN H<sup>1</sup> en solution. Les gels sont tous d'abord clivés en petits peptides par une collagénase. Cette enzyme est ensuite ôtée par centrifugation-filtration et le PBS est échangé contre de l'eau déionisée par dialyse. Enfin, les peptides sont lyophilisés pour pouvoir être redispersés dans D<sub>2</sub>O... 179
  - **Figure 15 :** Spectre RMN H<sup>1</sup> de la rifamycine SV et de FpC 1 clivé dans D<sub>2</sub>O. La solution de FpC 1 a été préparée suivant le protocole décrit en figure 14. .... 180
  - **Figure 16 :** Isotherme d'adsorption de protons par le collagène en fonction du pH (d'après [9]). Q est la capacité du collagène à adsorber des protons (en mmol de protons par gramme de collagène). Quand Q est positif, le collagène capte des protons (charge nette positive) alors que pour des valeurs négatives de Q, le collagène relargue des protons (charge nette négative). .... 181

### Partie C - Chapitre 3 :

- **Tableau 1**: Liste des conditions étudiées. Les concentrations indiquées (rifamycine et collagène) sont les concentrations initiales avant fibrillation et dialyse. .... 186
- **Figure 1**: Particules témoins observées en cryo-MET. En A, on distingue des amas de fibrilles qui présentent la striation caractéristique du collagène (période D). En B et en C, à fort grossissement, on distingue les molécules mises en registre. En C, la transformée de Fourier de l'image a été ajoutée en encart. .... 186
- **Figure 2**: Particules p(FeC) observées en cryo-MET. En A, on distingue des amas de fibrilles qui présentent la striation caractéristique du collagène (période D). En B et en C, à fort grossissement, on distingue les molécules mises en registre. Sur l'image C, on note la présence de petits objets sphériques et sombres sur les fibrilles qui pourraient être des agrégats de rifamycine. En C, la transformée de Fourier de l'image a été ajoutée en encart. .... 187
- **Figure 3**: Observation en cryo-MET de l'échantillon p(FpC). La description de ces images est indiquée ci-dessous. .... 189
- **Figure 4**: Images topographiques d'une particule témoin (sans rifamycine) obtenues par AFMIR. Comme en cryo-MET, nous avons observé un mélange polydisperse de fibrilles et d'agrégats de fibrilles (A). En B, sur un champ de vue plus restreint, on distingue même la période D caractéristique du collagène. .... 190
- **Figure 5**: Spectre infrarouge de particules témoins (sans rifamycine) obtenu par FTIR. Ce spectre est semblable au spectre observé localement par AFMIR. Les particules témoins sont spectralement homogènes. On constate la présence de deux pics intenses, caractéristiques du collagène, à 1551 et à 1660  $\text{cm}^{-1}$ . .... 191
- **Figure 7**: Image topographique d'une particule p(FpC) obtenue par AFMIR. Comme en cryo-TEM, les particules sont morphologiquement très différentes. Sur cette image, on observe par exemple un feuillet de collagène. Au sein de ce feuillet, on distingue différentes structurations (voir figure 8). .... 193
- **Figure 8**: Images topographiques (A, B) et spectres IR (C, D) de particules p(FpC) obtenus par AFMIR. Ces images ont été prises sur le même feuillet de collagène. Elles illustrent les différentes structurations observées au sein de ces feuillets. En A, nous avons zoomé sur une zone fibrillaire alors qu'en B, on distingue de gros agrégats au milieu du feuillet. Sur la partie droite de la figure, ont été représenté en C et D les spectres infrarouge respectifs des fibrilles imagées en A et B. On constate que le feuillet est spectralement homogène et que le pic du collagène est déplacé vers les bas nombres d'onde. .... 194
- **Figure 9**: Thermogramme des gels FpC 1 et FeC 1 et du gel témoin sans rifamycine. Les gels ont tous été équilibrés, au préalable, dans le PBS 1X. Les thermogrammes du gel témoin et de FeC 1 comportent un seul pic lié à la dénaturation des fibrilles de collagène. Ce pic de dénaturation est similaire pour les deux gels. Pour le gel FpC 1, par contre, on note la présence de deux pics convolués. .... 196

## **LISTE DES ABBREVIATIONS**

## Liste des abréviations.

- 2-PEF : Fluorescence à deux photons.
- AFMIR : Microscope à force atomique couplé à un spectromètre IR.
- $B_0$  : Champ magnétique statique utilisée en IRM pour induire l'effet Zeeman.
- $B_1$  : Champ magnétique tournant appliqué en même temps que  $B_0$  afin d'induire le phénomène de RMN.
- Case : Collagénase.
- $\text{CH}_3\text{COOH}$  : Acide acétique.
- DSC : Calorimétrie différentielle à balayage.
- $E$  : Champ électrique.
- **FeC** : Fibrillation et conjugaison, le second protocole pour conjuguer la rifamycine sur le collagène.
- **FpC** : Fibrillation puis Conjugaison, un des deux protocoles pour conjuguer la rifamycine sur le collagène.
- $G'$  : Module élastique.
- $G''$  : Module visqueux.
- g : Gramme.
- Gly : Glycine.
- HCl : Acide chlorhydrique.
- IR : Infrarouge.
- IRM : Imagerie par Résonance Magnétique.
- L : Litre.
- $M$  : Vecteur d'aimantation macroscopique.
- $M_z$  : Composante longitudinale du vecteur d'aimantation macroscopique.
- $M_{xy}$  : Composante transversale du vecteur d'aimantation macroscopique.
- MET : Microscopie Electronique en Transmission.
- MOP : Microscopie à Lumière Polarisée.
- p(**FeC**) : Particules préparées par la méthode **FeC**.
- p(**FpC**) : Particules préparées par la méthode **FpC**.
- Pa : Pascal.
- PBS : Tampon phosphate (pH = 7,4).
- PPII : Polyproline II.
- P-SHG : Microscopie SHG résolue en polarisation.
- RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.
- s : seconde.
- SDS : Sodium Dodecyl Sulfate.
- SHG : Génération de Seconde Harmonique.
- SR : Sans rifamycine.
- T : Température.
- $T_1$  : Temps de relaxation longitudinale.
- $T_2$  : Temps de relaxation transversale.
- W : Watt.
- $\omega$  : Fréquence.

# **LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES**

## Liste des communications scientifiques effectuées au cours de la thèse.

### Publications

- TEULON C., TIDU A., **PORTIER F.**, MOSSER G., SCHANNE-KLEIN M.C. Probing the structure of collagen liquid crystal with polarization-resolved SHG microscopy. *Optics Express*, 2016, vol 24, issue 14, p. 16084-16098. DOI : 10.1364/OE.24.016084
- LATOUR G., ROBINET L., DAZZI A., **PORTIER F.**, DENISSET-BESSEAU A., SCHANNE-KLEIN M.C. Correlative nonlinear optical microscopy and infrared nanoscopy reveals collagen degradation in altered parchments. *Scientific Reports*, 2016, vol 6, article n° 26344. DOI : 10.1038/srep26344

### Posters

- **F. Portier**, C. Teulon, A. Tidu, M.C. Schanne-Klein, G. Mosser, “Impact of gelatin addition on the structure of dense phases of collagen type I”, 10<sup>th</sup> World Biomaterials Congress (WBC), Mai 2016, Montreal, Canada.
- **F. Portier**, C. Teulon, A. Tidu, B. Haye, M.C. Schanne-Klein, G. Mosser, “Effet de la gélatine dans les phases cristal-liquides de collagène de type I”, **Colloque sur les systèmes anisotropes auto-organisés (CFCL)**, 17<sup>ème</sup> édition, Septembre 2015, Autrans, France.