

Développement d'un pansement intelligent par détection de metalloprotéases

Pauline Choma

► To cite this version:

Pauline Choma. Développement d'un pansement intelligent par détection de metalloprotéases. Ingénierie de l'environnement. IMT - MINES ALES - IMT - Mines Alès Ecole Mines - Télécom, 2019. Français. NNT : 2019EMAL0010 . tel-02893629

HAL Id: tel-02893629 https://theses.hal.science/tel-02893629

Submitted on 8 Jul 2020

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DES MINES D'ALÈS (IMT MINES ALÈS)

En Sciences de l'eau

École doctorale GAIA- Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Unités de recherche Laboratoire de Génie de l'Environnement Industriel (IMT Mines Alès) et Institut d'Électronique et des Systèmes (UM Montpellier)

Développement d'un pansement intelligent par détection de métalloprotéases

Présentée par Pauline CHOMA Le 20 Novembre 2019

Sous la direction de Ingrid Bazin et de Brice Sorli

Devant le jury composé de

Loïc BLUM, Professeur, ICBMS Lyon
David PIGNOL, Professeur, BIAM CEA Cadarache
Ingrid BAZIN, Maître de conférences, IMT Mines Alès
Brice SORLI, Maître de conférences, IES Montpellier
Martine CERUTTI, Directrice de recherche, CNRS Saint-Christol Lès Alès
Emmanuel CORNILLOT, Professeur, IRCM Montpellier
Ali BOUKABACHE, Maître de conférences, LAAS Toulouse
Jean-François CHATEAUX, Maître de conférences, INL Lyon
Luc TEOT, Professeur, Hôpital Universitaire Montpellier
Gilles SUBRA, Professeur, UM Montpellier

Rapporteur Rapporteur Directrice de thèse Co-directeur de thèse Encadrante de thèse Président du jury Examinateur Examinateur Invité





Remerciements

Je tiens avant tout à remercier mes directeurs de thèse pour l'opportunité qui m'a été donnée de mener ces travaux pendant trois ans. Je remercie Brice Sorli pour sa patience, sa bonne humeur, son écoute ainsi que pour m'avoir fait découvrir le monde de l'électronique qui m'était totalement inconnu. Je tiens également à remercier Martine Cerutti, pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire de Saint-Christol Lès Alès, sa rigueur scientifique, son expertise et son aide précieuse lors de l'élaboration de ce manuscrit. Je remercie enfin Marc Vinches, pour son aide pendant la seconde moitié de ma thèse, pour sa participation aux réunions de suivi de mes travaux ainsi que pour l'élaboration de mon jury de soutenance.

Je remercie les différents membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux. Je remercie également le Professeur Luc Teot d'avoir assisté à ma soutenance de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes avec qui j'ai pu échanger pendant ces trois ans. Je remercie Jean-Claude Roux, responsable de la microscopie électronique au sein du centre des matériaux de l'IMT Mines Alès, pour sa patience avec des supports d'alumine pas toujours coopératifs. Je remercie également Christine, Aurélie, Aliénor et Valentin au sein du laboratoire LGEI de l'IMT pour leur gentillesse. Ensuite, je tiens à remercier toute l'équipe Baculovirus et Thérapie du CNRS de Saint-Christol Lès Alès pour leur accueil et leur bonne humeur. Une pensée va également vers les personnes de l'IES qui m'ont aidée lors de mes passages éclairs, notamment Afaf et Amandine. Enfin, je remercie également Oualid Sbai de m'avoir appris toutes les techniques de biologie nécessaires pour mener à bien ce projet ainsi que pour sa bonne humeur et sa gentillesse.

Enfin, tout cela n'aurait pas été possible sans mon entourage proche. Pour cela, je remercie mes parents, André et Marie-Laure, de leur soutien sans faille même dans les moments les plus compliqués. Je remercie mon frère, Matthieu, et ma belle-sœur, Bertille, pour leur présence du départ de ce projet jusqu'à la soutenance.

Et je remercie ma moitié, Clément, d'avoir été là dans les bons moments comme dans les mauvais. Faire nos thèses en même temps n'aura pas été facile, et je n'aurais jamais pu aller jusqu'au bout si tu n'avais pas été là.

Je terminerai en remerciant toutes les personnes dont les noms ne figurent pas dans ce manuscrit mais qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Table des matières

REMERCIEMENTS	•••••
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1- PLAIES ET CICATRISATION, PANSEMENT INTELLIGENT : CONTEXTE, ETAT DE L'ART	4
PARTIE I - LA PEAU : PHYSIOLOGIE, PLAIES ET CICATRISATION	5
1.1/ LA PEAU : STRUCTURE ET FONCTION	5
1.2/ LES PLAIES AIGUËS : RENOUVELLEMENT CUTANE PHYSIOLOGIQUE	7
Physiologie et cicatrisation des plaies aiguës	7
1.2.1- L'hémostase	
1.2.2- L'inflammation	
1.2.3- La prolifération / granulation	9
1.2.4- Le remodelage / maturation	9
1.3/Les plaies chroniques : renouvellement cutane compromis	10
1.3.1- Le diabète	
1.3.2- Classification des plaies chroniques	
1.3.2.1- Ulcères veineux/artériels	
1.3.2.2- Les escarres	
1.3.2.3- Les plaies du pied diabétique	
1.3.3- Physiopathologie des plaies chroniques	
PARTIE II - LES METALLOPROTEASES MATRICIELLES	20
2.1/DESCRIPTION DE LA FAMILLE DES MMPS	20
2.2/Structure des MMPs	22
2.3/Fonctions generales des MMPs	24
2.4/Activation et regulation	24
2.5/INHIBITION: LES TIMPS (TISSUE INHIBITORS OF MMPS)	
2.6/Implication des MMPs dans les plaies chroniolies	26
2.6.1-Les MMPs et la cicatrisation	
2.6.2- Les MMPs dans les plaies chroniques	
PARTIE III - LE PANSEMENT : DISPOSITIF MEDICAL POUR LE TRAITEMENT ET LA CICATRISATION D	DES PLAIES 29
3.1/NATURE, CLASSIFICATION ET APPLICATION DES PANSEMENTS	
3 2/Disposities passies dermettant i e maintien de la plaie	30
2.2.1 Dancoments higher tifs	
3.3.1 1- Alginates	
3 3 1 2- Collagène	
3.3.1.3- Flastine	
3.3.1.4- Acide hyaluronique	
3.3.1.5- Chitosane	
3.3.2- Pansements en voie de développement : pansements intelligents	
3.3.2.1- Suivi des plaies chroniques : facteurs physiques	
a) pH	

b) Température	40
c) Humidité	41
3.3.2.2- Suivi des plaies chroniques : facteurs biochimiques	42
a) Oxygénation des plaies	42
b) Flore bactérienne	43
c) Acide urique	43
d) TNFα	44
e) Metalloprotéases matricielles	44
OBJECTIF DE MON PROJET DE THESE	
CHAPITRE 2-MATERIELS ET METHODES	50
PARTIE I – PRODUCTION ET CARACTERISATION DE LA MMP9 HUMAINE RECOMBINANTE	51
1.1/Construction d'un baculovirus recombinant	51
1.2/PRODUCTION ET PURIFICATION DE LA MMP9 RECOMBINANTE	52
1.2.1- Purification sur colonne de ConA	52
1.2.2- Purification sur colonne NiNTA (HisTrap, GE HealthCare, 175255-01)	53
1.3/Caracterisation de la MMP9 recombinante	53
1.3.1- Quantification par technique ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	53
1.3.2- Analyse de l'activité enzymatique par zymographie sur gel	55
a) Préparation des échantillons	55
b) Migration sur gel de polyacrylamide	55
c) Analyse et interprétation des résultats	56
1.3.3- Détection et identification par Western blot	57
a) Transfert sur membrane de nitrocellulose	57
b) Révélation	58
PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB	60
PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB	
PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB 2.1/SELECTION DE L'ERB	
PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB 2.1/SELECTION DE L'ERB 2.1.1- Premier tour de « panning »	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB 2.1/SELECTION DE L'ERB	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB. 2.1/SELECTION DE L'ERB 2.1.1- Premier tour de « panning » a) Préparation du premier tour. b) « Screening » des phages. 2.1.2- Deuxième tour de « panning » 	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB. 2.1/SELECTION DE L'ERB 2.1.1- Premier tour de « panning » a) Préparation du premier tour. b) « Screening » des phages. 2.1.2- Deuxième tour de « panning » a) Amplification des phages sélectionnés au premier tour. 	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB 2.1/SELECTION DE L'ERB	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB. 2.1/SELECTION DE L'ERB 2.1.1- Premier tour de « panning » a) Préparation du premier tour. b) « Screening » des phages. 2.1.2- Deuxième tour de « panning » a) Amplification des phages sélectionnés au premier tour. b) Concentration 2.2/ANALYSE PAR ELISA DES PHAGES SELECTIONNES POUR LA CIBLE MMP9 	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB. 2.1/SELECTION DE L'ERB 2.1.1- Premier tour de « panning » a) Préparation du premier tour. b) « Screening » des phages. 2.1.2- Deuxième tour de « panning » a) Amplification des phages sélectionnés au premier tour b) Concentration 2.2/ANALYSE PAR ELISA DES PHAGES SELECTIONNES POUR LA CIBLE MMP9 2.3/EXTRACTION DE L'ADN DES CLONES SELECTIONNES VIA ELISA POUR SEQUENCACE 	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB. 2.1/SELECTION DE L'ERB 2.1.1- Premier tour de « panning » a) Préparation du premier tour. b) « Screening » des phages. 2.1.2- Deuxième tour de « panning » a) Amplification des phages sélectionnés au premier tour. b) Concentration 2.2/ANALYSE PAR ELISA DES PHAGES SELECTIONNES POUR LA CIBLE MMP9. 2.3/EXTRACTION DE L'ADN DES CLONES SELECTIONNES VIA ELISA POUR SEQUENÇAGE 2.4/DRODUCTION DES ERB INSULS DU DUACE DISPLAY 	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB. 2.1/SELECTION DE L'ERB 2.1.1- Premier tour de « panning » a) Préparation du premier tour. b) « Screening » des phages. 2.1.2- Deuxième tour de « panning » a) Amplification des phages sélectionnés au premier tour. b) Concentration 2.2/ANALYSE PAR ELISA DES PHAGES SELECTIONNES POUR LA CIBLE MMP9 2.3/EXTRACTION DE L'ADN DES CLONES SELECTIONNES VIA ELISA POUR SEQUENÇAGE 2.4.1 Amplification du phagemide 	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB. 2.1/SELECTION DE L'ERB 2.1.1- Premier tour de « panning » a) Préparation du premier tour. b) « Screening » des phages. 2.1.2- Deuxième tour de « panning » a) Amplification des phages sélectionnés au premier tour b) Concentration 2.2/ANALYSE PAR ELISA DES PHAGES SELECTIONNES POUR LA CIBLE MMP9 2.3/EXTRACTION DE L'ADN DES CLONES SELECTIONNES VIA ELISA POUR SEQUENÇAGE 2.4/PRODUCTION DES ERB ISSUS DU PHAGE DISPLAY 2.4.1- Amplification du phagemide 	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB. 2.1/SELECTION DE L'ERB 2.1.1- Premier tour de « panning » a) Préparation du premier tour. b) « Screening » des phages. 2.1.2- Deuxième tour de « panning » a) Amplification des phages sélectionnés au premier tour b) Concentration 2.2/ANALYSE PAR ELISA DES PHAGES SELECTIONNES POUR LA CIBLE MMP9 2.3/EXTRACTION DE L'ADN DES CLONES SELECTIONNES VIA ELISA POUR SEQUENÇAGE 2.4/PRODUCTION DES ERB ISSUS DU PHAGE DISPLAY 2.4.1- Amplification du phagemide 2.4.2- Transfert du VHH dans le plasmide pET-22b. 2.4.3 Broduction ot purification dos VHH 	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB. 2.1/SELECTION DE L'ERB 2.1.1- Premier tour de « panning » a) Préparation du premier tour. b) « Screening » des phages. 2.1.2- Deuxième tour de « panning » a) Amplification des phages sélectionnés au premier tour. b) Concentration 2.2/ANALYSE PAR ELISA DES PHAGES SELECTIONNES POUR LA CIBLE MMP9. 2.3/EXTRACTION DE L'ADN DES CLONES SELECTIONNES VIA ELISA POUR SEQUENÇAGE 2.4/PRODUCTION DES ERB ISSUS DU PHAGE DISPLAY 2.4.1- Amplification du phagemide 2.4.2- Transfert du VHH dans le plasmide pET-22b. 2.4.3- Production et purification des VHH. 2.5/PREPARATION DE BACTERIES COMPETENTES, METHODE INOUE. 	60 61 61 61 61 62 62 62 62 63 63 65 66 66 66 66 66 68 69
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB. 2.1/SELECTION DE L'ERB 2.1.1- Premier tour de « panning » a) Préparation du premier tour. b) « Screening » des phages. 2.1.2- Deuxième tour de « panning » a) Amplification des phages sélectionnés au premier tour. b) Concentration 2.2/ANALYSE PAR ELISA DES PHAGES SELECTIONNES POUR LA CIBLE MMP9. 2.3/EXTRACTION DE L'ADN DES CLONES SELECTIONNES VIA ELISA POUR SEQUENÇAGE. 2.4/PRODUCTION DES ERB ISSUS DU PHAGE DISPLAY 2.4.1- Amplification du phagemide 2.4.2- Transfert du VHH dans le plasmide pET-22b. 2.4.3- Production et purification des VHH. 2.5/PREPARATION DE BACTERIES COMPETENTES, METHODE INOUE. PARTIE III - ÉLABORATION DES SUPPORTS D'ALUMINE POREUSE POUR FONCTIONNALISATION.	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB. 2.1/SELECTION DE L'ERB 2.1.1- Premier tour de « panning » a) Préparation du premier tour. b) « Screening » des phages. 2.1.2- Deuxième tour de « panning » a) Amplification des phages sélectionnés au premier tour b) Concentration 2.2/ANALYSE PAR ELISA DES PHAGES SELECTIONNES POUR LA CIBLE MMP9 2.3/EXTRACTION DE L'ADN DES CLONES SELECTIONNES VIA ELISA POUR SEQUENÇAGE 2.4/PRODUCTION DES ERB ISSUS DU PHAGE DISPLAY 2.4.1- Amplification du phagemide 2.4.2- Transfert du VHH dans le plasmide pET-22b 2.4.3- Production et purification des VHH 2.5/PREPARATION DE BACTERIES COMPETENTES, METHODE INOUE. PARTIE III - ÉLABORATION DES SUPPORTS D'ALUMINE POREUSE POUR FONCTIONNALISATION	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB. 2.1/SELECTION DE L'ERB 2.1.1- Premier tour de « panning » a) Préparation du premier tour. b) « Screening » des phages. 2.1.2- Deuxième tour de « panning » a) Amplification des phages sélectionnés au premier tour. b) Concentration 2.2/ANALYSE PAR ELISA DES PHAGES SELECTIONNES POUR LA CIBLE MMP9 2.3/EXTRACTION DE L'ADN DES CLONES SELECTIONNES VIA ELISA POUR SEQUENÇAGE. 2.4/PRODUCTION DES ERB ISSUS DU PHAGE DISPLAY 2.4.1- Amplification du phagemide 2.4.2- Transfert du VHH dans le plasmide pET-22b 2.4.3- Production et purification des VHH. 2.5/PREPARATION DE BACTERIES COMPETENTES, METHODE INOUE. PARTIE III - ÉLABORATION DES SUPPORTS D'ALUMINE POREUSE POUR FONCTIONNALISATION. 3.1/PREPARATION DES SUPPORTS FLEXIBLES D'AL₂O₃ PAR ANODISATION 3.1.1- Le pré-traitement 3.1.2- Le traitement 	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB. 2.1/SELECTION DE L'ERB. 2.1.1- Premier tour de « panning » a) Préparation du premier tour. b) « Screening » des phages. 2.1.2- Deuxième tour de « panning » a) Amplification des phages sélectionnés au premier tour. b) Concentration 2.2/ANALYSE PAR ELISA DES PHAGES SELECTIONNES POUR LA CIBLE MMP9 2.3/EXTRACTION DE L'ADN DES CLONES SELECTIONNES POUR LA CIBLE MMP9 2.3/EXTRACTION DE L'ADN DES CLONES SELECTIONNES VIA ELISA POUR SEQUENÇAGE 2.4/PRODUCTION DES ERB ISSUS DU PHAGE DISPLAY 2.4.1- Amplification du phagemide 2.4.2- Transfert du VHH dans le plasmide pET-22b. 2.4.3- Production et purification des VHH. 2.5/PREPARATION DE BACTERIES COMPETENTES, METHODE INOUE. PARTIE III - ÉLABORATION DES SUPPORTS D'ALUMINE POREUSE POUR FONCTIONNALISATION. 3.1/PREPARATION DES SUPPORTS PLEXIBLES D'AL₂O₃ PAR ANODISATION 3.1.2- Le traitement. 3.1.3- Le post-traitement. 3.1.4- Le dépôt d'électrodes 3.2/LA FONCTIONNALISATION DES CAPTEURS CAPACITIFS 	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB. 2.1/SELECTION DE L'ERB. 2.1.1- Premier tour de « panning » a) Préparation du premier tour. b) « Screening » des phages. 2.1.2- Deuxième tour de « panning » a) Amplification des phages sélectionnés au premier tour. b) Concentration . 2.2/ANALYSE PAR ELISA DES PHAGES SELECTIONNES POUR LA CIBLE MMP9. 2.3/EXTRACTION DE L'ADN DES CLONES SELECTIONNES VIA ELISA POUR SEQUENÇAGE. 2.4/PRODUCTION DES ERB ISSUS DU PHAGE DISPLAY . 2.4.1- Amplification du phagemide . 2.4.2- Transfert du VHH dans le plasmide pET-22b. 2.4.3- Production et purification des VHH. 2.5/PREPARATION DE BACTERIES COMPETENTES, METHODE INOUE. PARTIE III - ÉLABORATION DES SUPPORTS D'ALUMINE POREUSE POUR FONCTIONNALISATION	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB. 2.1/SELECTION DE L'ERB. 2.1.1- Premier tour de « panning » a) Préparation du premier tour. b) « Screening » des phages. 2.1.2- Deuxième tour de « panning » a) Amplification des phages sélectionnés au premier tour. b) Concentration 2.2/ANALYSE PAR ELISA DES PHAGES SELECTIONNES POUR LA CIBLE MMP9. 2.3/EXTRACTION DE L'ADN DES CLONES SELECTIONNES VIA ELISA POUR SEQUENÇAGE 2.4/PRODUCTION DES ERB ISSUS DU PHAGE DISPLAY 2.4.1- Amplification du phagemide 2.4.2- Transfert du VHH dans le plasmide pET-22b. 2.4.3- Production et purification des VHH. 2.5/PREPARATION DE BACTERIES COMPETENTES, METHODE INOUE. PARTIE III - ÉLABORATION DES SUPPORTS D'ALUMINE POREUSE POUR FONCTIONNALISATION. 3.1/PREPARATION DES SUPPORTS FLEXIBLES D'AL₂O₃ PAR ANODISATION 3.1.2- Le traitement 3.1.3- Le post-traitement 3.1.4- Le dépôt d'électrodes. 3.2/LA FONCTIONNALISATION DES CAPTEURS CAPACITIFS 3.2.1- Avec l'anticorps conventionnel a) Via adsorption 	
 PARTIE II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY POUR LA SELECTION D'UN ERB. 2.1/SELECTION DE L'ERB. 2.1.1- Premier tour de « panning » a) Préparation du premier tour. b) « Screening » des phages. 2.1.2- Deuxième tour de « panning » a) Amplification des phages sélectionnés au premier tour b) Concentration 2.2/ANALYSE PAR ELISA DES PHAGES SELECTIONNES POUR LA CIBLE MMP9. 2.3/EXTRACTION DE L'ADN DES CLONES SELECTIONNES VIA ELISA POUR SEQUENÇAGE 2.4/PRODUCTION DES ERB ISUS DU PHAGE DISPLAY 2.4.1- Amplification du phagemide 2.4.2- Transfert du VHH dans le plasmide pET-22b. 2.4.3- Production et purification des VHH. 2.5/PREPARATION DE BACTERIES COMPETENTES, METHODE INOUE. PARTIE III - ÉLABORATION DES SUPPORTS D'ALUMINE POREUSE POUR FONCTIONNALISATION	

3.3/VALIDATION DE LA FONCTIONNALISATION DES BIOCAPTEURS	76
3.3.1- Tests biologiques	76
a) Avec l'anticorps conventionnel	76
b) Avec le VHH commercial	77
3.3.2- Tests d'imagerie	78
3.4/Tests electriques	78
3.4.1- Mesures d'échantillons bruts	80
3.4.2- Mesures d'ajouts de molécule cible sur échantillons nus et fonctionnalisés : expériences de sa	uration :
sensibilité du biocapteur	81
3.4.3- Mesures d'ajouts de sérum humain dopé sur échantillons nus et fonctionnalisés : spécificité de	ı biocapteur81
CHAPITRE 3-RESULTATS : DE L'ERB AU PANSEMENT CONNECTE	82
PARTIE I : LA RECHERCHE DE L'ELEMENT DE RECONNAISSANCE BIOLOGIQUE	83
1.1/ Choix de la cible	83
1.2/ PRODUCTION ET CARACTERISATION DE LA MMP9 RECOMBINANTE	83
1.2.1- Élaboration du système de production en baculovirus	83
1.2.2- Caractérisation de la MMP9 recombinante	
1.3/ RECHERCHE DE L'ERB A PARTIR DE BANQUES COMMERCIALES	
Sélection de l'ERB par la technique du « phage display »	
1.3.1- Type d'ERB	
1.3.2- Principe du phage display	
1.3.3- Sélection à partir de banques naïves	
1.3.2.1- Tours de sélection I à III	
1.3.2.2- Recherche des clones spécifiques : Tests ELISA	
1.3.2.4- Production des clones pour tests de spécificité	
2.1/DESCRIPTION DU CAPTEUR CAPACITIF A BASE D'ALUMINE POREUSE	
2.1.2- Utilisations des supports	
2.2/Production d'un prototype a partir de l'anticorps commercial	
2.2.1- Méthodes de fixation	
2.2.1.1- Adsorption	105
2.2.1.2- Chimisorption	106
2.2.2- Validation de la fonctionnalisation des biocapteurs	107
2.2.2.1- Evaluation par ELISA	108
2.2.2.2- Analyse par microscopie électronique à balayage	111
2.2.2.3- Analyses électriques	113
PARTIE III : PREUVE DE CONCEPT : LE VHH COMMERCIAL	124
3.1/Methode de fixation et tests preliminaires	124
3.2/Validation de la fonctionnalisation des biocapteurs	126
, 3.2.1- Evaluation par ELISA	
3.2.2- Analyse par microscopie électronique à balayage	130
3.2.3- Analyses électriques	132
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.	139
REFERENCES	145
ABREVIATIONS	153
RESUME	155
ABSTRACT	155

Liste des figures

FIGURE 1: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES TROIS COUCHES FORMANT LA PEAU	5
FIGURE 2: SCHEMA EXPLICATIF : LES QUATRE PHASES DE LA CICATRISATION DES PLAIES AIGUËS	8
FIGURE 3 : STRUCTURE GENERALE DES MMPS : L'EXEMPLE DE MMP9	22
FIGURE 4 : LES DIFFERENTS DOMAINES DES MMPS	22
FIGURE 5 : DETAIL DU DOMAINE DES MMPS QUI INTERAGIT AVEC L'ATOME DE ZINC	23
FIGURE 6 : LA PHASE INFLAMMATOIRE : ACTIVITE PROTEASIQUE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE PLAIES CHRONIQUES VS PLAIE	S AIGUËS
FIGURE 7' METHODE D'UTURATION D'UN DANSEMENT INTELLIGENT	27 ۸7
	۲۴ ۸۷
FIGURE O. SCHEWA EXPERTING DE COOPLAGE NUID	
DETECTION DE MMDD DANS LES DI ALES DI LE DI DED DIADETIOLE	18
FIGURE 10: GENERATION D'UN RACH OVIDUS RECOMPLINANT : INTEGRATION DU GENE D'INTERET DAR RECOMPLINAISON HOM	
ENTRE I 'ADN VIRAL (BACMID) ET LE VECTEUR DE TRANSFERT CONTENANT LE GENE D'INTERET (ICL. GENE MMP9)	51 S1
EIGIDE 11: PLAN DE BLACHE DOUB LA QUANTIEICATION DE LA MMD9 BECOMPINANTE	
FIGURE 12: REDRESENTATION SCHEMATIONE D'UN GEL DE MIGRATION DROTEIQUE	
FIGURE 12. REPRESENTATION SCIEMATIQUE D'UN GLE DE MIGNATION PROTEIQUE.	
FIGURE 13. SCHEWA EXPLICATIF DU TRANSFERT DE PROTEINE SUR MIEWIDRAINE DE NITROCELLOLOSE.	50
FIGURE 14. LE WESTERN BLOT . DU DEPUT D'ANTICORPS À LA REVELATION.	
FIGURE 13. LA METRODE DU PRAGE DISPLAT POUR LA SELECTION D'UN LIND SPECIFIQUE À LA MINIF 7 À PARTIR D'UNE BANQU	<i>IE DE</i> 60
FIRAGES PRESENTANT A LEUR SURFACE DES VIIII OU DES PEPTIDES.	
FIGURE 10. TAUX DE DILUTION - PHAGE DISPLAT	05 6E
FIGURE 17. L ELISA . REPRESENTATION SCHEMATIQUE.	
FIGURE 10. FROCEDE D'OBTENTION D'UN BIOCAPTEUR.	
FIGURE 13. FREPARATION DU SUPPORT D'ALUMINIUM AVANT ANODISATION : MISE EN PLACE D'UN RUBAN DE CUIVRE SUR LA	71 PARTIE
EIGURE 20: L'ANODISATION	
FIGURE 20. L ANODISATION.	/1
FIGURE 21. LADSORPTION : DEPOT DE L'ELEMENT DE RECOMMAISSANCE BIOLOGIQUE (NOTE DRE) SUR LE SUPPORT D'ALUMII	1E 70
FUCLIDE 22: LA OBEATION DE LIAISON COVALENTE : EXATION DE L'ELEMENT DE RECONNAISSANCE RIOLOCIOUE (NOTE BRE) S	
TIGURE 22. LA CREATION DE LIAISON COVALENTE . TIXATION DE L'ELEMENT DE RECOMMAISSANCE BIOLOGIQUE (NOTE DRL) SU	72
FIGURE 23: FLISA SUP ALLIMINE : VEDERATION DE LA DESENCE DE MMDQ SUP LES SUDOPTS OPERES AVEC L'ANTICODOS	
TIGURE 23. LLISA SUR ALUMINE . VERIFICATION DE LA PRESENCE DE MINIF 9 SUR LES SUPPORTS GREFFES AVEC L'ANTICORTS	DEPO1
D'ANTICORPS PRIMIAIRE ET SECONDAIRE, SUN D'UNE REVELATION ET D'UNE QUANTIFICATION EN SPECTROPHOTOMETR	Δ στ Ρ
I IGURE 24. DAINE DE MESORE ELECTRIQUE : LE CAPTEUR CAPACITIF EST PLACE SUR LE DAINE COMME INDIQUE SUR LES IMMADES	70. A ET D.
E ECHANTIELON D'ALONNINE FOREOSE FONCTIONNALISE (C) EST ENSOITE TESTE VIA E ANALISEOR D'INFEDANCE (D).	
TIGURE 23. MODELISATION ELECTRIQUE DU BIOCAFTEUR CAPACITIF À BASE D'ALUMINE POREUSE FUNCTIONNALISEE. LE SCHEI	80 RN
FIGURE 26: REDESENTATION SCHEMATIONE DU SUBDOPT : EVERDENCE DE SATURATION : LE CAS DE L'ANTICORDS COMMERCI	۰۰۰۰۰، 81
FIGURE 27: MISE EN EVIDENCE DE LA DOCTEINE DECOMBINANTE MMD9 DAD WESTEDN BLOT	۹۲۵۲ ۸۷
FIGURE 28: COMPARAISON MMP9 RECOMBINANTE/MMP9 COMMERCIALE : FLISA REPRESENTATION DE LA MESURE DE D	ENISITE
ODTICLE A 415NM EN EQUICIÓN DE LA MESORE DE D	85
FIGURE 29: 72MOGRAPHIE SUR GELGELATINASE : COMPARAISON MMP9 DEFOSED DAVIS LES FORTS EN NO.	
FIGURE 20: WESTERN-BLOT - FILM RHOTOGRAPHICUE ARRES REVELATION ROUR LA MMDD RECOMPLIANTE (CALICHE) VS M	
COMMERCIALE (DROITE) DEPOTS EN ENZVME MMP9 DE SONG	و ۱۱۷۱ ۹۶
FIGURE 31' FRB POTENTIELS : ANTICORDS CONVENTIONNEL VIEW EXPERIENCES : AVANTAGES ET INCONVENIENTS	
FIGURE 32: L'ANTICORDS CONVENTIONNEL VS L'ANTICORDS DE CAMELIDE. LE VHH EST ISOLE A DARTIR DES DOMAINES VARIA	
CHAINES LOURDES DES ANTICORES DE CAMELIDE	2003 QQ
FIGURE 33' LE PHAGE DISPLAY ' SCHEMA EXPLICATE	۵۵ ۵۶
	وی
FIGURE GT, EA RECILICITE DE L'END.	

FIGURE 35: SEQUENCE EN ACIDES AMINES DU VHH : L'EXEMPLE DE VHH293	3
FIGURE 36: COUPURE ENZYMATIQUE ET INSERTION DE LA SEQUENCE ADN VHH DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION PET-22B	5
FIGURE 37: GEL SDS-PAGE A 18% EN POLYACRYLAMIDE. COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE. VISUALISATION DE LA PRODUCTION	
DE VHH	6
FIGURE 38: TEST DE SPECIFICITE VHH1, 2 ET 4 VS MMP9 (N=6). REPRESENTATION DE LA DENSITE OPTIQUE A 415 NM POUR LES	
TROIS VHH PRODUITS ET LES CONTROLES NEGATIFS SANS VHH, SANS ANTICORPS PRIMAIRE ET SANS ANTICORPS SECONDAIRE. 9	7
Figure 39: L'alumine poreuse : image en microscopie electronique a balayage. Support nu analyse au sein de l'IMT	
MINES ALES. GROSSISSEMENT X10000	D
FIGURE 40: REPRESENTATION SCHEMATIQUE : ALUMINE POREUSE	1
FIGURE 41: ÉLABORATION DU BIOCAPTEUR. EXEMPLE DE FONCTIONNALISATION D'UN ANTICORPS CONVENTIONNEL	2
FIGURE 42: METHODES DE FONCTIONNALISATION DE L'ANTICORPS COMMERCIAL.	5
FIGURE 43: FIXATION DU BRAS ESPACEUR APTES ((3-AMINOPROPYL)TRIETHOXYSILANE) SUR L'ALUMINE POREUSE	7
FIGURE 44: MECANISME REACTIONNEL : COUPLAGE AU CARBODIIMIDE (DCC/NHS) POUR LA FORMATION DE LIAISON AMIDE 107	7
FIGURE 45: ANALYSE BIOLOGIQUE : ELISA SUR ALUMINE : REPRESENTATION DE LA DENSITE OPTIQUE A 415NM PAR UNITE DE SURFACI	Ε
(MM ²) D'ALUMINE POREUSE POUR LES DIFFERENTES METHODES DE FONCTIONNALISATION (N=9)	9
Figure 46: Images en Microscopie Électronique a Balayage des differentes methodes de fonctionnalisation de	
L'ANTICORPS CONVENTIONNEL SUR ALUMINE POREUSE. GROSSISSEMENT X200000.	1
FIGURE 47: EXPERIENCES PRELIMINAIRES : COMPORTEMENT DES SUPPORTS GREFFES SUR HAUTES FREQUENCES. REPRESENTATION DE	
LA PARTIE REELLE EN FONCTION DE LA PARTIE IMAGINAIRE DES SUPPORTS NUS, ADSORBES 1/500, 1/2000 ET 1/5000 ET DU	
SUPPORT COVALENT 1/2000	4
FIGURE 48: EXPERIENCE DE SATURATION EN CONDITIONS SIMPLES : ADSORPTION VS CHIMISORPTION. REPRESENTATION DE LA	
variation de capacitance (ΔC en Farad) des differents supports fonctionnalises en fonction de la quantite	
THEORIQUE DE MMP9 DEPOSEE PAR UNITE DE SURFACE D'ALUMINE POREUSE (NG/MM ²) A UNE FREQUENCE FIXE DE 40 KHZ.	
	5
FIGURE 49: COMPARAISON SERUM HUMAIN SEUL FACE A UNE GAMME DE CONCENTRATION DE MMP9 DANS DU PBS : EXPERIENCE	
ELISA. REPRESENTATION DE LA DENSITE OPTIQUE EN FONCTION D'AJOUTS DE MMP9 DANS LA GAMME DE CONCENTRATION.	
	8
FIGURE 50: COMPARAISON MMP9 CONDITIONS SIMPLES / CONDITIONS COMPLEXES. EXPERIENCE ELISA : REPRESENTATION DE LA	
DENSITE OPTIQUE A 415 NM EN FONCTION DE L'AUGMENTATION DE LA QUANTITE DE MMP9 DEPOSEE EN NG	9
FIGURE 51: EXPERIENCE DE SATURATION : COMPARAISON ENTRE CONDITIONS SIMPLES ET COMPLEXES. REPRESENTATION DE LA	
variation de capacitance (ΔC en Farad) des differents supports (nus et chimisorbes) en fonction de la quantite	
THEORIQUE DE MMP9 DEPOSEE PAR UNITE DE SURFACE D'ALUMINE POREUSE (NG/MM ²) A UNE FREQUENCE FIXE DE 40 KHZ.	
	D
FIGURE 52: TESTS ELISA PRELIMINAIRES : VHH GFP	5
FIGURE 53: COMPARAISON DU COMPORTEMENT DE LA GFP EN CONDITIONS SIMPLES (PBS) VS EN CONDITIONS COMPLEXES (SH).	
REPRESENTATION DE LA DENSITE OPTIQUE A 415NM EN FONCTION DE LA QUANTITE DE VHH DEPOSEE DANS LES PUITS EN NG	
(N=4)	8
FIGURE 54: ELISA SUR ALUMINE : VERIFICATION DE LA FONCTIONNALISATION DE VHH SUIVANT LES DIFFERENTS PH TESTES. MESURE	
DE LA DENSITE OPTIQUE A 415NM PAR MM2 D'ALUMINE POUR LES SUPPORTS NUS ET ADSORBES AUX PH 7.5. 8.5 ET 9.2 (N=4)	١.
129	9
FIGURE 55: IMAGES MEB : GREFFAGE DE VHH A DIFFERENTS PH. GROSSISSEMENT x20000013	1
Figure 56: Experience de saturation - GFP en conditions simples. Representation de la variation de capacitance (ΛC en	I
Farad) des differents supports adsorbes en fonction de la quantite theorique de GFP deposef par linite de	
surface d'alumine poreuse (ng/mm²) a une frequence fixe de 40kHz	2
FIGURE 57: EXPERIENCE DE SATURATION - GFP EN CONDITIONS COMPLEXES. REPRESENTATION DE LA VARIATION DE CAPACITANCE LA	2
EN FARAD) DES DIFFERENTS SUPPORTS ADSORBES EN FONCTION DE LA OUANTITE THEORIQUE DE GEP DEPOSEE PAR UNITE DE	
SURFACE D'ALUMINE POREUSE (NG/MM ²) A UNE FREOUENCE FIXE DE 40KHZ	4

FIGURE 58: ELISA SUR ALUMINE - MESURE DU TAUX DE GFP EN SURFACE DES DIFFERENTS SUPPORTS PRECEDEMMENT SOUMIS AUX
experiences de saturation. Lecture de la densite optique a 415 nm rapportee a la surface des supports en mm ² .
FIGURE 59: EXPERIENCE DE SATURATION - RESULTATS GROUPES PH 7.5 CONDITIONS SIMPLES VS COMPLEXES. REPRESENTATION DE LA
variation de capacitance (${\it \Delta}$ C en Farad) des supports adsorbes en fonction de la quantite theorique de GFP
DEPOSEE PAR UNITE DE SURFACE D'ALUMINE POREUSE (NG/MM ²) A UNE FREQUENCE FIXE DE 40KHZ136
FIGURE 60: LE PROTOTYPE DE PANSEMENT

Liste des tableaux

TABLEAU 1: CLASSIFICATION DES PLAIES DE WAGNER-MEGGIT	16
TABLEAU 2: CLASSIFICATION DES MMPS SELON CHANTRAIN ET DECLERK, MEDECINE SCIENCES, 2002	21
TABLEAU 3: EXEMPLES DE PANSEMENTS A BASE D'ALGINATE (SOURCES : VIDAL, ADVANCIS ET WOUNDSOURCE)	33
TABLEAU 4: EXEMPLES DE PANSEMENTS A BASE DE COLLAGENE (SOURCE : WOUNDSOURCE)	34
TABLEAU 5: QUANTITE DE POLYACRYLAMIDE A UTILISER SUIVANT LA GAMME DE SEPARATION DES PROTEINES A ANALYSER	55
TABLEAU 6: ADSORPTION VS CHIMISORPTION, AVANTAGES ET INCONVENIENTS.	104

Introduction générale

Depuis l'origine de l'humanité, l'Homme cherche à soigner ses plaies, que ce soit par l'utilisation d'onguents ou de pansements en tous genres, allant des simples bandes de gaze aux cataplasmes de miel (<u>Shah</u>, *Journal of the American College of Certified Wound Specialists*, 2011). Après de grandes innovations au XX^{ème} siècle amenées notamment par la première et la seconde guerre mondiale (<u>Manring</u> et al., *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2009), les travaux concernant la prise en charge des plaies ont connu une légère baisse pour finalement se stabiliser au fil du temps.

Dernièrement, un intérêt grandissant est apparu quant au développement de nouveaux systèmes de prise en charge des plaies en milieux hospitalier (<u>Queen</u> et al., *International Wound Journal*, 2004). En effet, le boom technologique de ces 30 dernières années a amené de nouvelles questions concernant cette prise en charge. Les besoins grandissant du personnel à être le plus efficace et le plus pertinent possible tout en maximisant le temps passé avec le patient et en diminuant les coûts associés ont poussé à l'émergence de nouveaux concepts.

De plus, l'augmentation alarmante des plaies chroniques (<u>Järbrink</u> et al., *Systematic Reviews*, 2016), souvent associées à une évolution du mode de vie, l'augmentation de la sédentarité et le vieillissement de la population pose à ce jour de nouvelles problématiques quant à la meilleure manière de traiter ces plaies qui ne cicatrisent pas suivant le schéma habituel.

A ce titre, plusieurs projets dits « connectés » ont vu le jour au cours des 15 dernières années, amenant ainsi une nouvelle dénomination de « pansements intelligents » qui se veulent toujours plus innovants (<u>Alighami</u> et al., *Annals of Biomedical Engineering*, 2019). Mais malgré cet essor de développement il n'existe, à ce jour, aucun système sur le marché permettant d'avoir un suivi en temps réel de l'évolution des plaies chroniques.

C'est ce système que nous proposons de développer au travers de ma thèse s'intitulant « développement d'un pansement intelligent par détection de métalloprotéases ». Les métalloprotéases sont un des facteurs mesurables les plus caractéristiques de la sévérité d'une plaie (<u>Lazaro</u> et al., *Journal of Wound Care*, 2016). Une mesure de concentration de ce facteur permettrait d'acquérir des informations précieuses pour les professionnels de santé,

qui pourront ainsi voir si la plaie est en voie de cicatrisation ou si elle est, au contraire, sujette à une augmentation de l'inflammation.

L'objectif de mon projet est de développer un système de biocapteur à base d'alumine poreuse intégré à un pansement qui pourrait transmettre des informations quantitatives aux professionnels de santé.

Ce manuscrit relate donc tous les travaux effectués sur ces trois dernières années. Dans un premier chapitre « *Plaies et cicatrisation, pansement intelligent : contexte, état de l'art* » je présente une analyse bibliographique sur les plaies et les mécanismes mis en jeu lors de la cicatrisation. Dans cette première partie, un parallèle est fait entre les plaies dites aiguës qui suivent une machinerie de cicatrisation précise, et les plaies chroniques, qui elles ne suivent pas ce schéma et qui présentent un renouvellement cutané compromis avec de nombreux risques pour le patient atteint. La seconde partie de cette étude bibliographique se focalise sur les métalloprotéases matricielles, famille d'enzymes aux nombreuses fonctions, et leur implication dans la chronicité des plaies. La troisième partie de ce chapitre introductif est une présentation du pansement dans sa globalité, avec un accent sur les pansements bioactifs et leurs actions sur les plaies, ainsi qu'une revue des pansements intelligents en cours de développement. Cette troisième partie permet donc de mettre en évidence des objectifs à atteindre pour mon projet afin de se démarquer des projets existants. Ce dernier point est détaillé dans une partie initiulée *objectif de mon projet de thèse*.

Le second chapitre de ce manuscrit décrit les différentes expériences menées au cours de mon projet au travers du matériel et méthodes. Celui-ci est divisé en trois parties distinctes avec (i) une première partie présentant la production et la caractérisation de notre cible, la MMP9 en système d'expression baculovirus/cellules d'insectes, (ii) une deuxième partie relatant l'utilisation de la technique de phage display pour la sélection d'un Élément de Reconnaissance Biologique (ERB) possédant une forte affinité pour l'enzyme étudiée et enfin une troisième partie qui relate tout le procédé d'obtention du biocapteur capacitif utilisé pour le projet, de l'anodisation d'aluminium à l'élaboration de deux preuves de concept pour le projet, avec l'utilisation d'un anticorps commercial et d'un anticorps de camélidé ou VHH.

Enfin, le troisième chapitre est abordé avec la présentation et la discussion des résultats obtenus durant ce projet de thèse avec là aussi plusieurs parties distinctes. Dans un premier temps, la partie biologie du projet est discutée, de la caractérisation de l'enzyme clé aux

tentatives de phage display face à des banques naïves de VHH ou de peptides. La suite de ce dernier chapitre est consacrée à la présentation des résultats obtenus lors de l'élaboration des deux preuves de concept, avec l'utilisation d'un anticorps conventionnel ou d'un VHH pour fonctionnaliser les capteurs.

Enfin une conclusion et une discussion générale sur les perspectives du projet clôturent ce manuscrit.

Chapitre 1- Plaies et cicatrisation, pansement intelligent : contexte, état de l'art.

Partie I - La peau : physiologie, plaies et cicatrisation

1.1/ La peau : structure et fonction

La peau est considérée comme l'organe le plus étendu et le plus lourd du corps humain. Chez une personne adulte, la surface de la peau est en moyenne de 2 mètres carrés pour une masse avoisinant les 5 kilogrammes, ces valeurs variant suivant la taille et le poids des individus (<u>Leider</u>, *The Journal of Investigative Dermatology*, 1949). Cette enveloppe, première barrière protégeant l'organisme, est composée de trois couches avec de la plus superficielle à la plus profonde l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1).



Figure 1: Représentation schématique des trois couches formant la peau (source : https://microbiologiemedicale.fr/peau-anatomie/)

L'épiderme, couche la plus superficielle et la plus fine de la peau est responsable de l'imperméabilité et de la résistance de celle-ci. Cette enveloppe, dont l'épaisseur varie de 80 à 300µm, présente un épithélium stratifié composé de plusieurs couches cellulaires qui est considéré comme squameux avec des cellules en surface qui sont plates (<u>Oltulu</u> et al., Turkish *Journal of Plastic Surgery*, 2018). Parmi les différentes cellules composant l'épiderme, deux types présentent une importance particulière :

- Les kératinocytes, représentant 90 à 95% des cellules épidermiques. Elles sont responsables de la synthèse de kératine, protéine fibreuse et insoluble assurant l'imperméabilité de la peau.
- Les mélanocytes, produisant la mélanine responsable de la pigmentation de la peau et jouant un rôle de protection vis-à-vis des rayons ultraviolets.

L'épiderme est un tissu non vascularisé mais possédant de nombreuses terminaisons nerveuses. Il est recouvert de sébum, film hydrolipidique produit par les glandes sébacées du derme, assurant là aussi une fonction protectrice (<u>Wickett</u> et al., *American Journal of Infection Control*, 2006 ; <u>Haake</u> et al., *The Biology of the skin*, 2001 ; <u>Kanitakis</u>, *European Journal of dermatology*, 2002).

Le derme est un tissu conjonctif environ 10 à 40 fois plus épais que l'épiderme. Ce tissu a la particularité d'être fortement vascularisé et innervé. Il est composé de fibroblastes, cellules spécialisées dans la synthèse de fibres de collagène ou d'élastine, composants principaux de la matrice extracellulaire (MEC) environnante. Le collagène confère des propriétés de résistance aux tensions et tractions exercées lors de mouvements et l'élastine, comme son nom l'indique, apporte des propriétés élastiques à la peau (<u>Haake</u> et al., *The Biology of the skin*, 2001 ; <u>Daly</u>, *The Journal of Investigative Dermatology*, 1982 ; <u>Kanitakis</u>, *European Journal of dermatology*, 2002). Le derme possède plusieurs fonctions essentielles au bon fonctionnement du corps humain telles que :

- Une fonction sensitive permettant la perception de notre environnement (vibrations, toucher, variations de températures...)
- Une fonction nutritive pour les tissus environnants grâce à sa forte vascularisation
- Une fonction thermorégulatrice
- Une fonction de détersion des plaies grâce aux glandes sudoripares.

Enfin, la couche la plus profonde de la peau ou hypoderme, est un tissu conjonctif lâche composé d'adipocytes, cellules spécialisées dans le stockage des triglycérides. À ce titre, il a un double rôle de stockage d'énergie et de protection thermique et mécanique (<u>Kanitakis</u>, *European Journal of dermatology*, 2002).

Grâce à cette structure, la peau possède plusieurs fonctions importantes telles que la protection des agressions extérieures, la régulation thermique, et la sensation de toucher.

Au-delà de ces fonctions, la peau, comme la plupart des tissus de l'organisme, est renouvelée en permanence. Ce renouvellement concerne principalement la couche externe de la peau, où les cellules migrent de la couche inférieure de l'épiderme à la couche supérieure. En migrant, ces cellules se différencient et s'aplatissent pour finalement former la cornée ou couche supérieure de l'épiderme. Ce renouvellement prend en moyenne 45 jours, et les cellules en surface sont éliminées par un phénomène de desquamation.

Outre ce phénomène physiologique, il peut arriver que la couche protectrice de notre organisme soit endommagée de manière plus ou moins importante : on parle alors de plaie.

1.2/ Les plaies aiguës : renouvellement cutané physiologique

Une plaie est généralement considérée comme une perturbation locale, une interruption du revêtement cutané pouvant être due à une coupure ou une éraflure. Il existe plusieurs types de blessures, pouvant aller de la simple blessure superficielle n'affectant que l'épiderme à une blessure plus grave pouvant engager le pronostic vital de la personne atteinte. L'évolution de la plaie dépend généralement de son étendue et de sa gravité, mais peut également dépendre de facteurs locaux ou généraux pouvant influencer tout phénomène de guérison.

Au-delà de la sévérité de la plaie, celle-ci peut également être catégorisée suivant sa durée de cicatrisation. En effet, une plaie qui suit une cicatrisation classique avec des étapes régulées amenant à la formation d'un tissu cicatriciel est définie comme plaie aiguë. Une plaie qui, quant à elle, présente une inflammation prolongée retardant tout phénomène de cicatrisation est considérée comme chronique.

Physiologie et cicatrisation des plaies aiguës

Les plaies aiguës sont des plaies dites « classiques » qui suivent une régulation précise amenant la formation d'un tissu cicatriciel. Cette cicatrisation comporte quatre phases, chacune présentant des caractéristiques physiologiques particulières.



Figure 2: Schéma explicatif : Les quatre phases de la cicatrisation des plaies aiguës

1.2.1 - L'hémostase

Cette première phase se met en place au moment où le tissu est lésé et comporte elle-même plusieurs étapes. Dans un premier temps, une vasoconstriction des vaisseaux sanguins présents au niveau du lit de la plaie apparait. Cette constriction des vaisseaux dure 15 à 60 secondes et a pour but de ralentir le saignement pour faciliter la mise en place de l'hémostase primaire. Durant cette étape, un clou plaquettaire est créé pour parer à tout saignement résiduel. L'étape suivante est la formation d'un réseau de fibrine, réseau servant à la fois de matrice pour le développement de fibroblastes mais aussi de protection contre les microorganismes pouvant entrainer une infection. Cette étape dite d'hémostase secondaire dure entre 3 et 5 minutes et permet au phénomène de coagulation de se mettre en place. La formation du caillot ou fibrinolyse. Le temps total de cette première étape d'hémostase peut aller de 1 à 3 jours (<u>Brown</u> et al., *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2018 ; <u>Zhao</u> et al., *International Journal of Molecular Sciences*, 2016).

1.2.2- L'inflammation

La deuxième phase du processus de cicatrisation permet l'élimination de corps étrangers et de tissus morts au niveau de la blessure. Elle débute grâce à la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance par les fibroblastes présents dans le lit de la plaie (<u>Goldman</u>, *Advances*)

in Skin & *Wound Care*, 2004). Parmi ces molécules pro-inflammatoires se trouvent des interleukines comme l'interleukine 1β ou encore le facteur de nécrose tumorale ou TNFα. Ces facteurs vont initier une réponse inflammatoire avec notamment la migration de neutrophiles. Par la suite, des monocytes vont être recrutés au niveau de la plaie et vont se différencier en macrophages. Ces cellules inflammatoires sont responsables des étapes de phagocytose, d'angiogenèse et de recrutement cellulaire pour le débridement et la formation d'une matrice extracellulaire provisoire au lit de la plaie (<u>Zhao</u> et al., *International Journal of Molecular Sciences*, 2016). En parallèle, elles contribuent au recrutement de molécules spécifiques telles que des enzymes lysosomales comme des lipases ou des protéases ou des espèces oxygénées participant au nettoyage de la plaie.

D'un point de vue macroscopique, cette phase est caractérisée par l'apparition de signes spécifiques appelés signes cardinaux de l'inflammation. Ces signes comprennent le développement d'un œdème et d'un érythème au niveau de la plaie, une sensation de chaleur et ainsi qu'une douleur pulsatile (<u>Medzhitov</u>, *Cell*, 2010).

1.2.3- La prolifération / granulation

Cette troisième phase du processus de cicatrisation intervient 2 à 10 jours après apparition de la blessure, le but étant de restaurer une barrière épithéliale stable pour la formation d'un tissu cicatriciel. Suite à la phase inflammatoire, les macrophages et les neutrophiles sécrètent des cytokines et chimiokines afin d'amorcer le recrutement cellulaire au niveau de la lésion (<u>Brown</u> et al., *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2018). Au cours de cette prolifération cellulaire, le phénomène de granulation apparait. La granulation permet la formation d'un nouveau tissu conjonctif fortement vascularisé. Des fibroblastes sont activés par des facteurs de croissance pour la sécrétion de collagène et de fibrinogène afin de constituer une nouvelle matrice extracellulaire pour refermer la blessure, des angioblastes forment un nouveau réseau de capillaires et enfin des kératinocytes s'agrègent sur les bords de la plaie pour permettre l'épithélialisation du tissu (<u>Gonzalez</u> et al., *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2016).

1.2.4- Le remodelage / maturation

Le remodelage ou maturation est la phase la plus longue du phénomène de cicatrisation. Elle intervient deux à trois semaines après la blessure et peut durer jusqu'à un an. Pendant cette

phase, la réponse immunitaire diminue progressivement, une réorganisation de la matrice extracellulaire et du tissu granulaire a lieu afin d'obtenir un tissu cicatriciel ayant une structure la plus proche possible du tissu d'origine, avec notamment une diminution de la vascularisation et une augmentation de la proportion de collagène (<u>Han et Ceilley</u>, *Advanced Therapy*, 2017).

Certaines plaies ne suivent pas ce processus traditionnel de cicatrisation et sont en phase inflammatoire prolongée. Ces plaies sont dites chroniques. La prévalence de ce type de plaie a augmenté de manière alarmante ces dernières années, notamment à cause de l'augmentation du nombre de personnes diabétiques, facteur prédominant chez les personnes atteintes de plaies chroniques.

1.3/Les plaies chroniques : renouvellement cutané compromis

Une plaie est considérée comme chronique si aucun signe de cicatrisation n'est visible au bout de 4 à 6 semaines d'observation (Lazaro, Journal of Wound Care, 2016). Celles-ci ne suivent pas les étapes classiques de cicatrisation détaillées au-dessus et sont considérées comme étant en phase inflammatoire prolongée, empêchant ainsi les cellules épithéliales de refermer la plaie et exposant les tissus endommagés à un risque accru d'infection. En France en 2018, il a été estimé qu'environ deux millions de personnes souffraient de plaies chroniques (Source: Ameli). La prévalence élevée des plaies chroniques est liée à plusieurs facteurs, allant du vieillissement de la population à l'augmentation de l'obésité ou de la sédentarité.

Les mécanismes amenant à la chronicité des plaies restent cependant assez méconnus, surtout en raison de la diversité de ces dernières. Tous les types de plaies peuvent potentiellement devenir chroniques. Parmi les plus connues, on peut citer les escarres, les ulcères veineux ou encore les plaies du pied diabétique, chacune possédant des caractéristiques propres. Les médecins spécialisés dans le traitement de ce type de plaies affirment néanmoins que l'installation de la chronicité est souvent due à des affections périphériques telles que la neuropathie, l'ischémie ou encore les maladies artérielles. Ces maladies sont en général concomitantes avec un diabète, où le niveau de glucose sanguin a un effet dévastateur sur les extrémités nerveuses et sanguines. Ces effets altèrent la perception et la sensation des patients qui ne se rendent généralement pas compte de la gravité de leur cas.

1.3.1 - Le diabète

Le diabète est défini comme un trouble métabolique de l'assimilation, de l'utilisation et du stockage des sucres apportés par l'alimentation. Il est caractérisé par une hausse du taux de glucose dans le sang (hyperglycémie) pouvant être liée à une déficience de la sécrétion ou de l'action de l'insuline, hormone produite par le pancréas. Cette hormone est essentielle à la pénétration du glucose dans les cellules musculaires, adipeuses ou hépatiques. Lorsqu'elle est en défaut, le taux de sucre dans le sang augmente, amenant sur le long terme des complications diverses (American Diabetes Association, Diabetes Care, 2014).

Il existe plusieurs types de diabète, mais les plus représentés sont le diabète de type I qui touche environ 10% des diabétiques et le diabète de type II qui lui touche 90% de la population diabétique. Il existe également le diabète gestationnel, apparaissant généralement au deuxième trimestre de grossesse et disparaissant post-partum.

Le diabète de type I est causé par un dysfonctionnement de lymphocytes T qui identifient les cellules pancréatiques (cellules β) comme des cellules étrangères et les éliminent. Les cellules β étant éliminées, elles ne peuvent pas produire d'insuline (<u>Castano et Eisenbarth</u>, *Annual Review of Immunology*, 1990 ; <u>American Diabetes Association</u>, *Diabetes Care*, 2014). C'est donc une maladie auto-immune dont la moitié des cas est détectée chez des jeunes de moins de 20 ans et qui ne cesse d'augmenter, à un rythme de 3 à 4% par an (Source Inserm).

Le diabète de type II est quant à lui provoqué par une perturbation du métabolisme glucidique. Les cellules du foie, du muscle et du tissu adipeux présentent une baisse de sensibilité à l'insuline, amenant une accumulation de glucose dans le sang. Les cellules pancréatiques sécrètent alors plus d'insuline, jusqu'à s'épuiser (<u>Kahn</u>, *Diabetes*, 1994). Son apparition est lente, rendant son diagnostic généralement tardif. L'hyperglycémie reste longtemps asymptomatique et est découverte souvent de manière fortuite.

Si le diabète de type I est quelque chose d'acquis par le corps humain, le diabète de type II est quant à lui dû à plusieurs facteurs tels que l'obésité et la sédentarité. Cette mauvaise hygiène de vie est malheureusement en constante augmentation aux cours des dernières décennies, augmentant ainsi de manière alarmante le nombre de personnes diabétiques (<u>Tuomilehto</u> et al., *The New England Journal of Medicine*, 2001). En 2017, il a été estimé qu'environ 425 millions d'adultes entre 20 et 79 ans dans le monde souffraient de diabète avec un coût global de 727 milliards de dollars. Au-delà de ces chiffres, il a été estimé que 352 millions de

personnes présentent un risque majeur de développer un diabète de type II dans les années à venir (Source International Diabetes Federation).

Les symptômes du diabète de type II sont divers avec généralement une soif intense, un manque d'énergie constant, une vision trouble et une cicatrisation des plaies ralenties.

Ce dernier facteur est important car il soulève une autre problématique majeure dans les dépenses de santé de ces dernières décennies. Cette problématique concerne le suivi et le traitement des plaies chroniques. Diabète et plaies chroniques sont liés car une glycémie élevée amène un système immunitaire fragilisé et de nombreuses complications telles que des artérites distales où les petites artères du genou ou des orteils rétrécissent ou encore des neuropathies qui amènent une atteinte des nerfs périphériques responsables des sensations cutanées. Ces effets secondaires facilitent la dégradation des plaies, le patient ne se rendant généralement pas compte de la gravité de celle-ci (<u>Gianino</u> et al., *Bioengineering*, 2018).

1.3.2- Classification des plaies chroniques

Il existe plusieurs types de plaies chroniques classées en trois grandes catégories : les ulcères veineux ou artériels, la plupart du temps localisés au niveau de la jambe, les escarres, ou les plaies du pied diabétique. Chacune de ces plaies présente des caractéristiques propres, tant au niveau de l'aspect de celles-ci qu'au niveau des mécanismes moléculaires qui les régissent.

1.3.2.1- Ulcères veineux/artériels

Ce type de plaie est très fréquent chez les personnes de plus de 70 ans et est le plus souvent considéré comme un symptôme, une expression au niveau de la peau d'une maladie vasculaire. La cause vasculaire peut être veineuse, artérielle, mixte ou microcirculatoire, différenciant ainsi plusieurs types d'ulcérations. Les plaies chroniques dues à un problème vasculaire les plus représentées sont les ulcères veineux et les ulcères artériels.

L'ulcère veineux est le plus fréquent des ulcères de jambe puisqu'il représente 70% des affections chroniques des membres inférieurs. Il se traduit généralement par la dégradation d'une plaie persistante suite à des complications de troubles circulatoires comme les varices (dilatation anormale et permanente des veines) ou les phlébites (thrombose veineuse) (<u>Grev</u> et al., *British Medical Journal*, 2006). Ces maladies amènent donc une insuffisance du retour veineux où le sang stagne au niveau des membres inférieurs. Elles amènent une sensation de jambes lourdes, des crampes ou encore des œdèmes. Cette pression trop importante cause une inflammation qui empêche le retour des toxines dans les veines et ne permet donc pas

leur élimination. La moindre plaie va alors entrainer une accumulation de ces toxines favorisant ainsi la chronicité. Ainsi, la jambe présente une lésion étendue ayant un aspect de carte géographique et pouvant être localisée sur la malléole interne, externe ou sur la partie inférieure du mollet. Généralement peu profonde et peu douloureuse, elle est souvent accompagnée de tâches marrons ou dermite ocre, différenciant les ulcères veineux d'autres plaies chroniques (<u>Grey</u> et al., *British Medical Journal*, 2006). Ce type de plaie touche préférentiellement les personnes âgées dont les maladies veineuses n'ont pas reçu le traitement approprié. Le caractère héréditaire de nombreuses maladies vasculaires permet une prévention de ce type de plaies suivant les antécédents familiaux du patient (<u>Simon</u> et al., *British Medical Journal*, 2004). Outre un traitement des problèmes circulatoires, ce type de plaie peut être évité grâce à des règles hygiéno-diététiques précises (<u>Ouvry</u>, *Revue Francophone de cicatrisation*, 2017).

Les ulcères artériels ne sont pas aussi fréquents que les ulcérations veineuses puisqu'ils ne constituent que 6 à 10% des ulcères de jambes, affectant ainsi environ 1% des sujets de plus de 65 ans. La genèse de ce type de plaie est similaire aux ulcères veineux, avec la dégradation d'une plaie classique, bien qu'étant due à des affections différentes. Les facteurs de risques de ce type de plaie sont variés allant du diabète, à l'insuffisance coronarienne ou encore à l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI). Cette dernière semble être le dénominateur commun pour cet ulcère. L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs ou artérite est une maladie chronique se caractérisant par la présence de sténoses (rétrécissement du diamètre des artères) ou d'occlusions (formation d'un caillot) dans les artères assurant la vascularisation des membres inférieurs. Cette diminution de l'irrigation se traduit alors par une sensation de douleur croissante s'apparentant à des crampes ou des brûlures au niveau des jambes (<u>Aboyans</u> et al., *La Presse Médicale*, 2018).

Ce phénomène d'ischémie semble être la cause principale de la dégradation des plaies, les tissus ne recevant pas suffisamment d'oxygène ou d'autres molécules nécessaires à une cicatrisation normale. Les ulcères artériels se situent préférentiellement sur le mollet, le pied ou les orteils et sont souvent de petite taille. Ces plaies ont un caractère nécrotique, se creusent rapidement, pouvant aller jusqu'à l'os, et présentent des bords abrupts et très douloureux. La peau autour de l'ulcère est alors froide et pâle avec une diminution voire une disparition du pouls (<u>Grey</u> et al., *British Medical Journal*, 2006). Comme pour les ulcères

veineux, ce type de plaie peut être évité par une modification du mode de vie, le tabac et une mauvaise hygiène alimentaire étant les facteurs de risques principaux (<u>Fowkes</u> et al., *The Lancet*, 2013) (Source Hôpitaux Universitaires de Genève, Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph).

1.3.2.2- Les escarres

Les escarres ou ulcères de pression sont des plaies chroniques provoquées par la compression ou le cisaillement des tissus mous. La compression est une force perpendiculaire s'exerçant entre deux plans durs (un des deux plans étant généralement osseux), entrainant une hypoxie tissulaire de la zone concernée à laquelle s'ajoute des phénomènes de microthromboses. Le cisaillement est une force tangentielle entre les tissus superficiels et profonds provocant un rétrécissement voire une occlusion des capillaires. Si ces deux phénomènes sont appliqués sur des périodes prolongées, ils amènent une lésion nécrotique des tissus ou escarre (Defloor, Journal of Clinical Nursing, 1999). En 2014, l'enquête nationale de prévalence PERSE menée sur 21538 patients a montré qu'environ 8,1% des patients hospitalisés présentent au moins une escarre, ces chiffres concordant avec les études internationales (Barrois et al., Revue francophone de cicatrisation, 2017). Ce type de plaie apparaît la plupart du temps chez les patients alités, présentant une paralysie ou une atteinte neurologique amenant ainsi un diagnostic tardif, le patient ne ressentant pas la douleur. L'âge, la déshydratation et le diabète sont d'autres facteurs favorisant les escarres, l'âge moyen des personnes atteintes étant compris entre 76 et 80 ans. Il existe plusieurs zones dites « à risque » pour ce type de plaie suivant la position maintenue par le patient. Les patients alités sont à risque pour le sacrum et les talons, zones osseuses étant en contact direct avec le lit. Les patients en position assise sont quant à eux à risque sur les zones du sacrum et de l'ischion. Au-delà des zones à risque, les escarres peuvent être classées en quatre stades suivant leur gravité, allant de l'érythème simple (rougeur) à l'atteinte osseuse (Battu, Actualités pharmaceutiques, 2018). Comme la plupart des plaies chroniques, les escarres peuvent être évitées par notamment l'identification et la diminution préalable de facteurs de risques. Les phénomènes de pression peuvent être diminués par le changement périodique de position du patient ou encore l'utilisation de supports adaptés de types coussins ou matelas anti-escarres. L'observation clinique régulière des zones à risque joue également un rôle préventif important, à côté d'une bonne hygiène corporelle.

1.3.2.3 - Les plaies du pied diabétique

L'infection du pied est une des complications les plus dévastatrices du diabète. Avec une prévalence globale de 6,3% (Sen, Advances in wound care, 2019) elle représente une des plaies chroniques les plus fréquentes. Si nous reportons ces chiffres à la proportion de personnes diabétiques, 25% des personnes atteintes de diabète de type II présenteront au cours de leur vie une plaie du pied diabétique (Boulton et al., The Lancet, 2005). Ces plaies sont également agressives, puisque 85% des amputations chez les personnes diabétiques sont dues à une plaie du pied diabétique (Singh et al., Journal of the American Medical Association, 2005 ; Alavi et al., Journal of the American Academy of Dermatology, 2014). Comme pour les autres plaies chroniques, cette infection se traduit par l'invasion et la multiplication de micro-organismes entrainant une réponse inflammatoire allant jusqu'à la destruction des tissus atteints et des tissus environnants. La majorité des infections du pied chez les diabétiques sont concomitantes à une neuropathie (atteinte du système nerveux périphérique) et à une ischémie (atteinte vasculaire) souvent dues à l'hyperglycémie prolongée du patient. L'atteinte neuropathique est la plupart du temps mixte (sensitive, motrice et végétative) (Pitocco et al., European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2019). L'atteinte sensitive entraine une perte de sensibilité à la douleur tandis que l'atteinte motrice provoque la modification de l'architecture du pied et la diminution des mouvements du pied et de la cheville. Ces déformations au niveau du pied amènent ainsi des zones de contact inhabituelles lors de la marche. L'atteinte neurovégétative entraine une forte sècheresse cutanée via la diminution de la sudation (Alexiadou et Doupis, Diabetes Therapy, 2012 ; Hazari et al., The foot, 2019). Tous ces phénomènes entrainent une hyperkératose au niveau des zones de contact prolongées. Ainsi, un frottement, un traumatisme mineur, une brûlure ou une coupure peuvent alors se compliquer et entrainer la formation d'une plaie du pied diabétique. Le patient ne ressent généralement pas la douleur, favorisant le retard des soins et la pérennisation de la plaie. Ce type de plaie est la plupart du temps nécrotique, se creusant jusqu'à l'os et peut être situé au niveau du talon (hyperpression plantaire) ou des orteils (déformations neuropathiques). Le diagnostic des plaies du pied diabétique est basé sur un ensemble d'examens cliniques, microbiologiques et iconographiques (Jeffcoate et Harding, The Lancet, 2003) et peut être catégorisé suivant sa sévérité grâce à l'échelle de Wagner-Meggitt (Gianino et al., Bioengineering, 2018). Cette classification, allant du stade 0 à 5

(Tableau 1) permet au personnel médical une évaluation rapide de la plaie ainsi qu'une prise en charge adaptée.

Stade	Lésion	Observations
0	Douleurs, pas de lésion physique	Peau intacte, pas de perte de sensibilité,
1	Ulcère superficiel	pas d'infection
2	Ulcère profond	Perte de sensibilité, infection en surface
3	Ulcère profond avec atteinte osseuse	Ulcère atteignant le tissu musculaire et
		osseux
4	Gangrène localisée	
5	Gangrène étendue, risque d'amputation	
	élevé	

Tableau 1: Classification des plaies de Wagner-Meggit

Une fois le diagnostic établi, le personnel médical doit mettre en place un plan d'action afin de soulager le patient le plus rapidement possible. Le traitement de ce type de plaie relève donc d'une prise en charge pluridisciplinaire puisqu'en plus de traiter l'infection, il faut également corriger les facteurs ayant permis la mise en place de cette plaie avec notamment une correction du positionnement du pied et un rétablissement de la vascularisation. Le traitement de l'infection est double avec dans un premier temps une action chirurgicale pour le débridement de la plaie et la diminution de la charge bactérienne. En parallèle, un traitement antibiotique local ou général est attribué au patient, pour éliminer toute charge bactérienne restante (<u>Edmonds</u>, *Drugs*, 2006). Lorsque la plaie est en voie de guérison le personnel hospitalier s'occupe alors de la prévention des récidives notamment avec la mise en décharge du pied à l'aide de matériel spécialisé pour minimiser les contacts anormaux et travailler vers une modification de l'architecture du pied (<u>Alexiadou et Doupis</u>, *Diabetes Therapy*, 2012).

1.3.3- Physiopathologie des plaies chroniques

Plusieurs facteurs peuvent influencer la cicatrisation des plaies que ce soit d'un point de vue macroscopique ou microscopique. Dans un premier temps, des facteurs physiques tels que la

pression, la température, l'humidité ou encore le pH peuvent jouer un rôle dans les processus de guérison du fait que la plaie doit rester dans un environnement optimal pour favoriser la formation du tissu cicatriciel. L'humidité est un facteur clé qui doit être précisément régulé. En effet, une plaie en voie de cicatrisation a besoin d'humidité, puisque les cellules impliquées dans la guérison telles que les fibroblastes ont besoin d'un taux d'eau avoisinant les 70% pour fonctionner de manière optimale. En revanche, un excès d'humidité peut entrainer une macération de la plaie avec la formation de biofilms pouvant déboucher sur une infection (Ativeh et al., Current Pharmaceutical Biotechnology, 2002). De la même manière, une hausse de température au niveau du lit de la plaie peut être défavorable au processus de cicatrisation car elle peut permettre aux bactéries de se développer facilement, amenant là aussi un fort risque d'infection (Gethin et al., Wound Repair and Regeneration, 2018). Une pression physique anormale peut également jouer un rôle dans le retard de la cicatrisation empêchant ainsi la reconstruction du tissu endommagé (Morton et Phillips, Journal of the American Academy of Dermatology, 2016). Enfin, un autre facteur important à souligner dans ce processus est le pH car lors d'une blessure, les tissus internes endommagés sont exposés à l'environnement immédiat. Physiologiquement notre peau est légèrement acide avec un pH de 5.5 en moyenne alors que notre pH interne est de 7.4. Ce décalage provoque des variations de pH dans le lit de la plaie qui peuvent, dans certains cas, affecter le processus de cicatrisation. En ce qui concerne les plaies chroniques, plusieurs études ont montré que les plaies présentant une forte charge bactérienne ont un pH dont la valeur peut varier de 7.15 à 8.9 (Tsukada et al., Wounds, 1992; Wilson et al., European Journal of Vascular Medicine, 1979). Cette augmentation semble être un facteur important dans la chronicité des plaies, montrant ainsi la présence d'une infection. Une réduction du pH semblerait augmenter l'oxygénation des plaies, diminuant ainsi les niveaux de protéases et la prolifération de bactéries et permettant une évolution de la cicatrisation vers la phase de prolifération (Gethin, Wounds UK, 2007).

Une bonne régulation de ces facteurs externes semble donc être favorable à la poursuite de la cicatrisation, mais certains facteurs internes, plus compliqués à mesurer, jouent aussi un rôle dans la dégradation des plaies. L'hypoxie tissulaire est un de ces facteurs. Celle-ci est définie comme un état de réduction des niveaux d'oxygène pouvant être dû à une diminution des apports en oxygène ou une consommation accrue d'oxygène au niveau de la plaie. Une hypoxie locale se manifeste souvent au début de la phase d'inflammation dans le processus

classique de cicatrisation, principalement en raison de la stabilisation du facteur induit par l'hypoxie 1 ou HIF-1 qui régit plusieurs processus de réparation tissulaire. Cependant, chez les patients atteints de diabète, l'hyperglycémie semble entrainer une réduction de l'expression de HIF-1, amenant ainsi une augmentation du phénomène d'hypoxie contribuant à la chronicité de la plaie (<u>Hong</u> et al., *Advances in Wound Care*, 2014 ; <u>Davis</u>, *Current Diabetes Reports*, 2018).

Contrairement aux phénomènes de cicatrisation classiques décrits précédemment, les plaies chroniques ne suivent pas une séquence de cicatrisation systématique puisqu'elles ne dépassent généralement pas la phase d'inflammation. Elles présentent donc une accumulation de cellules inflammatoires telles que des neutrophiles, des macrophages ou même des lymphocytes T sur le site de la plaie. Chacune de ces cellules joue un rôle spécifique dans l'inflammation provocant ainsi douleur, gonflement et sensation de chaleur au niveau de la blessure. Au niveau moléculaire, ces cellules sécrètent des facteurs inflammatoires qui, dans le cas des plaies aiguës permettent une cascade de réactions pour s'engager dans les étapes de phagocytose, angiogenèse et recrutement cellulaire, l'objectif principal étant la dégradation de la matrice extracellulaire endommagée et la formation d'une matrice provisoire (Gianino, Bioengineering, 2018). En parallèle, les facteurs de croissance comme par exemple le facteur de croissance dérivé des plaquettes ou PDGF, jouant un rôle important dans l'étape de prolifération ou granulation sont en déficit. Lors de la prolifération, le PDGF est entre autres responsable du recrutement de kératinocytes sur les bords de la plaie favorisant ainsi l'épithélialisation du tissu. Le déficit de cette molécule empêche donc la fermeture de la plaie, participant ainsi au phénomène de chronicité (Goldman, Advances in Skin & Wound Care, 2004).

La continuité de l'inflammation chez les patients atteints de plaie chronique amène aussi une accumulation de cellules inflammatoires anormale au niveau du lit de la plaie. Ces cellules, et plus précisément les neutrophiles et les macrophages libèrent de nombreuses cytokines proinflammatoires, dont les interleukines 6 (IL-6) et 1 β (IL-1 β), qui induisent la libération de protéine chimio attractive des monocytes (MCP), recrutant ainsi des monocytes qui se différencieront par la suite en macrophages, empêchant l'évolution de la plaie (<u>Brown</u> et al., *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2018 ; <u>Zhao</u>, *International Journal of Molecular Sciences*, 2016).

Les cytokines pro-inflammatoires mentionnées précédemment, plus précisément l'interleukine 1 β ou encore le TNF α sont également responsables du recrutement de certaines enzymes telles que les métalloprotéases matricielles (MMP) dans le lit de la plaie. Physiologiquement, ces endopeptidases à zinc, en partenariat avec leurs inhibiteurs (TIMPs, *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloprotéinases*) sont importantes dans la dégradation de la MEC abimée et la construction d'une matrice provisoire. Chez les personnes atteintes de plaies chroniques, l'équilibre entre enzyme et inhibiteur semble compromis, détruisant toute tentative de cicatrisation. A ce titre, les MMPs constituent donc une cible de choix pour le suivi des plaies chroniques d'un point de vue moléculaire.

Partie II - Les métalloprotéases matricielles

2.1/Description de la famille des MMPs

Les métalloprotéases matricielles (MMPs) sont des protéases ou enzymes protéolytiques régulant un grand nombre de processus par le clivage de protéines pouvant être circulantes, membranaires ou extracellulaires. Cette fonction de clivage classe ces enzymes dans la catégorie des endopeptidases (clivage central de peptides ou protéines), leur activité ayant été décrite pour la première fois en 1962 dans une étude de dégradation du collagène fibrinaire chez les têtards (<u>Gross et Lapiere</u>, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1962). Cette première MMP, responsable du clivage des collagènes de type I, II et II, ne fut isolée sous forme pure qu'en 1970 à partir d'extraits de peau humaine (<u>Bauer</u> et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1975).

La nomenclature « MMP » a quant à elle été usitée pour la première fois dans les années 1980 lors de la description des trois premières MMP isolées : la MMP1 possédant l'activité collagénase décrite ci-dessus, la MMP2 possédant elle aussi une activité collagénase mais clivant cette fois-ci le collagène de type IV (<u>Liotta</u> et al, *Nature*, 1980) et la MMP3, possédant quant à elle une activité plus large de clivage de protéoglycanes (<u>Galloway</u> et al, *Biochemical Journal*, 1983).

Actuellement, 23 MMPs ont été identifiées chez l'Homme, chacune étant codée par des gènes différents et produite par de nombreux types cellulaires comme les cellules immunitaires (neutrophiles et macrophages) ou encore les cellules reconstructrices (fibroblastes). Ces métalloprotéases sont classées en plusieurs groupes suivant leurs substrats. Il y a les collagénases (MMP1, 8 et 13), les gélatinases (MMP2 et 9), les stromélysines (MMP3, 10 et 11), les matrilysines (MMP7 et 26), les MMP associées à la membrane ou *membrane-type MMP* (MMP14 à 17) et enfin un dernier groupe comprenant les MMPs n'appartenant à aucune des catégories citées précédemment (Tableau 2) (<u>Chantrain et DeClerck</u>, *Medecine Sciences*, 2002 ; <u>Visse et Nagase</u>, *Circulation Research*, 2003).

Classe	Numérotation	Nom commun
	MMP1	Collagénase interstitielle
Collagénases	MMP8	Collagénase neutrophile
	MMP13	Collagénase 3
Gélatinases	MMP2	Gélatinase A
Genatimated	MMP9	Gélatinase B
	MMP3	Stromélysine 1
Stromélysines	MMP10	Stromélysine 2
	MMP11	Stromélysine 3
Matrilysines	MMP7	Matrilysine 1
	MMP26	Matrilysine 2
MMP membranaire	MMP 14 à 17	/
	MMP12	Métallo-élastase
Autres	MMP18 19 20	Enamelysine
	MMP21 22 23 27 et 28	/

Tableau 2: Classification des MMPs selon Chantrain et DeClerk, Medecine Sciences, 2002

2.2/Structure des MMPs



Figure 3 : Structure générale des MMPs : l'exemple de MMP9 (source : http://www.rcsb.org/3d-view/1L6J/1)

Le terme « métalloprotéase » rassemble toutes les protéases possédant une activité catalytique nécessitant un ion métallique. Les MMPs sont des enzymes appartenant à la superfamille des zincines. Elles ont la particularité de contenir un motif très conservé permettant la fixation d'un atome de zinc au niveau de leur site catalytique. Le séquençage complet du génome humain a permis de mettre en évidence la présence de 24 gènes codant des métalloprotéases matricielles donnant ainsi lieu à la traduction de 23 MMPs différentes (Nagase et al., Cardiovascular Research, 2006). En effet, deux gènes distincts codent la même MMP (MMP23a et MMP23b). Bien que différenciées par les lettres « a » et « b » suivant le gène à partir duquel elles sont produites, ces enzymes présentent des séquences en aminoacides strictement identiques (Galea et al., Cellular and Molecular Life Sciences, 2014). En ce qui concerne les 23 MMPs existantes, nous retrouvons, malgré une spécificité de substrat pour chacune d'entre-elles, une structure homologue avec 40 à 60% d'identité de séquences en acide aminés. On peut ainsi distinguer trois domaines aux fonctions spécifiques : le domaine N-terminal ou domaine pro-peptide d'environ 80 acides aminés, le domaine catalytique, central, d'environ 170 acides aminés et enfin le domaine C-terminal ou hemopexin like domain possédant environ 200 acides aminés.

N _{terminal} Pro peptide	Domaine catalytique	C _{terminal} Domaine « <i>Hemopexin like</i> »
~80 aa	~170 aa	~200 aa

Figure 4 : Les différents domaines des MMPs

Le domaine pro-peptide contient un résidu cystéine au sein d'un motif PRCGXPD très bien conservé entre les différentes MMPs. Ce domaine « *cysteine switch* » est capable d'interagir avec le zinc et a pour rôle le maintien des métalloprotéases sous une forme inactive. Les MMPs sont donc synthétisées sous forme de proenzymes qui s'activeront par la suite dans le milieu extracellulaire par protéolyse de cette partie pro-peptidique, libérant ainsi le site actif de la molécule (paragraphe 2.4, Activation et régulation) (<u>Tallant</u> et al., *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, 2010).

La partie centrale des métalloprotéases constitue le domaine catalytique, lieu de l'activité endopeptidase de la molécule. Ce domaine contient un motif HEXGHXXGXXH relativement bien conservé entre les différentes MMPs, les trois résidus histidines de ce motif étant très importants dans l'interaction avec l'ion Zn²⁺. La présence complémentaire d'un résidu méthionine, responsable d'un « Met-turn » au sein de la molécule est également importante dans l'interaction avec le zinc catalytique. Cette topologie particulière due au résidu méthionine est l'élément clé ayant permis le regroupement des MMPs au sein de la famille des metzincines (Nagase et al., Cardiovascular Research, 2006 ; Bode et al., Federation of European Biochemical Societies Letters, 1993).



Figure 5 : Détail du domaine des MMPs qui interagit avec l'atome de zinc (source: http://www.rcsb.org/3d-view/1L6J?preset=ligandInteraction&sele=ZN)

Le domaine hémopexine joue quant à lui un rôle dans les interactions des MMPs avec leurs inhibiteurs (*TIMPs, Tissue Inhibitor Of Matrix Metalloprotéinases*), avec des molécules membranaires ou encore des substrats protéiques.

Enfin, les métalloprotéases matricielles possèdent également un domaine « pré » ou peptide signal d'une vingtaine de résidus permettant l'adressage du polypeptide synthétisé dans le réticulum endoplasmique vers les voies de sécrétion. Ce domaine « pré » est présent sur toutes les MMPs, sauf la MMP23, indiquant ainsi une éventuelle voie de sécrétion alternative (<u>Kim et Joh</u>, *Biomolecules and Therapeutics*, 2012 ; <u>Velasco</u> et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 1999).

2.3/Fonctions générales des MMPs

Les métalloprotéases matricielles, sous leur forme activée, sont des enzymes dont la fonction est le clivage de protéines. Elles ont la capacité de dégrader tous les composants de la matrice extracellulaire. A ce titre, ces endopeptidases participent à de nombreux phénomènes physiologiques comme par exemple l'embryogenèse, la cicatrisation des plaies ou encore l'angiogenèse. Au niveau cellulaire, ces enzymes sont responsables de la migration et du recrutement cellulaire, de l'inflammation ou encore de l'apoptose de certaines cellules (Löffek et al., *European Respiratory Journal*, 2010). Lorsque cette activité endopeptidase est dérégulée, ces enzymes peuvent également jouer un rôle dans l'apparition ou le développement de lésions endovasculaires, d'anevrysmes, de néphropathies, d'arthrite ou encore d'ulcération tissulaires. Cette dérégulation contribue aussi au développement de certains types de cancers (<u>Nelson</u> et al., *Journal of Clinical Oncology*, 2000). Ces rôles variés sont dus en partie à la diversité des métalloprotéases, plus précisément à leur diversité de substrats.

Parmi les métalloprotéases les plus représentées se trouvent les collagénases et les gélatinases qui ont pour rôle l'hydrolyse du collagène et de la gélatine, protéines structurales présentes en quantités importantes chez l'Homme. Ces protéines permettent la formation de la matrice extracellulaire encore appelée ciment intercellulaire, qui est un réseau finement organisé ayant plusieurs rôles fondamentaux tels que l'adhésion, l'organisation, la communication et la régulation de cellules pour leur transformation en tissu spécifique (<u>Calev</u> et al., *Advances in Wound Care*, 2015).

2.4/Activation et régulation

Les métalloprotéases matricielles sont synthétisées sous forme de « préproenzyme » par le réticulum endoplasmique. Une fois la synthèse complète, les enzymes doivent quitter le

réticulum, suivre une voie de transport intracellulaire pour enfin être adressées à leurs cibles extracellulaires. C'est le rôle du peptide signal (domaine « pré »). Cette séquence de quelques acides aminés permet l'adressage de l'enzyme à un compartiment cellulaire précis.

Après cette première étape d'adressage, les enzymes sont encore sous forme inactive ou forme zymogène. Le résidu cystéine de ce prodomaine joue un rôle important dans son interaction avec le zinc pour maintenir l'enzyme sous forme inactive. Elle doit donc subir un clivage protéolytique afin de libérer son site actif. Cette coupure permet l'exposition du substrat au site catalytique de l'enzyme. Les MMPs sont activées de façon ordonnée dans le milieu extracellulaire, soit par une MMP alentour soit par une autre enzyme, la plasmine, aboutissant ainsi à une activation en chaîne. La voie d'activation médiée par la plasmine est une voie métabolique importante du corps humain car elle intervient notamment dans le processus de fibrinolyse, étape clé dans la coagulation sanguine. Cette enzyme est produite à partir du plasminogène par un activateur membranaire (urokinase ou activateur tissulaire du plasminogène), qui est libéré lors du remaniement de la MEC (<u>Rerolle</u> et al., *Néphrologie*, 2001 ; <u>Murphy</u> et al., *APMIS*, 1999). Une fois activées, les MMPs peuvent soit interagir avec leurs substrats, soit devenir à leur tour activatrices, continuant ainsi la cascade d'activation.

2.5/Inhibition: les TIMPs (*Tissue Inhibitors of MMPs*)

Une régulation fine des MMPs est nécessaire à l'équilibre physiologique entre synthèse et dégradation. Les métalloprotéases possèdent leurs inhibiteurs spécifiques, les TIMPs ou « *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloprotéinases* ». Quatre différents TIMPs ont été découverts chez les vertébrés, dénommées TIMP1, TIMP2, TIMP3, et TIMP4. TIMP1 fut le premier à être isolé et purifié en 1978 par Vater à partir d'une culture cellulaire dérivée de tendons humains, son activité d'inhibition de la collagénase ayant été quant à elle découverte en 1970 par Bauer (<u>Vater</u> et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 1978 ; <u>Bauer</u> et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1975). Structuralement ces protéines possèdent 184 à 194 acides aminés avec en moyenne 40% d'identité de séquences, témoignage d'une forte conservation entre les différentes formes (<u>Brew et Nagase</u>, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010). De plus, chacune d'entre elles comporte 12 cystéines conservées formant ainsi six ponts disulfures. Ces inhibiteurs possèdent deux domaines distincts : un domaine N-terminal d'environ 125 acides aminés, portant l'activité inhibitrice des MMPs et un domaine C-terminal
d'environ 65 acides aminés. La conformation de ces deux domaines est stabilisée par trois des six ponts disulfures (Visse et Nagase, Circulation Research, 2003). La plupart de ces molécules sont ubiquitaires, inhibant ainsi toutes les MMPs avec plus ou moins d'efficacité suivant les formes. Par exemple, TIMP1, bien qu'ubiquitaire, possède un faible taux d'inhibition pour les MMP14, 16, 19 et 24. Le mécanisme d'inhibition repose sur le blocage du site actif (site catalytique) des MMPs. La partie N-terminale des TIMPs va se loger dans le site actif des MMPs, où des interactions faibles vont maintenir ce complexe, bloquant ainsi l'activité endopeptidase de la molécule. Ces inhibiteurs ont également la capacité de bloquer la forme proenzyme des MMP 2 et 9 et ce avec plus ou moins d'affinité. Par exemple, TIMP1 inhibe uniquement proMMP9, TIMP3 quant à elle a la capacité d'inhiber les deux proenzymes. Ce blocage en forme inactive a lieu entre le domaine C-terminal de l'inhibiteur et le domaine « hemopexin like » de la proMMP. Cette double fonction des TIMPs permet une régulation contrôlée en conditions physiologiques des MMPs. Un déséquilibre entre enzyme et inhibiteur peut avoir des conséquences néfastes, notamment pour ce qui est de la chronicité des plaies ou encore pour l'apparition ou la progression de certains cancers (<u>Murphy</u>, Genome Biology, 2011).

2.6/Implication des MMPs dans les plaies chroniques

2.6.1- Les MMPs et la cicatrisation

La cicatrisation des plaies est un phénomène permettant l'illustration de la plupart des fonctions des métalloprotéases matricielles. En effet, celles-ci sont entre autres responsables de la dégradation et du remplacement de la matrice extracellulaire lésée lors de la plaie. A ce titre, elles voient leur activité décuplée lors de la phase d'inflammation. Pour rappel, cette phase est la deuxième dans le phénomène de cicatrisation des plaies aiguës (paragraphe 1.2.2, *L'inflammation*). Elle intervient après la coagulation et permet donc le débridement physiologique de la plaie. Les MMPs les plus représentées lors de ce phénomène sont les collagénases (MMP1, MMP8 et MMP13), les gélatinases (MMP2 et MMP9) ainsi que certaines stromélysines et matrilysines (MMP3, MMP7 et MMP10). Elles vont dégrader l'épithélium endommagé pour permettre la migration des neutrophiles et des monocytes. Ces cellules inflammatoires sont connues pour exprimer des MMP mais elles ne sont pas les seules à avoir cette capacité puisque les cellules épithéliales comme les fibroblastes peuvent également synthétiser certaines de ces enzymes telles que MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP9 ou

encore MMP10. Les MMPs sont alors présentes en grande quantité au niveau de lit de la plaie et entrainent une cascade de réaction notamment via la régulation de certaines chimiokines par protéolyse. Dans le cas d'une plaie aiguë, le taux de MMP subit une hausse importante pour atteindre un plateau pendant les 2-3 premiers jours, puis baisse de manière drastique en fin de la phase d'inflammation. Cette diminution est due à une inhibition par les TIMPs, mais également à une baisse de leur synthèse par les cellules inflammatoires ou les cellules épithéliales. Ces molécules vont alors laisser place à des protéines impliquées dans la formation tissulaire pour ainsi continuer le processus de cicatrisation (<u>Gill et Parks</u>, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008 ; <u>Caley</u> et al., *Advances in Wound Care*, 2015).

2.6.2- Les MMPs dans les plaies chroniques

Les plaies chroniques sont caractérisées comme des plaies en phase inflammatoire prolongée ne cicatrisant pas après 4 à 6 semaines d'observation. Plusieurs facteurs macro et microscopiques sont la cause de cette dégradation (paragraphe 1.3.3, *Physiopathologie des plaies chroniques*) Parmi eux se trouve le taux de métalloprotéases matricielles qui présente des proportions largement supérieures à celui des plaies aiguës. Outre ces valeurs supérieures, il a été montré que ce taux subsiste bien plus longtemps chez les patients atteints de plaie chronique.



Figure 6 : La phase inflammatoire : activité protéasique chez les patients atteints de plaies chroniques vs plaies aiguës (Source : Consensus international Rôle des protéases dans le diagnostic des plaies. Étude menée par un groupe d'experts. Londres : Wounds International, 2011)

Comme expliqué précédemment, parmi les 23 MMPs existantes, seulement les MMP1, 2, 3, 7, 8, 9, 10 et 13 jouent un rôle dans les phénomènes de cicatrisation (paragraphe 2.6.1, *Les MMPs et la cicatrisation*). A ce titre, ces MMP peuvent également jouer un rôle délétère lors de l'inflammation prolongée caractéristique des plaies chroniques. Certains stimuli sont susceptibles de prolonger cette activité protéasique élevée et provoquer ainsi une pérennisation de l'inflammation. Parmi ces stimuli on retrouve la présence de corps étrangers, de bactéries ou encore la formation de biofilms. Ces éléments poussent les métalloprotéases à augmenter leur activité et les MMPs, notamment les collagénases et les gélatinases commencent alors à non seulement dégrader les fibres composant la MEC non détériorée mais à également détruire tout tissu en formation, endommageant le lit de la plaie et retardant la cicatrisation. La lésion se creuse alors de plus en plus, le recrutement cellulaire augmente faisant ainsi basculer la plaie du stade aigu au stade chronique.

Parmi les MMPs retrouvées dans les plaies chroniques, la plus représentée semble être la MMP9 ou Gelatinase B (<u>Lazaro</u> et al., *Journal of Wound Care*, 2016). La concentration de cette enzyme corrèle avec la sévérité de l'ulcération étudiée. A titre d'exemple, les plaies du pied diabétique présentent une concentration en MMP9 allant 0.37 à 2.90µg/ml, ces valeurs étant plus de deux fois supérieures aux concentrations trouvées dans les plaies en voie de guérison (<u>Liu</u> et al., *Diabetes Care*, 2009 ; <u>Li</u> et al., *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 2017).

Les plaies, qu'elles soient aiguës ou chroniques, présentent une multitude de facteurs pouvant influencer les processus de guérison. D'un point de vue physique, la plaie doit être protégée le plus possible de l'environnement extérieur. C'est le rôle premier du pansement, dispositif médical permettant une prise en charge de tous types de plaies.

Partie III - Le pansement : dispositif médical pour le traitement et la cicatrisation des plaies

3.1/Nature, classification et application des pansements

Le processus de cicatrisation étant un enchaînement de phases complexes, la plaie doit être maintenue dans un environnement optimal permanent. A ce titre, certaines conditions physico-chimiques telles que la température, le pH et le taux d'hydratation de la plaie doivent être respectées. Mais la fonction première du pansement reste la protection de la plaie contre l'environnement extérieur et le risque éventuel d'infection. Cette fonction de barrière était l'idée principale retrouvée au niveau des premiers pansements faits de bandelettes de tissus. Puis au fur et à mesure de l'évolution de la médecine, les pansements se sont vus attribuer des fonctions, comme par exemple avec les cataplasmes de miel antiseptiques de l'Égypte ancienne. Ces fonctions sont devenues dépendantes du type d'affection à traiter, se spécialisant de plus en plus au fil du temps. Aujourd'hui, il existe une grande quantité de pansements sur le marché, classés en différentes catégories suivant leurs spécificités ou le type de plaies à traiter. Dans ce domaine très compétitif, des pansements pour les plaies chroniques sont en perpétuel développement.

Mais à ce jour, la prise en charge des plaies chroniques reste encore un enjeu dans le domaine de la santé publique, notamment à cause de la complexité et de la diversité de celles-ci (Jones et al., Journal of the American Medical Association, 2018). Cependant, ses dernières années, une connaissance plus approfondie de la physiopathologie de ce type de plaie et un perfectionnement du matériel utilisable ont permis d'améliorer l'approche du personnel hospitalier face à des patients atteints de plaies chroniques à un stade souvent très avancé. En effet, comme décrit précédemment, les personnes atteintes de plaies chroniques sont souvent atteintes d'affections des membres périphériques de type artérite ou neuropathie et ne se rendent compte de la sévérité de leur cas que tardivement. L'action du personnel hospitalier doit alors être rapide et efficace pour éviter une éventuelle amputation. En ce sens, de nombreux dispositifs ont été créés pour permettre une prise en charge optimale suivant plusieurs critères de sélection. Lors du diagnostic de ce type de plaie, plusieurs signes cliniques sont pris en compte afin d'évaluer la sévérité de la plaie. Cette évaluation se fait à l'appréciation du professionnel de santé suivant des critères spécifiques comme par exemple ceux publiés dans le communiqué « Plaies chroniques prise en charge en ville » validé par la

Société Française et Francophone des Plaies et Cicatrisation en 2015. Parmi ces critères se trouvent l'étendue de la plaie, sa profondeur, l'étendue de l'inflammation, la présence de nécrose, la douleur et enfin la présence et le type d'écoulement au niveau de lit de la plaie. Ces nombreux facteurs permettent un diagnostic préliminaire dans l'élaboration d'un protocole de soin qui doit être spécifique à chaque patient suivant ses antécédents. Au fil du temps, les principes régissant la prise en charge des plaies chroniques ont évolué, passant du maintien de la plaie dans un environnement sec avec changement régulier de pansements au maintien de la plaie dans un environnement humide, favorisant ainsi les phénomènes d'absorption, la maîtrise des odeurs, le confort et surtout la cicatrisation par la création de pansements modernes pour chaque type de plaies.

L'utilisation des pansements est aujourd'hui finement réglementée par la classification des dispositifs médicaux (DM) suivant plusieurs critères. Parmi ceux-ci on retrouve la durée d'utilisation, le caractère invasif, le but thérapeutique ou diagnostique, le type d'organe concerné et enfin le niveau de risque de celui-ci. Le niveau de risque est déterminé par une classification des DM selon la Haute Autorité de Santé (HAS), allant de la classe I ou faible degré de risque à la classe III avec un potentiel de risque très sérieux. Ainsi, plus le dispositif médical est invasif et la pathologie à traiter sévère, plus le niveau de risque sera élevé.

Il existe donc plusieurs types de pansements aujourd'hui, allant de la simple gaze au pansement connecté en passant par le pansement actif, chacun possédant ses avantages et inconvénients mais ayant pour but commun d'amener la plaie sur la voie de la cicatrisation.

3.2/Dispositifs passifs permettant le maintien de la plaie

Généralement, le pansement est un dispositif médical dont le but premier est la constitution d'une barrière protectrice entre la plaie et l'environnement extérieur. Lorsque celui-ci est destiné à être posé directement au contact de la plaie et qu'il exerce donc une action immédiate sur celle-ci, il est appelé pansement primaire. Parmi les différents types de pansements primaires, on distingue les pansements traditionnels et les pansements modernes, ces derniers étant détaillés dans le paragraphe 3.3, *Dispositifs actifs pour le suivi ou la cicatrisation des plaies*.

Les pansements traditionnels ou pansements classiques sont, quant à eux, des pansements secs habituellement constitués d'une simple gaze de coton, stérile ou non, maintenue sur la

plaie à l'aide d'un dispositif adhésif. Ils sont considérés comme passifs car ils n'ajoutent rien au processus de guérison. Ces pansements sont faciles d'utilisation, très accessibles et peu onéreux. Outre ces avantages, ce type de pansement présente l'inconvénient majeur de perdre son efficacité très rapidement. En effet, lorsque celui-ci est saturé d'exsudats, il doit être impérativement changé. À ce titre, ces pansements sont généralement réservés à la prise en charge de plaies bénignes et ne sont pas adaptés au traitement des plaies chroniques (<u>Aerts</u> et al., *Soins de plaies*, 1997)

3.3/Dispositifs actifs pour le suivi ou la cicatrisation des plaies

3.3.1- Pansements bioactifs

Lors d'une blessure, le pansement optimal est généralement choisi après examen clinique de la plaie suivant certaines directives pouvant varier d'une plaie à l'autre. Par exemple, la plaie chronique doit être maintenue dans un environnement humide, minimisant ainsi le risque de frottements, d'irritations et d'infections, mais ne doit pas être trop humide pour éviter tout phénomène de macération. Ce maintien de l'environnement optimal est l'objectif principal des pansements bioactifs. Ces pansements particuliers sont généralement produits à partir de biomatériaux jouant un rôle important dans les processus de guérison. Ils sont connus pour être biocompatibles, biodégradables et non toxiques. Les pansements bioactifs sont dérivés de sources naturelles ou artificielles mais ayant une origine première naturelle telles que l'alginate (Aderibigbe et Buyana, Pharmaceutics, 2018), le collagène (Brett, Wounds, 2008), l'élastine (Kawabata et al., Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open, 2018), l'acide hyaluronique (Shimizu et al., Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2014) ou encore le chitosane (Liu et al., Royal Society of Chemistry Advances, 2018). Leur structure polymérique peut être utilisée seule ou en association avec des molécules spécifiques telles que des facteurs de croissance ou des agents antimicrobiens pour favoriser la cicatrisation. A titre d'information, ces pansements appartiennent à la catégorie des pansements interactifs pour plaies et brûlures suivant les recommandations de la FDA (Food and Drug Administration) des États-Unis.

3.3.1.1- Alginates

Les pansements à base d'alginate sont les pansements bioactifs les plus connus et sont actuellement utilisés dans le traitement de la plupart des plaies, aiguës ou chroniques, en

raison de leur biocompatibilité et de leurs propriétés non toxiques. L'alginate est un polymère extrait des algues brunes et est composé d'un enchaînement de deux monomères : l'acide manuronique ou manuronate, pouvant être acétylé et l'acide guluronique ou guluronate. Cet enchainement en β -1-4 permet la formation d'un co-polymère linéaire. Les pansements à base d'alginate se présentent généralement sous forme de mousses ou de fibres souples. Ils sont très utilisés en routine en raison de leur capacité à former des gels au contact d'exsudats de plaies, amenant ainsi des qualités d'absorption élevées utiles pour le traitement des plaies chroniques. Ce phénomène d'absorption est basé sur le caractère hydrophile du gel, réduisant ainsi les sécrétions de la plaie et minimisant la contamination bactérienne (Boateng et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008). La formation de ce gel à base d'alginate se produit par réticulation ionique ou par précipitation acide. Les ions calcium ou sodium présents à l'origine dans les fibres d'alginate sont échangés avec ceux présents dans les exsudats ou le sang pour former ce gel protecteur (Aderibigbe et Buyana, Pharmaceutics, 2018). Ce type de pansement est optimal dans le cas d'une plaie à exsudation modérée. Le fait que les fibres soient biodégradables est également utile pour les plaies chroniques car lors du changement de pansement, la plaie n'a pas besoin d'être nettoyée en profondeur, ne perturbant ainsi aucunement les tissus de granulation en formation. En contrepartie, ce type de pansement n'a aucun intérêt à être utilisé sur des plaies sèches ou avec des tissus nécrotiques durs car la présence d'humidité est nécessaire pour former leur structure en gel. Utiliser ce pansement dans ces conditions pourrait entraîner une sécheresse supplémentaire de la plaie, retardant ainsi le processus de cicatrisation.

Comme mentionné plus haut, le point fort du traitement des plaies chroniques est de trouver le bon équilibre permettant une cicatrisation optimale. Il existe actuellement de nombreux pansements à base d'alginate sur le marché, chacun ayant une application spécifique comme détaillé dans le tableau 3.

Nom commercial	Structure	Applications	Informations
Algostéril®	Alginate de calcium	Tous types d'ulcères	https://eurekasante.vidal.fr/parapharmaci e/vidal/produits-vinn0018- ALGOSTERIL.html Brothier
AlgiSite™	Alginate de calcium	Ulcères veineux et plaies du pied diabétique	https://eurekasante.vidal.fr/parapharmaci e/vidal/produits-id12547-ALGISITE-M.html Smith & Nephew, Inc.
Biatain®	Alginate de calcium	Tous types d'ulcères	https://eurekasante.vidal.fr/parapharmaci e/vidal/produits-id13743-BIATAIN- Alginate-pansement-et-meche.html Coloplast
Algivon®	Alginate de calcium + miel	Tous types d'ulcères	http://www.advancis.co.uk/products/activ on-manuka-honey/algivon Advancis Medical
Algicell®	Alginate de sodium + argent	Tous types d'ulcères sans saignement	https://www.woundsource.com/product/a lgicell-ag-antimicrobial-alginate-dressing Integra LifeSciences Corp.

Tableau 3: Exemples de pansements à base d'alginate (sources : Vidal, Advancis et Woundsource)

3.3.1.2- Collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante chez les mammifères, représentant environ 25% des protéines totales de l'organisme et 70 à 80% des protéines de la peau. Il existe 28 collagènes différents ayant tous un rôle d'échafaudage dans les tissus et présentant la même structure en triple hélice (<u>Bella</u>, *Biochemical Journal*, 2016). En raison de leur concentration élevée dans la matrice extracellulaire, les collagènes sont un élément clé dans la cicatrisation des plaies. En effet, les fibres de collagène apportent un soutien structural au lit de la plaie, permettant ainsi la migration des divers composants nécessaires à la cicatrisation des plaies. Cependant, dans les plaies chroniques, les fibres de collagène sont constamment dégradées par des enzymes telles que les métalloprotéases matricielles menaçant ainsi l'intégrité de cette matrice. Bien que moins fréquents que les pansements à base d'alginate, il existe néanmoins un certain nombre de pansements à base de collagène actuellement sur le marché. Ils se présentent sous différentes formes telles que des gels, des polymères tissés ou encore,

comme pour les alginates, en combinaison avec des molécules cicatrisantes telles que l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA). Le collagène contenu dans ces pansements provient généralement de sources diverses pouvant être bovine, équine, aviaire ou porcine. En raison de son origine, le collagène collecté à partir de sources animales est purifié avant toute utilisation dans les pansements (<u>Brett</u>, *Wounds*, 2008).

Les pansements à base de collagène ont pour objectif principal la reconstruction et l'organisation de la matrice extracellulaire au niveau du lit de la plaie par la création d'un environnement optimal permettant au processus de guérison de suivre son cours. En effet, la matrice de collagène, avec ses propriétés chimiotactiques, va recruter des cellules spécifiques dans le lit de la plaie. Parmi ces cellules on retrouve les fibroblastes, connus pour produire des fibres de collagène. Ces réseaux de collagène sont également utiles pour l'inhibition des métalloprotéases matricielles environnantes. Les MMPs présentes dans le lit de la plaie vont être attirées par les fibres de pansement, ce qui permettra à l'ECM de se développer correctement. Parallèlement à ce phénomène, les pansements au collagène ont également la capacité de maintenir une certaine humidité tout en absorbant les exsudats. Cette double fonction est optimale dans le cas de plaies chroniques à exsudation modérée. Enfin, ces pansements ont la particularité d'être faciles à appliquer et à enlever, tout en restant confortable pour le patient (<u>Eleck et Simman</u>, *Journal of the American College of Certified Wound Specialists*, 2010). Il existe plusieurs pansements à base de collagène sur le marché, comme détaillé dans le tableau 4.

Nom commercial	Structure	Applications	Informations
Puracol [®] Plus	Maillage de		https://www.woundsource.com/produc
MicroScaffold [™]	collagène natif en	Tous types d'ulcères	t/puracol-plus-microscaffold-collagen
Collagen	3D		Medline Industries, Inc.
Biopad™	Matrice de		https://www.woundsource.com/produc
	collagène de type	Tous types d'ulcères	t/biopad
	I		Angelini Pharma Inc.
	Matrice de		http://www.woundsource.com/product
DermaCol [™]	collagène + EDTA	Tous types d'ulcères	/dermacol-collagen-matrix-dressing
			DermaRite Industries, LLC

 Tableau 4: Exemples de pansements à base de collagène (source : Woundsource)

3.3.1.3- Elastine

L'élastine, tout comme le collagène, est une protéine structurale participant à la composition de la matrice extracellulaire et représentant environ 2% du poids sec de la peau. Physiologiquement, les fibres d'élastine se regroupent afin de former des structures en forme de spirale jouant un rôle prépondérant dans l'élasticité de la peau (Bryant et Nix, Acute and Chronic Wounds: Current Management Concepts, 2016). Ces fibres sont dégradées par l'élastase, enzyme sécrétée par les macrophages et les fibroblastes. La dégradation de l'élastine peut survenir pendant la cicatrisation de plaies lors de la formation du tissu cicatriciel ou encore dans les phénomènes de vieillissement de la peau. Dans le cas des plaies chroniques, étant donné que les macrophages et les fibroblastes sont présents à des concentrations élevées dans le lit de la plaie, il a été supposé que l'élastase est surexprimée, dégradant ainsi constamment les fibres d'élastine en formation. Ce phénomène participant à la dégradation de la matrice extracellulaire est donc en partie responsable du retard de cicatrisation de ce type de plaie (Schultz et Wysocki, Wound Repair and Regeneration, 2009). Les matrices d'élastine sont actuellement en cours d'étude pour la formation de pansements de type hydrogel, avec par exemple l'utilisation d'élastine d'origine bovine pour la formation d'un hydrogel poreux par Annabi et al. (Annabi et al., Biomaterials, 2009). Cet hydrogel va attirer l'élastase par chimiotactisme, cette enzyme participant à la dégradation du réseau d'élastine du pansement, permettant ainsi la reconstruction de la matrice extracellulaire et la cicatrisation de la plaie. Les travaux de Kawabata et al. (Kawabata, Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open, 2018) sont également prometteurs avec l'élaboration d'hydrogels de type « *Silk-elastin* » où un polymère est utilisé pour accélérer les phénomènes de cicatrisation. Enfin, Silva et al. (Silva et al., Biological Macromolecules, 2018) présentent une matrice de type hydrogel élaborée à base d'élastine et d'alginate. Ces nombreux développements ont pour but premier de permettre de régénérer une matrice extracellulaire fonctionnelle au niveau du lit de la plaie afin de reprendre un processus de cicatrisation classique.

3.3.1.4- Acide hyaluronique

L'acide hyaluronique, également appelé hyaluronane, est un polysaccharide d'origine naturelle appartenant à la famille des glycosaminoglycanes. Il est composé de deux sucres, l'acide D-glucuronique et la D-N-acétylglucosamine, liés suivant des liaisons glycosidiques spécifiques et disposés suivant une structure conservée au cours de l'évolution, indiquant

ainsi une importance biologique majeure (Price et al., American Journal of clinical dermatology, 2005). La plupart des cellules du corps peuvent potentiellement synthétiser cette molécule à un moment donné de leur cycle, renforçant ainsi son importance dans les phénomènes biologiques fondamentaux. En conditions physiologiques, l'acide hyaluronique existe sous la forme de hyaluronate de sodium et a été identifié comme composant majeur de la matrice extracellulaire. Cette molécule se trouve le plus souvent dans le liquide synovial qui entoure les articulations, permettant ainsi l'augmentation de la viscosité de celui-ci. On le retrouve également dans le cartilage et les tissus de type élastiques. Au niveau de la peau, il est présent au niveau des espaces intercellulaires où il participe à l'hydratation et la cohésion des tissus environnants. Il joue un rôle majeur dans le processus de guérison en raison de ses propriétés hygroscopiques, rhéologiques et viscoélastiques (Chen et Abantangelo, Wound Repair and Regeneration, 2002). Il existe deux types d'acides hyaluroniques, l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire (HMW-HA) d'une longueur de plus de 25 disaccharides qui contribue à la cicatrisation des plaies en maintenant un environnement optimal à celle-ci (Shimizu, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2014) et l'acide hyaluronique de faible poids moléculaire, comportant 4 à 25 disaccharides, qui quant à lui induit des phénomènes d'angiogenèse (West et al., Science, 1985). En raison de ces propriétés, l'acide hyaluronique et ses dérivés ont été largement utilisés au cours des deux dernières décennies pour une variété de dispositifs médicaux avec deux exemples proposés par le laboratoire Genevrier : lalusetcare[®] Protect, un pansement composé d'une compresse absorbante avec une grille de polyester imprégnée d'acide hyaluronique, silicone et carboxyméthylcellulose (https://eurekasante.vidal.fr/parapharmacie/vidal/produitsid15238n0-IALUSETCARE-PROTECT-Pansement-protecteur-adhesif.html), ou encore laluset® crème, à base d'acide hyaluronique utilisée pour l'hydratation des tissus endommagés en complément de compresses stériles (https://eurekasante.vidal.fr/parapharmacie/vidal/produits-id1188-IALUSET-compresseimpregnee-sterile-et-creme.html).

3.3.1.5- Chitosane

Le chitosane est un polymère non toxique, biodégradable et biocompatible composé de glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine liés par des liaisons glycosidiques de type β (1-4) (<u>Aytekin</u> et al., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011). Il peut être obtenu par

désacétylation partielle de la chitine, polymère naturel présent dans la carapace de certains mollusques ou insectes ou encore dans certains champignons macroscopiques et levures. Le terme chitosane est utilisé pour décrire des polymères ayant des poids moléculaires variant de 50 à 2000 kDa et un degré de désacétylation compris entre 40 et 98% (Ilium, Pharmaceutical Research, 1998). Ce polysaccharide est largement utilisé dans plusieurs domaines de nos jours, notamment dans l'agriculture pour améliorer les défenses des plantes, dans l'industrie en tant que colle biosourcée, ou encore dans le traitement des eaux usées pour sa facilité à complexer des métaux lourds. Outre ces utilisations, le chitosane présente également un intérêt majeur dans le domaine de la santé grâce à ses propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et antitumorales. Ces propriétés diverses sont principalement dues à une variabilité de composition. En effet, il a été montré que les propriétés de ce polymère varient en fonction de sa longueur et du pourcentage de désacétylation qu'il présente (Aranaz et al., Current Chemical Biology, 2009). Récemment, le chitosane a également été étudié pour son implication dans les phénomènes de régénération de la peau, plus précisément pour la cicatrisation des plaies chroniques. En raison de la biocompatibilité de ce polymère, il existe de nombreux projets utilisant le chitosane pour la fabrication d'hydrogels servant de matrice extracellulaire synthétique dans le lit de la plaie. L'objectif de ce type de pansement est de créer un environnement optimal pour la migration cellulaire et le renouvellement de la MEC (Chi Fai Cheung et al., Marine Drugs, 2015). Actuellement sur le marché se trouvent Tegasorb® 3M, un gel à base de chitosane qui gonfle tout en absorbant les exsudats, ou encore Chitopack C[®] Eissai, qui présente une structure polymérique à base de chitosane semblable au coton permettant la régénération tissulaire (Niekraszewicz, Fibres & Textiles in Eastern Europe, 2005; Liu et al., Royal Society of Chemistry Advances, 2018).

3.3.2- Pansements en voie de développement : pansements intelligents

Ces dernières décennies ont été rythmées par un boom technologique où nous avons pu assister à la création de plusieurs objets connectés, avec l'exemple de l'ordinateur ou des téléphones portables. Dans cette nouvelle ère numérique où tout est « connectable », plusieurs projets de recherche ont été lancés sur des pansements dits « intelligents » permettant une accessibilité facile à des données précises pour le suivi et la cicatrisation de nombreuses plaies. Ces nouvelles techniques de prise en charge des plaies sont en constant développement pour être toujours plus précises et perfectionnées. La genèse des dispositifs intelligents pour les plaies chroniques a d'abord commencé avec la thérapie par pression négative permettant de placer la plaie sous une pression inférieure à la pression atmosphérique ambiante. Ce dispositif, apparu en France en 1997 est divisé en deux parties avec d'abord le « pansement », où une mousse va être déposée au niveau du lit de la plaie puis recouverte d'un film polyuréthane possédant un port d'aspiration. Ce pansement va ensuite être relié à un système de pompe ainsi qu'à un système de recueil des exsudats (<u>Téot</u>, Soins, 2015). Outre ce système, pionnier dans le domaine des dispositifs intelligents, de nombreux projets ont vu le jour ces dernières années, que ce soit pour le suivi ou la cicatrisation des plaies. Ces différents dispositifs se basent tous sur le même modèle, où un système composé d'un Élément de Reconnaissance Biologique (ERB) va interagir avec l'analyte à étudier. Cet ERB va être couplé à un transducteur pouvant être optique, électrochimique, ampérométrique ou piézoélectrique, qui traduit la réponse biologique en un signal électrique mesurable. Différents éléments sont intéressants à prendre en compte dans le suivi des plaies chroniques. Comme discuté dans la partie 1.3.3, *Physiopathologie des plaies* chroniques, il existe plusieurs facteurs amenant la chronicité de la plaie. Le manque d'informations précises sur ces facteurs est l'élément clé dans le développement de nombreux systèmes intelligents. Ces facteurs peuvent être séparés en deux catégories, avec d'abord les facteurs physiques tels que le pH, la température et l'humidité ou encore les facteurs biochimiques comprenant l'oxygénation des plaies, la flore bactérienne, ainsi que les variations de concentration de molécules témoins de l'inflammation telles que l'acide urique, le TNFα ou encore les métalloprotéases matricielles.

3.3.2.1- Suivi des plaies chroniques : facteurs physiques

a) pH

Il existe plusieurs projets en voie de développement se basant sur les mesures de pH pour le suivi des plaies chroniques. En effet, comme expliqué précédemment (paragraphe 1.3.3, *Physiopathologie des plaies chroniques*), lorsqu'une plaie ouverte est exposée au milieu extérieur, des variations de pH apparaissent et peuvent jouer un rôle délétère dans les processus de cicatrisation. Pour reprendre les valeurs citées auparavant, les plaies présentant des difficultés de cicatrisation voient leur pH varier de 7.15 à 8.9 (<u>Tsukada</u> et al., *Wounds* 1992 ; <u>Wilson</u> et al., *European Journal of Vascular Medicine*, 1979). La plupart des systèmes

en voie de développement se basent généralement sur une variation colorimétrique ou utilisent la fluorescence afin de mesurer le pH. Les valeurs obtenues sont ainsi comparées à une gamme existante, où une variation de couleur est synonyme d'un changement de pH au niveau du lit de la plaie.

Tamayol et al., (<u>Tamayol</u> et al., *Advanced Healthcare Materials*, 2016) ont mis au point un patch composé de fibres d'alginates intégrant des nanoparticules de silices chargées en *Brilliant Yellow dye*, colorant sensible aux variations de pH 6.4 à pH 8. L'intégration des nanoparticules au sein des fibres amène une biocompatibilité du pansement puisqu'il ne présente aucun relargage dans le lit de la plaie. La lecture des variations de pH est simple, puisqu'elle se base sur un examen visuel des variations colorimétriques du patch. Ainsi, ce système peut être utilisé seul ou incorporé à un système de pansement connecté plus complexe pour un suivi de facteurs multiples au niveau de la plaie.

Kassal et al., (<u>Kassal</u> et al., *Sensors and Actuators B : Chemical*, 2017) présentent un système similaire où un indicateur coloré est incorporé cette fois ci à un pansement existant. En revanche, la lecture des variations de pH au niveau de la plaie se fait quant à elle par un système RFID (*Radio Frequency IDentification*) permettant une précision supplémentaire. Ce système permet donc une mesure des variations de pH autonome avec transfert des données directement sur un appareil électronique (ordinateur ou téléphone). L'indicateur de pH utilisé est le 4-[4-(2-hydroxyethanesulfonyl)-phenylazo]-2,6-dimethoxyphenol et permet d'observer des variations de pH sur une gamme allant de 4 à 12. Le système sans fil est basé sur un système opto-électronique et permet la conversion de photons en charge électrique. Le système complet possède une plage de fonctionnement allant de pH 6 à 9, gamme en corrélation avec les variations de pH observées chez les personnes atteintes de plaies chroniques.

Outre ces systèmes colorimétriques, McLister et Davis (<u>McLister et Davis</u>, *Healthcare*, 2015), se basent quant à eux sur un polymère de L-Tryptophane incorporé dans des fibres de carbone afin d'étudier les variations de pH des plaies chroniques. Ce système conducteur se base sur l'oxydation du polymère et la formation de quinones, amenant ainsi une réponse mesurable par voltamétrie. Des tests préliminaires ont montré que ce système présente une variation linéaire sur une gamme de pH allant de 3 à 8 et est donc utilisable sur le lit de plaies chroniques.

Enfin, Salvo et al., (<u>Salvo</u> et al., *International Journal of Nanomedicine*, 2017), présentent un système permettant un suivi à la fois du pH mais aussi de la température. Le capteur de pH est composé d'une couche d'oxyde de graphène dont les variations de potentiel électrique sont à corréler avec les variations de pH. Ainsi, une concentration de 4mg/ml en oxyde de graphène permet des mesures de pH allant de 5.5 à 9 avec une sensibilité d'environ 43mV par unité de pH.

b) Température

La température est un facteur important à prendre en compte dans le suivi des plaies chroniques. En effet, une hausse de température au niveau du lit de la plaie peut être synonyme d'une éventuelle infection et donc d'un retard de cicatrisation. Outre les systèmes de thermomètres conventionnels déjà présents sur le marché, plusieurs projets de pansements connectés avec lecture de température ont été publiés ces dernières années. Parmi eux, Matzeu et al., (Matzeu et al., *IECON 2011-37th Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society*, 2011) présentent un capteur composé de nanotubes de carbone pour le développement d'un film conducteur relié à un système RFID pour la lecture en temps réel de la température au niveau du lit de la plaie. Ce système présente une résolution de 0.2°C et a été calibré sur des tranches de température allant de 25 à 60°C.

Salvo et al., (<u>Salvo</u> et al., *International Journal of Nanomedicine*, 2017) proposent un système double avec un capteur de température et un capteur de pH (voir paragraphe 3.3.2.1.a), *pH*). Le capteur de température est là aussi composé de nanotubes de carbone mais celui-ci est intégré dans un polymère dérivé du polystyrène. Les variations de résistance de ce capteur sont à corréler avec les variations de température. Ainsi, le système présente une variation linéaire sur des tranches de température allant de 25 à 50°C avec une résolution de 0.08°C.

Enfin, Hattori et al., (<u>Hattori</u> et al., *Advanced Healthcare Materials*, 2014) présentent quant à eux un capteur composé d'une structure en silicone enfermant un système électronique appelé EES (*Epidermal Electronics System*). Ce système flexible et réutilisable se base également sur les variations de résistance pour évaluer la température au niveau de la peau. Ainsi, il présente un système linéaire similaire à Salvo et al. sur des variations de température allant de 25 à 50°C.

c) Humidité

L'humidité joue un rôle clé dans la cicatrisation des plaies, une plaie en voie de cicatrisation ayant besoin d'un environnement humide pour le bon fonctionnement des cellules réparatrices. En revanche, un excès d'humidité peut être délétère pour celle-ci, une macération des tissus favorisant le risque d'infections (paragraphe 1.3.3, *Physiopathologie des plaies chroniques*). Comme expliqué précédemment (paragraphe 3.1, *Nature, classification et applications des pansements*), les préconisations en matière de pansement ont évolué au fil du temps, passant du maintien des plaies dans un environnement sec avec application de gazes pour « sécher » le lit de la plaie au maintien de la plaie dans un environnement humide avec la création de pansements modernes augmentant le confort et la cicatrisation de cellesci. À ce titre, plusieurs projets de pansements intelligent intégrant des capteurs d'humidité ont vu le jour ces dernières années, leur but étant une analyse de l'environnement optimal nécessaire à la cicatrisation avec changement de pansement lorsqu'une saturation est atteinte.

Milne et al., (Milne et al., International Wound Journal, 2016) ont réalisé une étude sur l'effet de l'ajout d'un capteur d'humidité commercial (WoundSense, Ohmedics Ltd UK) sur le suivi de la cicatrisation de plaies chroniques chez 30 patients. Ce capteur permet d'observer la saturation du pansement, optimisant ainsi son changement. Il permet donc à la fois de maintenir une humidité optimale au niveau du lit de la plaie mais aussi de réduire éventuellement les coûts associés à des changements parfois non nécessaires de pansement ; diminuant à la fois les coûts matériels et le temps de personnel médical dédié. Le fonctionnement de ce capteur repose sur une mesure d'impédance qui est ensuite traduite en pourcentage d'humidité présente au niveau du lit de la plaie saturée. Les résultats montrent que 44,9% des 588 pansements utilisés durant cette étude étaient en conditions optimales pour un changement. Ce chiffre est relativement faible et dénonce donc une fréquence de changement trop importante des pansements en milieu hospitalier.

Plus récemment, Du et Ciou (<u>Du et Ciou</u>, *IEEE Access*, 2019) ont développé une gaze intégrant à la fois un capteur de pH et un capteur d'humidité. Le capteur d'humidité repose sur le même principe que celui utilisé par Milne et al., à savoir une mesure d'impédance. Il est constitué de

cuivre et présente une détection d'humidité de l'ordre de 0.06%/mV avec un temps de réponse de 0.1 seconde.

3.3.2.2- Suivi des plaies chroniques : facteurs biochimiques

Outre les facteurs physiques développés précédemment, plusieurs projets de pansements connectés développés ces dernières années se basent sur le suivi de concentration de marqueurs d'inflammation précis. Ces systèmes permettent généralement une mesure en temps réel de ces facteurs et à ce titre, s'adressent à des types de plaies particuliers, chaque type de plaie présentant des facteurs différents. Par exemple les plaies du pied diabétique présentent une forte concentration en MMP9, ce qui n'est pas forcément le cas pour les escarres ou les ulcères de jambe (Li et al., *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 2017).

a) Oxygénation des plaies

Comme expliqué dans le paragraphe 1.3.3, *Physiopathologie des plaies chroniques*, l'hypoxie tissulaire joue un rôle prépondérant dans la chronicité des plaies. Celle-ci est définie comme une diminution du taux d'oxygène pouvant être due soit à une diminution des apports en oxygène ou alors à une consommation accrue d'oxygène au niveau du lit de la plaie. Ce facteur a été au centre du développement de nombreux biocapteurs ces dernières années. Ces capteurs reposent la plupart du temps sur le même modèle avec une corrélation entre le passage d'un courant entre deux électrodes et la concentration en oxygène. A titre d'exemple, Mostafalu et al., (Mostafalu et al., IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems, 2015) ont développé un capteur galvanique permettant la mesure du taux d'oxygène intégré à un pansement connecté. Celui-ci est composé de parylène sur lequel des électrodes d'argent et de zinc sont installées. Entre les deux électrodes se trouve une solution d'oxyde de potassium, jouant le rôle d'électrolyte. Le tout est ensuite recouvert d'une fine couche de polydiméthylsiloxane. La conversion de signal se fait grâce à un système d'amplification à transimpédance et est envoyé à un système de transmission sans fil. Ainsi, le courant mesuré peut être corrélé à la concentration en oxygène de la plaie, le capteur présentant une variation linéaire de courant suivant une saturation en oxygène allant de 0 à 30%.

b) Flore bactérienne

Les plaies chroniques étant en retard de cicatrisation avec une phase inflammatoire prolongée présentent un risque accru d'infection bactérienne. Plusieurs biocapteurs ont été développés afin de détecter la présence de certaines souches bactériennes au niveau de ces plaies. Parmi eux, Chan et al., (<u>Chan</u> et al., *Journal of the American Chemical Society*, 2001, <u>Whelan</u>, *Drug Discovery Today*, 2002) ont proposé un pansement intelligent permettant de mettre en évidence la présence de bactéries grâce à la colorimétrie. Ce système est composé d'un biocapteur à base de silicone poreux sur lequel est greffé une molécule spécifique, le tertryptophan ter-cyclo pentane (TWTCP). Cette molécule possède une grande affinité pour le lipide A, composant responsable de la toxicité du lipopolysaccharide des bactéries Gram négatif. Lorsque ces deux molécules se lient, l'indice de réfraction du silicone change et amène un décalage de la longueur d'onde d'émission de 3 à 4nm suivant la souche bactérienne étudiée (photoluminescence). Cette variation de couleur permet donc un diagnostic de la charge bactérienne de la plaie.

Thet et al., (<u>Thet</u> et al., *American Chemical Society : Applied Materials & Interfaces*, 2016) proposent quant à eux un système basé sur l'apparition de fluorescence lorsque le pansement est en contact avec des biofilms infectieux. Le pansement est composé d'un film d'agarose où des particules lipidiques contenant un fluorophore, la 5,6-Carboxyfluoroscéine sont incorporées. Lorsque les particules sont en contact avec une souche bactérienne de type Pseudonomas aeruginosa ou Staphyloccus aureus, celles-ci se dissolvent et libèrent le fluorophore. Ainsi, l'intensité de fluorescence mesurée en unités arbitraires obtenue lors du contact avec ses souches bactériennes est environ 30000 fois plus élevée que le contrôle négatif.

c) Acide urique

Le suivi du taux d'acide urique est un facteur important à prendre en compte pour la cicatrisation des plaies chroniques (<u>Fernandez</u> et al., *International Wound Journal*, 2012). Plusieurs dispositifs intelligents ont été développés pour le suivi de cette molécule. Parmi eux, Kassal et al., (<u>Kassal</u> et al., *Electrochemistry Communications*, 2015) proposent un système ampérométrique où une enzyme, l'uricase est immobilisée sur une électrode. Ce biocapteur est ensuite connecté à un système RFID permettant une transmission de données sans fil. Ainsi, une mesure de la concentration en acide urique est possible. Le biocapteur a montré

des résultats satisfaisants en solution contrôle mais présente une diminution de signal de 3 à 10% en conditions complexes, montrant ainsi des interférences suivant l'environnement utilisé.

d) TNF α

Le TNF α (*Tumor Necrosis Factor* α) est l'un des nombreux facteurs moléculaires intervenant dans la chronicité des plaies. Physiologiquement, cette molécule est une cytokine impliquée dans le phénomène d'inflammation. Chez les personnes atteintes de plaies chroniques, le taux de TNF α est élevé et est une des causes des signes cardinaux de l'inflammation, à savoir une sensation de chaleur, une apparition d'érythème, d'œdème et une augmentation de la douleur. Rajeev et al., (<u>Rajeev</u> et al., *Sensors and Actuators B : Chemical*, 2018) proposent un biocapteur optique à base d'alumine poreuse où un anticorps anti-TNF α y est fonctionnalisé via l'intermédiaire d'un silane. La fixation de TNF α sur l'anticorps amène un changement au niveau de la surface mesurable de manière optique. La limite de détection pour ce biocapteur est de l'ordre de 0,13µg/ml en tests en conditions simples ou en mélange complexe. Ce seuil, bien que faible est cependant supérieur aux valeurs citées dans la littérature, qui sont de l'ordre de 2000pg/ml (<u>Wallace et Stacey</u>, *The Journal of Investigative Dermatology*, 1998).

e) Metalloprotéases matricielles

Comme expliqué précédemment (paragraphe 2.6.2, *Les MMPs dans les plaies chroniques*) les métalloprotéases matricielles jouent un rôle prépondérant dans l'inflammation prolongée des plaies chroniques. En effet, elles empêchent la construction d'une MEC provisoire essentielle à la cicatrisation. La détection de métalloprotéases matricielles se fait généralement via des tests ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), où un ERB spécifique est utilisé afin de capter l'analyte à étudier qui est observé via la lecture de densité optique.

Milne et al., (<u>Milne</u> et al., *Proceedings of the 2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 2014) ont développé un biocapteur capable de détecter le pH, l'humidité ainsi que le taux de métalloprotéase au niveau du lit de la plaie. La partie permettant la mesure du taux de MMP9 se base sur la méthode de l'ELISA en sandwich comme expliqué au-dessus. Ce concept permet de détecter des concentrations en MMP9 variant de 0.1 à 100ng/ml.

Biela et al., (<u>Biela</u> et al., *Biosensors and Bioelectronics*, 2015) proposent eux aussi un capteur permettant la mesure du taux de MMP9 où des électrodes en or sont fonctionnalisées avec un peptide clivable par cette enzyme. Le film ainsi créé se dégrade lorsqu'il est exposé à un milieu contenant de la MMP9. La présence de MMP9 est ensuite détectée par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE). Ces analyses ont montré un seuil de détection de l'ordre de 200ng/ml.

Les seuils présentés précédemment sont corrects, puisque pour rappel, les concentrations de MMP9 retrouvées dans la littérature pour des patients atteints de plaies du pied diabétique varient de 0.37 à 2.90µg/ml (Liu et al., *Diabetes Care*, 2009 ; Li et al., *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 2017).

Objectif de mon projet de thèse

L'intitulé de ma thèse, « développement d'un pansement intelligent par détection de métalloprotéases » suppose un projet vaste et ambitieux mais également assez large. Comme pour toute nouvelle étude de développement, une phase de recherche bibliographique préalable a été nécessaire avant de débuter ce travail. Ce sujet, dans sa globalité, est un projet pluridisciplinaire, où biologie, chimie et électronique se rencontrent pour former un système fonctionnel, efficace et économique pouvant permettre une utilisation en milieu hospitalier. Les enjeux sont donc multiples, faisant ainsi remonter plusieurs questions scientifiques, notamment sur le type de plaie chronique visée, la cible moléculaire du pansement, ou encore son fonctionnement.

Comme discuté dans le paragraphe 1.3, *Les plaies chroniques : renouvellement cutané compromis*, une plaie chronique est caractérisée comme ne présentant aucun signe de cicatrisation au bout de 4 à 6 semaines d'observation. Leur état inflammatoire généralisé et les difficultés de traitement associées font de ces plaies une cible de choix pour le développent d'un système intelligent.

Les mécanismes moléculaires régissant les plaies chroniques peuvent différer d'une plaie à l'autre, d'où la nécessité de choisir un type de plaie pour le projet. De par sa prévalence (25% chez les personnes atteintes de diabète de type II), et sa gravité (taux d'amputation de 85%), c'est finalement la plaie du pied diabétique qui a été sélectionnée pour l'élaboration du pansement intelligent (paragraphe 1.3.2.3, *Les plaies du pied diabétique*).

Ce projet se basant sur un système permettant un suivi de métalloprotéases, il nous a fallu trouver la métalloprotéase la plus pertinente pour une étude de plaies du pied diabétique. Parmi les MMPs les plus communément étudiées pour leur potentiel rôle dans la chronicité de ces plaies se trouvent les collagénases et les gélatinases (<u>Rayment</u> et al., *British Journal of Dermatology*, 2008, <u>Yager et Nwomeh</u>, *Wound Repair and Regeneration*, 1999) respectivement responsables de la dégradation du collagène, composant essentiel de la MEC et de la gélatine, issue de l'hydrolyse partielle des fibres de collagène. Chez les patients atteints de plaies du pied diabétique, l'enzyme la plus représentée semble être la MMP9 ou Gélatinase B (<u>Lazaro</u> et al., *Journal of Wound Care*, 2016) avec une concentration de l'ordre du µg/ml retrouvée dans les exsudats analysés via ELISA (<u>Liu</u> et al., *Diabetes Care*, 2009 ; <u>Li</u> et al., *The International Jounal of Lower Extremity Wounds*, 2017).

Le système développé pendant ma thèse repose donc sur l'élaboration d'un biocapteur capable de venir capter la cible MMP9 au sein des exsudats de plaie du pied diabétique, permettant ainsi la mesure en temps réel de la concentration de cette enzyme et une corrélation avec une éventuelle cicatrisation.

Il existe plusieurs prérequis lors de l'élaboration d'un pansement intelligent pour le suivi ou le diagnostic des plaies tels que la biocompatibilité du capteur, la flexibilité, la facilité d'utilisation, la sensibilité et le coût. Pour ce projet, nous avons utilisé un capteur capacitif composé d'alumine poreuse fonctionnalisé par un ERB possédant une affinité pour la cible MMP9.



Figure 7: Méthode d'utilisation d'un pansement intelligent.

Légende : (i) structure adhésive contenant la partie RFID (antenne + puce) et permettant le maintien du pansement sur la plaie, (ii) biocapteur capacitif greffé avec l'ERB spécifique pour la cible MMP9 et couplé à la partie RFID, (iii) gaze permettant aux exsudats de plaies (iv) de remontrer jusqu'au capteur, celui-ci n'étant pas en contact direct avec le lit de la plaie. Les informations sont collectées via un système informatique (v) permettant l'acquisition de données au cours du temps sur l'éventuelle cicatrisation de la plaie.

Le système de pansement intelligent se compose de deux parties distinctes. Une première partie dite de « communication » avec l'antenne et la puce RFID et une seconde partie comportant le biocapteur qui se présente sous une forme diélectrique capacitive biofonctionnalisée comme présenté sur la figure 8.



Figure 8: Schéma explicatif de couplage RFID

Pour atteindre l'élaboration de ce dispositif novateur, plusieurs parties distinctes ont été développées dans mon projet avec (i) la recherche de l'ERB spécifique pour la cible MMP9, (ii) la réalisation d'une preuve de concept par l'immobilisation de l'ERB sur le support flexible poreux (alumine poreuse) et enfin (iii) la mise en forme d'un prototype de capteur capacitif pour une utilisation sur des matrices biologiques.



Figure 9: Représentation des différentes étapes nécessaires pour la mise en place d'un pansement connecté basé sur la détection de MMP9 dans les plaies du pied diabétique

L'objectif final de mes travaux est donc d'obtenir une preuve de concept avec un système petit, fiable et permettant une lecture directe de la concentration sans passer par des expériences ELISA (<u>Milne</u> et al., *Proceedings of the 2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 2014), mais en gardant une précision de mesure de l'ordre de la centaine de ng/ml afin de pouvoir être le plus précis possible dans le suivi de la cicatrisation de ces plaies.

Chapitre 2-Matériels et Méthodes.

Partie I – Production et caractérisation de la MMP9 humaine recombinante

1.1/Construction d'un baculovirus recombinant

Ce travail ayant été réalisé dans l'unité CNRS Baculovirus et Thérapie par Thomas Janson, stagiaire en Licence 3 de l'Université de Nîmes, je ne présenterai ici que les grandes étapes qui ont permis la génération du baculovirus recombinant exprimant la MMP9.

Le principe de cette technologie est d'intégrer le gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur très actif au niveau transcriptionnel dans une région du génome viral non essentielle à la réplication du virus. Cette insertion est réalisée par recombinaison homologue entre un plasmide appelé vecteur de transfert et de l'ADN viral. Le vecteur de transfert est un plasmide qui contient (i) une cassette d'expression composée d'un promoteur fort et de deux sites de restriction en aval de celui-ci pour le clonage du gène d'intérêt et (ii) de part et d'autre de cette cassette des régions flanquantes virales qui permettront une recombinaison homologue dans une région spécifique et non essentielle du génome viral, comme présenté sur la figure ci-dessous.



Figure 10: Génération d'un baculovirus recombinant : Intégration du gène d'intérêt par recombinaison homologue entre l'ADN viral (Bacmid) et le vecteur de transfert contenant le gène d'intérêt (ici, gène MMP9). Les régions flanquantes ciblent la recombinaison homologue.

La technologie originale développée par l'unité CNRS (brevet PCT/FR2017/052191) permet l'intégration de plusieurs gènes d'intérêt *simultanément* dans un seul génome viral. Cette approche met en jeu un génome viral modifié qui contient une origine de réplication bactérienne lui permettant d'être répliqué dans une bactérie. Cet ADN porte alors le nom de bacmide. D'autre part, des gènes essentiels à la réplication du virus en cellules d'insectes adjacents à des gènes non essentiels cibles de la recombinaison homologue ont été éliminés pour rendre cet ADN non infectieux. Ainsi, comme le montre le schéma ci-dessus, pour qu'un ADN de baculovirus puisse générer un baculovirus infectieux, il faut qu'il recombine obligatoirement avec le vecteur de transfert correspondant pour récupérer une copie fonctionnelle du gène essentiel qui a été éliminé dans le bacmide. Cette technique permet alors d'avoir 100% de virus recombinants.

Le gène codant la MMP9 a été inséré dans la région Chit/Cath du baculovirus codant deux enzymes non essentielles à la réplication virale, une *cathepsine-like* et une chitinase.

Trois clones viraux, D4051, D4052 et D4056 ont été isolés par la technique des plages de lyse, amplifiés et caractérisés par zymographie (paragraphe 1.3.2, *Analyse de l'activité enzymatique par zymographie sur gel*) et Western-Blot (paragraphe 1.3.3, *Détection et identification par Western Blot*).

1.2/Production et purification de la MMP9 recombinante

Des cellules Sf9 adaptées à la croissance en milieu dépourvu de sérum ont été ensemencées dans des bouteilles roulantes avec 200ml de cellules à une densité de 1x10⁶ cellules/ml. Les cellules sont ensuite infectées avec le clone D4056 isolé ci-dessus exprimant la MMP9 humaine à une multiplicité d'infection de 2 PFU/cellule. Après trois jours d'incubation à 28°C, le surnageant de culture est récolté après centrifugation à 1730 x g pendant 10 minutes à 4°C (Centrifugeuse Beckman Allegra 64r, rotor : C0650, facteur k : 2,964).

La MMP9 a été purifiée en deux étapes directement à partir du surnageant filtré préalablement sur membrane 0.22µm pour éliminer tous les débris cellulaires.

1.2.1- Purification sur colonne de ConA

Du Tris, NaCl, MnCl₂ et CaCl₂ sont ajoutés au surnageant de culture de manière à obtenir les concentrations suivantes : Tris-HCl 20mM pH 7.1 (ajustement de pH avec HCl), NaCl 500mM,

MnCl₂ 1mM, CaCl₂ 1mM. La préparation est alors déposée sur une colonne de Concanavaline A (GE HealthCare, 17-0440-01). L'élution est réalisée avec le tampon ci-dessus contenant 200 mM de Methyl α -D-mannopyranoside (Sigma, M6882).

1.2.2- Purification sur colonne NiNTA (HisTrap, GE HealthCare, 175255-01)

La fraction éluée contenant les glycoprotéines est directement déposée sur une colonne HisTrap préalablement équilibrée en tampon phosphate Na 20mM pH 7, NaCl 500mM. L'élution des protéines est réalisée en deux temps avec d'abord une élution avec le tampon de *binding* (phosphate Na 20mM pH 7, NaCl 500mM) contenant 20mM d'Imidazole (Sigma, 56749) puis avec le même tampon mais avec cette fois-ci 100mM d'imidazole. Le premier tampon permet l'élution des protéines fixées de manière non spécifique, le second traitement permet l'élution de la MMP9.

Cette dernière fraction est ensuite concentrée sur système Amicon (cut-off 10kDa, Merck, UFC901024) et le tampon est échangé par du tampon PBS sans calcium et sans magnésium (*Phosphate Buffered Saline* pH 7, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,76mM KH₂PO₄). La préparation est stérilisée par filtration sur membrane 0.22µm.

1.3/Caractérisation de la MMP9 recombinante

1.3.1- Quantification par technique ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Cette technique permet la quantification d'une protéine purifiée ou non grâce à une gamme étalon réalisée avec une préparation de concentration connue de cette même protéine. Ici, je vous présente la technique adaptée à la quantification de la MMP9. La préparation commerciale (M8945-10UG, Sigma Aldrich) que nous avons utilisée pour faire la gamme étalon a une concentration de $C_0=0.25$ mg/ml.

La veille, l'antigène MMP9 est adsorbé sur une plaque 96 puits (*Nunc MaxiSorp™ flat-bottom*) suivant le plan indiqué ci-après :



MMP9 produite (50/50 Tampon NaHCO₃) (1,5µg/mL 1µg/mL 500ng/mL 100ng/mL 50ng/mL 10ng/mL)

Figure 11: Plan de plaque pour la quantification de la MMP9 recombinante.

La MMP9 purifiée que nous souhaitons quantifier et la MMP9 commerciale sont diluées dans du tampon de *coating* carbonate/bicarbonate pH 9.6, déposées sur plaque (50µl/puits) et laissées toute la nuit à 4°C.

Le lendemain, la plaque est lavée 3 fois au PBST (PBS, pH 7.4, 0.1% *Tween* @20) et les puits sont bloqués avec une solution de lait écrémé (lait écrémé en poudre Régilait®) à 2% dans du PBS pendant deux heures sous agitation à température ambiante.

La plaque est à nouveau lavée 3 fois au PBST et l'anticorps primaire (*Rabbit monoclonal anti-MMP9 Antibody*, Abcam ab76003) dilué au 1/1000^{ème} est ajouté aux puits et laissé une heure sous agitation à température ambiante.

La plaque est ensuite lavée 3 fois au PBST. L'anticorps secondaire ou anticorps de révélation (*Stabilized Goat Anti-Rabbit IgG, (H+L) Peroxidase Conjugated,* Thermo Scientific, No : 32460, lot : LK152969) est ensuite ajouté aux puits. Cet anticorps est utilisé au 1/2000^{ème} et est laissé une heure sous agitation à température ambiante.

Après un nouveau lavage (PBST, 3 fois), l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6sulphonique), (*ABTS Single Solution*, Invitrogen 00-2024) est ajouté aux puits. Il agit en tant que substrat de l'enzyme peroxydase et amène une coloration bleue lorsque les anticorps secondaires sont présents dans les puits. L'ABTS est laissé au moins 30 minutes sous agitation à température ambiante. La plaque est ensuite lue par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 415nm (Labsystems iEMS Reader MF 1401).

1.3.2- Analyse de l'activité enzymatique par zymographie sur gel

La MMP9 produite en baculovirus a été analysée par zymographie sur gel SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Cette expérience permet de mettre en évidence l'activité enzymatique de la protéine et sa quantification par comparaison avec une préparation de MMP9 commerciale comme décrit précédemment pour la technique ELISA. L'activité gélatinase de la MMP9 est mesurée grâce à l'ajout de gélatine dans le gel (Dominique Dutscher 777333).

a) Préparation des échantillons

Les préparations protéiques à analyser sont diluées aux concentrations souhaitées (1.6µg/ml ; 1µg/ml ; 0.5µg/ml ; 0.1µg/ml ; 0.05µg/ml ; 0.01µg/ml) dans du PBS. Elles sont mises en présence de 5µl de tampon Laemmli sans β -mercaptoéthanol (*4x Laemmli Sample Buffer*, Biorad 1610747) afin de maintenir les ponts disulfures, une dénaturation complète de la protéine empêchant toute mesure d'activité.

b) Migration sur gel de polyacrylamide

La technique utilisée, le SDS-PAGE permet la migration de protéines suivant leur masse moléculaire. Le pourcentage de polyacrylamide du gel dépend de la protéine à étudier. Ainsi, plus le pourcentage en polyacrylamide est élevé, moins les molécules volumineuses peuvent migrer. Le tableau suivant présente le pourcentage de polyacrylamide suivant la gamme de séparation des protéines en kDa.

Pourcentage de polyacrylamide	Gamme de séparation (kDa)
7.5	35-200
10	15-100
15	10-50
18	5-40

Tableau 5: Quantité de polyacrylamide à utiliser suivant la gamme de séparation des protéines à analyser.

La MMP9 ayant une masse moléculaire de 92kDa, la proportion en polyacrylamide la plus adaptée pour cette expérience est de 7.5%.

Le gel est composé de deux parties : le gel de migration et le gel de tassement, chacun présentant une composition spécifique. Le gel de migration est le premier à être coulé entre deux plaques de verre. Il contient 3.8ml d'eau distillée, 2ml d'un mélange acrylamide/bis-acrylamide 37.5 :1 à 30%, 2ml de tampon Tris pH 8.8, 80µl de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*,

10%), 80µl d'APS (*Ammonium Persulfate*, 10%), et 8µl de TEMED (*Tetramethylethylenediamine*, ≥99%). Ce gel de migration contient également de la gélatine à une concentration de 1mg/ml.

Le gel de tassement est coulé sur le gel de migration. Il est composé de 2.6ml d'eau distillée, 1ml d'acrylamide/bisacrylamide 37.5 :1 à 30%, 1.25ml de tampon Tris pH 6.8, 50µl de SDS à 10%, 50µl d'APS à 10% et 5µl de TEMED (≥99%). Un peigne est introduit dans le gel de tassement, permettant la formation de puits pour le dépôt des échantillons protéiques à analyser.

Après élaboration du gel, les différentes solutions de concentration définies en MMP9 recombinante et commerciale ainsi que le marqueur de masse moléculaire (*Roti®-Mark BI-PINK*, Roth 8269) sont déposés pour migration pendant 90 minutes à 120 V en cuve (*Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell*, Biorad 1658025FC) dans un tampon de migration composé de 25mM de Tris, 192mM de Glycine, et 0.1% de SDS.



Figure 12: Représentation schématique d'un gel de migration protéique.

Le gel est composé de deux parties : le gel de migration et le gel de tassement, un peigne est introduit dans le gel de tassement avant la prise ce qui permet la formation de puits pour le dépôt des échantillons à analyser ainsi que du marqueur de masse moléculaire commercial (Roti®-Mark BI-PINK, Roth 8269). Les plaques sont alors placées dans l'appareil Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Biorad 1658025FC), la cuve est remplie avec le tampon de migration (25mM de Tris, 192mM de Glycine, et 0.1% de SDS) selon les consignes du fournisseur. Un courant électrique continu est appliqué pendant 90 minutes à 120V pour permettre la migration de protéines dans le gel.

c) Analyse et interprétation des résultats

Une fois la migration effectuée, le gel est démoulé et soumis à deux lavages d'une demi-heure dans une solution de Triton X100 (Roche 11332481001) à 2.5% pour enlever toute trace de

SDS. Le gel est ensuite déposé dans un tampon d'activation composé de 50mM de Tris-HCl et 10mM de CaCl₂ (pH 7.5) toute la nuit à 37°C. La dernière étape consiste à colorer le gel dans du bleu de Coomassie (*Brilliant Blue R-250 Dye*, Thermo Scientific 20278) à 0.1% durant trois heures, avant d'être soumis à deux bains d'eau pour décoloration avant analyse.

L'analyse du gel se fait via le logiciel ImageJ. Le gel est dans un premier temps pris en photo avant de subir un traitement informatique (obtention de niveaux de gris).

La dernière étape est l'utilisation du logiciel afin d'avoir une comparaison de l'activité de la MMP9 commerciale vis-à-vis de la MMP9 produite pour la même concentration.

1.3.3- Détection et identification par Western blot

La première étape consiste à séparer les protéines sur un gel SDS-PAGE comme décrit dans le paragraphe 1.3.2,b), *Migration sur gel de polyacrylamide*. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose avant d'être mises en contact avec un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt. Un anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire et conjugué avec la HRP permet la révélation du complexe et donc de la protéine d'intérêt.

a) Transfert sur membrane de nitrocellulose

Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (*Nitrocellulose Membrane, Precut*, 0.45µm, 7x8.5cm, Biorad 1620145). Le principe de transfert repose sur le fait que les protéines chargées négativement grâce à leur interaction avec le SDS migrent vers l'anode sous l'effet d'un champ électrique. La membrane de nitrocellulose est donc incorporée entre le gel et l'anode comme expliqué dans la figure 13.



Figure 13: Schéma explicatif du transfert de protéine sur membrane de nitrocellulose. Après migration des protéines dans le gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées selon les conditions fournisseur sur une membrane en nitrocellulose (Precut, 0.45 µm, 7x8.5cm, Biorad 1620145) grâce au Mini Trans-Blot® Module de Biorad. Le transfert est vérifié par coloration au rouge ponceau.

La migration se fait en cuve (*Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell*, Biorad 1658025FC), couplée à un module de transfert (*Mini Trans-Blot® Module*, Biorad 1703935) durant une heure à 100V. Ce transfert se fait dans un tampon composé de 25mM de Tris, 190mM de glycine et 20% de méthanol.

b) Révélation

Après transfert, la membrane est déposée dans une cuve contenant une solution de lait écrémé à 10% dans du PBS. Cette étape permet de bloquer tous les sites potentiels d'interactions non spécifiques. Après une heure d'incubation, trois lavages de 10 minutes au PBST sont effectués. La membrane de nitrocellulose est ensuite mise en poche scellée puis incubée avec l'anticorps primaire anti-MMP9 dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS et laissée une heure sous agitation à température ambiante.

Après cette première étape, la membrane est lavée trois fois au PBST (pour éliminer l'excès d'anticorps) et incubée (toujours en poche scellée) avec l'anticorps secondaire (*Stabilized Goat Anti-Rabbit IgG, (H+L) Peroxidase Conjugated*, Thermo Scientific, No : 32460, lot : LK152969) dilué au 1/2000^{ème} dans du PBS une heure à température ambiante sous agitation. La membrane est à nouveau lavée trois fois au PBST pour éliminer l'excès d'anticorps.

La présence de l'anticorps conjugué HRP est révélée par chimiluminescence. Pour cela la membrane est incubée pendant 5 minutes avec un substrat de la peroxydase (*Pierce[™] ECL*

Western Blotting Substrate, Thermo Scientific 32106) qui émet de la lumière après exposition à l'étiquette enzymatique présente sur l'anticorps secondaire. La lumière émise permet l'impression sur film photographique (*Kodak Ultra Premium Photo Paper*, 280g/m², 275 microns, A4). Une quantification des marquages est possible grâce au logiciel ImageJ.



Figure 14: Le Western Blot : du dépôt d'anticorps à la révélation.

Après transfert (figure 13) et blocage de sites non spécifiques avec une solution de lait écrémé à 10%, la membrane de nitrocellulose subit deux incubations successives avec un anticorps primaire, suivi d'un anticorps secondaire couplée à la HRP. Pour cela, la membrane est mise en poche scellée contenant une solution de concentration définie en anticorps primaire ou secondaire. La révélation de l'anticorps conjugué HRP se fait par incubation de la membrane avec un substrat de la peroxydase. La réaction enzyme/substrat émet de la lumière permettant une impression sur film photographique.

Partie II - Utilisation de la technique de phage display pour la sélection d'un ERB.

Deux banques de phages exprimant des peptides de 12 et 7 mer ont été achetées chez *New England Biolabs®* (Références : E8110S, E8100S). Une banque naïve exprimant des VHH de dromadaires a également été mise à ma disposition par la société CamInnov. La figure 15 ci-dessous représente les différentes étapes de cette sélection.



Figure 15: La méthode du phage display pour la sélection d'un ERB spécifique à la MMP9 à partir d'une banque de phages présentant à leur surface des VHH ou des peptides.

La protéine d'intérêt (ici MMP9) est préalablement immobilisée sur plaque. Les phages comportant à leur surface des ERB potentiels sont ensuite déposés. Suite aux lavages permettant l'élimination de phages non spécifiques, les phages spécifiques sont élués et amplifiés afin d'être criblés lors d'un nouveau tour de sélection. Généralement, 2 à 5 tours de sélection sont nécessaires afin d'isoler une ou plusieurs molécules « hit » possédant une bonne affinité pour la cible étudiée.

2.1/Sélection de l'ERB

2.1.1- Premier tour de « panning »

a) Préparation du premier tour

La veille du premier tour de sélection des bactéries TG1¹ (pour les banques VHH) ou K12² (pour les banques peptidiques, issues du kit commercial) sont déposées sur une boîte de pétri LB Agar (*Lysogeny Broth with Agar*, 10g tryptone, 5g yeast extract, 5g NaCl, 15g agar, 1L eau distillée coulé dans des boîtes de pétri de diamètre 9cm) et incubées à 37°C pendant une nuit. En parallèle, sur une plaque 96 puits MaxiSorpTM, 5 puits sont *coatés* avec la molécule cible (MMP9, Sigma Aldrich M8945-10UG) diluée à une concentration de 1µg/ml dans un tampon carbonate/bicarbonate à 100mM pH 9.6. Cinq puits « contrôle négatif » contenant uniquement le tampon de *coating* sont également préparés. La plaque est placée pendant 12 heures à 4°C sous agitation.

b) « Screening » des phages

Le jour J, une colonie de bactérie TG1 ou K12 (suivant la banque utilisée) est piquée et mise en culture dans 10mL de milieu LB à 37°C sous agitation (200 tours par minute dans un agitateur incubateur VWR).

La plaque 96 puits est lavée au PBST puis bloquée avec une solution de lait écrémé à 2% (diluée dans du PBS) pendant 2 heures à température ambiante.

Les puits « contrôle négatif » de la plaque 96 puits sont lavés au PBST puis les phages issus des banques « VHH » ou des banques « peptidiques » préalablement dilués dans une solution de lait écrémé à 1% dans du PBS sont ajoutés. L'incubation est ensuite poursuivie à température ambiante pendant une heure. Cette incubation dans les puits « contrôle négatif » va permettre une première élimination de phages non spécifiques pour la molécule cible (MMP9) contenus dans les suspensions virales.

Les puits contenant l'enzyme MMP9 (contrôle positif) sont à leur tour lavés au PBST et les phages issus des puits contrôle négatif y sont transférés pendant une heure à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés au PBST puis les phages restés accrochés dans les puits

¹ Génotype de la souche TG1 : (K-12 glnV44 thi-1 Δ (lac-proAB) Δ (mcrB-hsdSM)5(rK–mK–) F' [traD36 proAB+ laclq lacZ Δ M15]=K-12JM101 Δ (mcrB-hsdSM)5(rK–mK–)

² Génotype de la souche K12 : F´proA + B+ laclq Δ (lacZ)M15 zzf:: Tn10(Tet R)/ fhuA2 glnV Δ (lac-proAB) thi-1 Δ (hsdS-mcrB)5
positifs sont élués avec une solution de Triethylamine (N,N-diéthyléthanamine, 40%) pendant 10 minutes.

L'élution est ensuite stoppée par ajout d'une solution de Tris à pH 7.5. Le contenu des puits est récupéré et déposé dans un tube Eppendorf et constitue la solution mère de ce premier tour.

A partir de cette solution mère, des dilutions en cascade sont effectuées dans du milieu LB jusqu'à obtenir des solutions diluées à 10^{-2} et 10^{-3} . Ces solutions de phages dilués sont mises en contact avec les bactéries TG1 préalablement mises en culture jusqu'à atteindre une DO₆₀₀=0.6 puis incubés pendant une heure à 37°C.

Les bactéries sont ensuite étalées sur boîtes de pétri LB agar avec antibiotique (ampicilline ou tétracycline à 100µg/ml suivant la banque testée) et mises à incuber toute la nuit à 37°C. Les boîtes de pétri contenant les phages sélectionnés à l'issu de ce tour sont ensuite fermées à l'aide de Parafilm® et conservées à 4°C. Cette dernière étape constitue la fin du premier tour.

2.1.2- Deuxième tour de « panning »

a) Amplification des phages sélectionnés au premier tour

Le reste de solution mère contenant les phages récupérés lors du premier tour est mis en contact avec des bactéries TG1 et incubé 30 minutes à 37°C. Une fois la pré-incubation terminée, la suspension de bactéries et phages est mise dans un milieu nutritif 2XTY (16g peptone, 10g yeast extract, 5g NaCl, 1L eau distillée) contenant 100µg/ml d'antibiotique (ampicilline ou tétracycline) et 1% de glucose pendant une heure à 37°C sous agitation (200 tours par minute dans un agitateur incubateur). Après cela, le *phage helper* (New England Biolabs[®] M13KO7) est ajouté et les bactéries sont incubées 30 minutes à température ambiante. La suspension est ensuite centrifugée à 1109 x g pendant 10 minutes à température ambiante (Centrifugeuse Beckman Allegra 64r, rotor : C0650, facteur k : 2,964). Le surnageant est éliminé, le culot suspendu dans 250ml de 2XTY + antibiotique (ampicilline ou tétracycline à 100µg/ml + kanamycine à 100µg/ml) et cultivé sur la nuit à 37°C. En parallèle, une nouvelle plaque 96 puits MaxisorpTM est *coatée* comme expliqué au paragraphe 2.1.1.a), *Préparation du premier tour*.

b) Concentration

La culture préparée la veille est centrifugée à 1109 x g pendant 10 minutes à température ambiante (Centrifugeuse Beckman Allegra 64r, rotor : C0650, facteur k : 2,964). Le surnageant

62

est récupéré et une solution de PEG-NaCl (20% PolyEthylene Glycol 6000, 2.5M NaCl dans 1L d'eau distillée) correspondant à environ $1/5^{eme}$ du volume de surnageant est ajouté. Le tout est mis à incuber une heure dans un bac de glace. La suspension est ensuite centrifugée 15 minutes à 4°C et 1109 x g (Centrifugeuse Beckman Allegra 64r, rotor : C0650, facteur k : 2,964). Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans du PBS puis transféré dans un tube Eppendorf de 1,5ml pour être centrifugé à nouveau à 11600 x g pendant une minute à température ambiante (MicroCL 17 Microcentrifuge, Thermo Scientific 75002406). Après lecture de la densité optique à 280 nm (préparation de la cuve : 20µl de solution de phages dans 980µl de PBS) les phages sont dilués afin d'avoir 1x10¹² phages par puits. Le calcul utilisé afin d'avoir le taux de dilution est le suivant :

DO₂₈₀ x 50^{*} x Titre viral^{**}= Nombre de phages Nombre de phages/2x10¹²= taux de dilution * Car dilué 50x pour analyse ^{**}(PFU/mI) dépendant de la banque utilisée

Figure 16: Taux de dilution : phage display.

Les étapes suivantes sont les mêmes que pour le premier tour avec dépôt des phages sur les puits négatifs, transfert des phages non absorbés sur les puits positifs contenant la MMP9, lavage et récupération de la solution mère issue du second tour après élution. Des boites de pétri contenant des colonies infectées par les phages de ce second tour sont stockées comme mentionné pour le premier tour. Le tour suivant est préparé de la même manière que précédemment.

2.2/Analyse par ELISA des phages sélectionnés pour la cible MMP9

Après généralement trois tours, les boîtes de pétri des tours 2 et 3 sont récupérées et les colonies repiquées dans une plaque 96 puits stérile (Plaque 96 puits fond plat (avec couvercle), Dominique Dustcher 064040) contenant 200µl de milieu TB (*Terrific Broth*, 12g peptone, 24g yeast extract, 2.2g KH₂PO₄, 9.4g K₂HPO₄, 1L eau distillée) + antibiotique (ampicilline ou tétracycline à 100µg/ml). Cette plaque est mise à incuber 6 heures à 37°C sous agitation. Après cela, la plaque est dupliquée (transfert puits par puits de 30µl dans une nouvelle plaque stérile contenant 170µl TB + antibiotique) et de l'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, 1mM, 5µl par puits) est ajouté à la plaque originale afin d'induire la production de VHH au sein des bactéries. Cette plaque est ensuite mise à 28°C (température optimale pour l'induction) sous

agitation toute la nuit. La plaque dupliquée est quant à elle mise à incuber à 37°C pendant une nuit.

En parallèle deux plaques 96 puits MaxiSorp[™] sont préparées : dans l'une la molécule d'intérêt, la protéine MMP9 (MMP9, Sigma Aldrich M8945-10UG) est adsorbée à la surface de la plaque en présence d'un tampon dit de *« coating »* (tampon de *coating carbonate/bicarbonate à 100mM pH 9.6*) toute la nuit à 4°C, l'autre plaque est traitée de la même manière mais avec le tampon de *coating* uniquement (plaque « Contrôle négatif »). Le lendemain, ces plaques contrôle sont lavées au PBST et bloquées avec une solution de lait écrémé à 2% dans du PBS pendant deux heures.

La plaque dénommée « plaque originale » préparée à l'issue du phage display est récupérée pour être centrifugée 10 minutes à 1800 x g à température ambiante (Centrifugeuse Sigma Aldrich 2-5, rotor : Nr-11121), le surnageant est éliminé et 70µl par puits de TES (Tris-HCl 0.2M, EDTA 0.5mM, Sucrose 0.5M, 200ml d'eau distillée) sont ajoutés. La plaque est incubée une heure à 4°C puis 120µl d'une solution de TES/4 sont ajoutés aux puits et l'incubation est poursuivie une heure à 4°C.

Cette plaque est ensuite centrifugée à 1800 x g à 4°C (Centrifugeuse Sigma Aldrich 2-5, rotor : Nr-11121) puis le surnageant est transféré aux plaques contrôle (contenant soit MMP9 soit uniquement le tampon de *coating*) préalablement lavées au PBST. Le transfert s'effectue puits par puits.

Au bout d'une heure, les plaques contrôle sont lavées au PBST. Une solution contenant un anticorps secondaire spécifique aux ERB testés est déposée sur les puits. Pour les banques VHH il s'agit d'un anticorps anti-histidine (*Mouse anti-His Ig,* Roche 11922416001) dilué au 1/1000^{ème} qui va capter l'étiquette 6-His spécifique aux VHH. Pour les banques peptidiques, nous utilisons un anticorps anti-M13 directement couplé à la HRP (Anti-M13 Ab B62-FE2, Ab50370, Abcam). L'incubation dure une heure, les plaques sont ensuite lavées, et les plaques des banques VHH subissent une étape supplémentaire avec l'ajout d'un anticorps de révélation (*Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP,* Thermo Scientific 62-6520) et une incubation d'une heure à température ambiante.

64

Une fois les plaques lavées, l'ABTS est ajouté. Ce révélateur agit en tant que substrat de l'enzyme peroxydase et amène une coloration bleue lorsque les anticorps secondaires sont présents dans les puits, comme représenté sur le schéma ci-dessous pour les VHH.



Figure 17: L'ELISA : représentation schématique.

La molécule d'intérêt, ici MMP9, est préalablement immobilisée sur plaque 96 puits. Les VHHs sélectionnés lors du phage display sont ensuite déposés sur les puits. Chaque VHH possède une étiquette 6 histidine en fin de séquence qui sera captée par un anticorps primaire anti-His. L'anticorps secondaire est ensuite déposé. Celui-ci contient une étiquette enzymatique capable de réagir avec un substrat spécifique. La réaction enzyme/substrat donne une variation colorimétrique quantifiable en spectrophotométrie à 415nm. Des lavages sont effectués entre chaque dépôt, permettant l'élimination de toute activité non spécifique.

Les plaques sont ensuite analysées en spectrophotométrie à 415nm. Nous considérons que l'ERB possède une affinité suffisante pour la cible lorsque le rapport contrôle positif/contrôle négatif est supérieur ou égal à 2.

Si nous avons un ou plusieurs puits positifs (puits « *hit* »), la plaque dupliquée est récupérée et 10 à 30µl de la suspension contenant les bactéries infectées par les phages correspondant au puits « *hit* » est mise dans 4ml d'un mélange de TB + antibiotique (dilué au 1/1000^{ème}) et laissé à incuber toute la nuit à 37°C afin de pouvoir amplifier les phages contenus dans ces puits.

2.3/Extraction de l'ADN des clones sélectionnés via ELISA pour séquençage

L'ADN des phagemides exprimant les VHH est extrait et purifié par un kit spécifique EasyPure[®] Plasmid Miniprep de chez CliniSciences (EM101-02). S'en suit une digestion enzymatique de l'ADN récupéré par les enzymes EcoRI et BamHI (New England Biolabs[®]). 20µl d'ADN issu de l'extraction, 1 unité d'EcoRI, 1 unité de BamHI en présence de tampon spécifique à ces enzymes sont laissés 1 heure à 37°C. Après incubation, les préparations sont analysées sur gel d'agarose à 1% en tampon TAE (40mM Tris-Acétate, 1mM EDTA, 1L d'eau distillée, pH 8). Cette digestion permet de faire une première vérification de l'ADN des VHH « *hits* ». La taille du fragment généré après cette double digestion doit être d'environ 1000 paires de bases. Si c'est le cas, l'ADN est par la suite envoyé au séquençage chez GATC Biotech (maintenant Eurofins genomics).

Le but est de vérifier l'intégrité de la séquence obtenue, par exemple l'absence de codon stop à l'intérieur de la séquence sélectionnée. Si celle-ci correspond aux critères de sélection, elle est mise de côté pour une étape de production.

2.4/Production des ERB issus du phage display

La partie suivante ne concerne que la production de VHH potentiellement spécifiques pour MMP9 obtenus au cours de la sélection.

Le phagemide initialement obtenu après sélection n'est pas un plasmide optimal pour une production en grande quantité de VHH. Un transfert de la séquence codant le VHH « *hit* » dans un vecteur plus spécifique à la production doit être effectué. Le vecteur utilisé pour ce transfert est le pET-22b (Merck 69744).

2.4.1- Amplification du phagemide

La première étape de ce transfert est la transformation bactérienne avec l'ADN extrait lors de l'étape précédente. Cet ADN est inséré dans des bactéries JM109³ par choc thermique. 2µl d'ADN précédemment obtenu est mis en présence de 50µl de bactéries compétentes (voir paragraphe 2.5, *Préparation de bactéries compétentes, méthode Inoue*) pendant 30 minutes sur glace. Le mélange est ensuite mis 50 secondes à 42°C, avant d'être remis dans la glace trois minutes. 200µl de SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*, 20g peptone, 5g yeast extract, 584mg NaCl, 186mg KCl, 10mM MgCl2, 10mM de MgSO₄ et 3.603g glucose dans 1L d'eau distillée) est ensuite ajouté au mélange qui est laissé une heure à 37°C sous agitation. Le tout est ensuite étalé sur boîte de pétri LB Agar ampicilline.

³ Génotype de la souche JM109 : endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ laclq lacZΔM15] hsdR17(rK-mK+)

2.4.2- Transfert du VHH dans le plasmide pET-22b

L'étape suivante consiste à isoler le fragment d'ADN codant le VHH d'intérêt via utilisation des enzymes de restriction NotI et Ncol (*New England Biolabs*[®]) pour pouvoir le cloner dans le pET-22b. La préparation est composée de 50µl d'ADN, 0.5 unité de Ncol, 0.5 unité de NotI en présence de tampon spécifique à ces enzymes et est laissée une heure à 37°C. Les préparations sont ensuite analysées par migration sur un gel d'agarose 1.5%. La taille du fragment que nous devons obtenir doit être aux alentours des 400 paires de bases. En parallèle, le vecteur pET-22b subit également une digestion enzymatique avec les mêmes enzymes de restriction et est déposé sur le même gel. Dans ce cas, le fragment généré par la double digestion doit avoir une taille d'environ des 5000 paires de bases. Ces deux fragments sont isolés et purifiés sur colonne d'extraction d'ADN (issues du kit d'extraction EasyPure[®]) et subissent une étape de ligation avec la ligase (T4 DNA ligase, *New England Biolabs* M0202S [®]). Un mélange contenant 10µg VHH et 3µg de vecteur est mis en présence de 4 unités de ligase T4, dans le tampon spécifique de l'enzyme. L'incubation est effectuée à 16°C pendant 24 heures.

A l'issu de la ligation, le mélange réactionnel est récupéré pour effectuer une transformation bactérienne. Cet ADN est inséré dans des bactéries JM109³ par choc thermique. 2µl de mélange de ligation sont mis en présence de 50µl de bactéries compétentes pendant 30 minutes sur glace. Le mélange est ensuite mis 50 secondes à 42°C, avant d'être remis dans la glace trois minutes. 200µl de SOC sont ensuite ajoutés au mélange qui est laissé une heure à 37°C sous agitation. Le tout est ensuite étalé sur boîte de pétri LB Agar ampicilline et mis 12 heures à 37°C.

Les colonies isolées sont mises en culture dans 5ml de LB + ampicilline toute la nuit à 37°C. Ces pré-cultures sont ensuite récupérées, leur ADN est à nouveau extrait via le kit EasyPure[®]. Une dernière digestion enzymatique est effectuée à l'aide des enzymes de restriction Xbal et XhoI (*New England Biolabs*[®]) pour vérifier les plasmides obtenus après ligation. 20µl d'ADN issu de l'extraction, 1 unité de Xbal et 1 unité de XhoI en présence du tampon spécifique à ces enzymes sont mis à incuber une heure à 37°C. Après dépôt et migration sur gel d'agarose à 1.5%, une bande aux alentours des 500 paires de bases doit être présente.

67

2.4.3- Production et purification des VHH

La dernière étape de cette production est l'insertion du plasmide obtenu précédemment dans des bactéries $BL21^4$ via transformation bactérienne. Ces bactéries sont les plus couramment utilisées pour la production de pET recombinants et possèdent un niveau d'expression plus élevé que les bactéries JM109. Les colonies issues de la transformation bactérienne précédente sont mises en pré-culture dans un milieu nutritif TB + ampicilline (100µg/ml), et laissée toute la nuit à 37°C.

La pré-culture de nuit est ensuite utilisée comme inoculum pour ensemencer 330ml de TB avec ampicilline (100µg/ml), 2mM MgCl₂ et 2% de glucose. La culture est laissée à 37°C jusqu'à ce que la lecture de densité optique à 600nm atteigne 0.6. L'étape suivante est l'ajout de 250µl d'IPTG à 1mM. La culture est ensuite mise à agiter toute la nuit à 28°C.

Les bactéries produites lors de la culture vont ensuite être lysées à l'aide du tampon suivant : 7.8g de NaH₂PO₄, 17.34g de NaCl et 0.68g d'imidazole dans 500ml d'eau distillée, pH 8 auquel viennent s'ajouter 10µl de DNAse I à 2000 unités/ml (*New England Biolabs®* M0303S) et 10µl de Lysozyme à 100µg/ml (extrait de blanc d'œuf, Applichem ITWReagents A4972). Le mélange est laissé sous agitation une heure à température ambiante. En parallèle, 200µl de billes de nickel Ni-NTA (Thermo Scientific R90101) sont lavées trois fois avec le tampon de lavage suivant : 7.8g NaH₂PO₄, 17.34g NaCl, 1.36g Imidazole dans 500ml d'eau distillée, pH 8. Ces billes permettent un accrochage spécifique au niveau de l'étiquette six histidines présente en C-terminal des VHH produits. Le lysat est ensuite centrifugé 30 minutes à 5615 x g et à 4°C (Centrifugeuse Beckman Allegra 64r, rotor : C0650, facteur k : 2,964). Le surnageant est mis en présence des billes pendant une heure à température ambiante. Les billes sur lesquelles les VHH ont été fixés sont déposées dans une colonne de purification (colonne chromatographique en polystyrène de 20ml *Evergreen*), lavées 6 fois avec le tampon de lavage et les VHH sont ensuite élués avec le tampon d'élution suivant :7.8g NaH₂PO₄, 17.34g NaCl, 17g Imidazole dans 500ml d'eau distillée, pH 8. Les éluats sont ensuite stockés à 4°C.

La dernière étape de la production est la vérification de la présence de VHH en gel SDS-PAGE avec un gel à 18% (voir paragraphe 1.3.2.b), *Migration sur gel de polyacrylamide*). Les VHH sont de petites protéines d'environ 15 kDa, d'où l'emploi d'un gel à 18% de polyacrylamide.

⁴ Génotype de la souche BL21: *E. coli* B F– ompT gal dcm lon hsdSB(rB–mB–) [malB+]K-12(λS)

Si la bande recherchée est présente, les éluats précédemment obtenus sont purifiés et concentrés via système Amicon Ultra-4 (cut-off 3kDa, Merck UFC800324). Leur concentration est mesurée par Nanodrop[™] (Thermo Scientific ND-2000) avant d'être stockés à -20°C.

2.5/Préparation de bactéries compétentes, méthode Inoue.

La veille de l'expérience, les bactéries JM109 et BL21 sont ensemencées en boîte de pétri LB ampicilline (100 µg/ml) et mises toute la nuit en étuve à 37°C.

Le lendemain, les boites de pétri sont récupérées et une colonie de bactéries est prélevée pour ensemencer 25ml de SOB (*Super Optimal Broth*, 20g peptone, 5g yeast extract, 584mg NaCl, 186mg KCl, 10mM MgCl2 et 10mM de MgSO₄, 1L d'eau distillée). La pré-culture est incubée 6 à 8 heures à 37°C sous agitation. Lorsque la densité optique de la pré-culture atteint 0.6 à 600nm, 5ml sont prélevés et utilisés pour ensemencer 250ml de SOB. L'incubation est poursuivie toute la nuit à température ambiante sous agitation.

Le jour suivant, lorsque la densité optique de la culture atteint 0.55 à 600 nm, elle est mise dans un bain de glace 10 minutes. La culture est ensuite centrifugée 10 minutes à 1109 x g et à 4°C (Centrifugeuse Beckman Allegra 64r, rotor : C0650, facteur k : 2,964), le culot est récupéré et resuspendu dans 80ml de tampon Inoue (10.88g MgCl₂, 2.20g CaCl₂, 20 ml PIPES 5M (*piperazine-N-N'-bis(2-ethanesulfonic acid*)), 18.65g KCl).

Le mélange est ensuite centrifugé 10 minutes à température ambiante et à 1109 x g (Centrifugeuse Beckman Allegra 64r, rotor : C0650, facteur k : 2,964), le culot est resuspendu délicatement dans 20ml de tampon Inoue maintenu à 0°C dans un bac de glace et 1.5 ml de DMSO est ajouté à la suspension.

Le mélange est maintenu 10 minutes dans la glace avant d'être aliquoté en tubes (généralement aliquots de 500µl). Les bactéries sont ensuite congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

69

Partie III - Élaboration des supports d'alumine poreuse pour fonctionnalisation

La fabrication de supports d'alumine poreuse se fait par anodisation d'aluminium simple ou déposé sur une couche de 8µm de PET (*PolyEthylène Terephtalate*) fourni par TAGEOS SAS. Après cette étape, les supports ainsi fabriqués seront fonctionnalisés avec un ERB afin d'obtenir un capteur capacitif. Le schéma suivant décrit ce procédé dans sa totalité :



Figure 18: Procédé d'obtention d'un biocapteur.

L'échantillon d'aluminium seul ou déposé sur du PET est anodisé, permettant la formation d'une couche d'oxyde ainsi que la création de pores en surface de l'aluminium. L'échantillon d'alumine poreuse ainsi formé subit une étape de dépôt d'électrodes. Une couche d'aluminium est déposée au travers d'un masque de nickel sur le support. La dernière étape est la fonctionnalisation du support d'alumine par un ERB, permettant la formation du biocapteur.

3.1/Préparation des supports flexibles d'Al₂O₃ par anodisation

L'anodisation complète comporte trois étapes : le pré-traitement ou préparation des supports, le traitement ou anodisation et le post traitement où les supports sont lavés, séchés et stockés avant fonctionnalisation. L'appareillage utilisé est un bâti d'anodisation comportant une cuve, un support de positionnement des électrodes, un support d'anodisation pour échantillons flexibles ainsi qu'une grille de platine utilisée comme cathode, le tout relié à un générateur de courant Keithley 2400 et à un multimètre. Le logiciel pilotant l'anodisation est le logiciel LabVIEW.

3.1.1- Le pré-traitement

Les supports sont dégraissés à l'aide de savon et d'une éponge lisse, rincés à l'eau distillée puis à l'isopropanol avant d'être séchés sous flux d'azote. Ils sont ensuite préparés : un morceau de ruban adhésif de cuivre est déposé sur le côté qui sera relié au système électrique et isolé du reste du support d'aluminium avec un ruban d'isolation thermique suivant le schéma en figure 19.



Figure 19: Préparation du support d'aluminium avant anodisation : mise en place d'un ruban de cuivre sur la partie du support qui sera en contact avec le système électrique suivi d'un ruban d'isolation thermique.

3.1.2- Le traitement

Un des supports préparés est fixé au support d'anodisation et relié aux électrodes via la partie cuivrée. Une solution d'acide phosphorique à 15% est versée dans la cuve et maintenue en dessous de 5°C tout le long de la réaction d'anodisation. Le mode choisi pour cette réaction est galvanostatique, la tension est de 120V et l'intensité du courant est de 10mA/cm². L'échantillon d'aluminium est ensuite plongé dans le tampon d'anodisation et la réaction est mise en route pour 750 secondes.



Figure 20: L'anodisation : l'échantillon d'aluminium préparé (figure 19) joue le rôle d'anode et est plongé dans une cuve contenant une solution d'anodisation à température définie. Il est relié à un générateur de courant, luimême relié à un PC contrôlant les différents paramètres de l'expérience. La cathode est une grille de platine reliée au générateur. L'échantillon anodisé est ensuite plongé dans une nouvelle solution d'acide phosphorique à 15% et 40°C, elle-même placée dans un bain ultrasons. Cette solution et les ultrasons vont permettre un élargissement des pores des supports anodisés. Le bain ultrason est maintenu 90 à 120 secondes.

3.1.3- Le post-traitement

Les échantillons anodisés sont lavés dans un bain d'eau distillée à 50°C pendant 30 secondes. Ils sont ensuite soumis aux ultrasons dans un bain d'acide nitrique à 5% et 40°C pendant 120 secondes afin d'éliminer toutes traces d'acide phosphorique dans les pores. Le dernier rinçage est un bain d'eau distillée à 50°C durant 30 secondes. Les échantillons sont ensuite séchés sous flux d'azote et stockés en boîte hermétique.

3.1.4- Le dépôt d'électrodes

Les morceaux d'aluminium préalablement anodisés subissent une étape supplémentaire de dépôt d'électrodes sur leur surface afin de créer des contacts électriques. Cette étape est faite avant fonctionnalisation car nécessite des températures élevées incompatibles avec les éléments de reconnaissance biologique utilisés pour le projet. Un masque de nickel est utilisé et permet le dépôt de 300 nm d'aluminium sur les supports.

3.2/La fonctionnalisation des capteurs capacitifs

3.2.1- Avec l'anticorps conventionnel

a) Via adsorption





Dépôt direct des éléments de reconnaissance biologique, ici l'anticorps commercial (*Rabbit monoclonal anti-MMP9 Antibody*, Abcam ab76003) sur la surface : création de liaisons faibles. Les anticorps ont été dilués dans du PBS à la concentration désirée (dilution au 1/500^{ème}, 1/2000^{ème} et 1/5000^{ème}). Les morceaux d'alumine poreuse sont collés à l'intérieur d'une poche plastique, face avec les électrodes au-dessus. Le mélange PBS/anticorps est ensuite introduit dans la pochette. Celleci est scellée et mise à agitation toute la nuit. Après réaction, les supports sont récupérés, lavés une première fois au PBS, puis à l'eau distillée avant d'être séchés sous flux d'azote et stockés.

b) Via création de liaison covalente

 Fixation de l'anticorps par l'intermédiaire d'un bras espaceur : (3aminopropyl)triethoxysilane (APTES).



Formation de liaison covalente (liaison amide) après activation du silane

Figure 22: La création de liaison covalente : Fixation de l'élément de reconnaissance biologique (noté BRE) sur le support avec l'intermédiaire d'un bras espaceur.

La fixation du (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES, 99%, Sigma Aldrich) se fait sous atmosphère inerte. L'échantillon d'alumine poreuse est mis dans une solution d'APTES à 2% dans du toluène chauffé à 60°C pendant deux heures, sous agitation faible. L'échantillon est ensuite lavé au toluène puis séché. L'étape suivante est l'accrochage de l'anticorps commercial via l'extrémité amine du triethoxysilane. Pour cela, une solution d'anticorps activés comportant un mélange N-N'dicyclohexylcarbodiimide (DCC)/N-hydroxysuccinimide (NHS) (Sigma Aldrich) est préparée. Le mélange comportant 0.5g de DCC et 0.3g de NHS est préalablement préparé dans 25ml dioxane. 100µl de cette solution d'activation est ensuite pris pour être dilué dans 900µl de PBS (*Phosphate Buffered Saline* pH 7, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,76mM KH₂PO₄) en présence d'anticorps au rapport 1/2000^{ème}.

L'échantillon d'alumine est plongé dans la solution d'anticorps activés pendant 2 heures à température ambiante. Une fois la réaction terminée, l'échantillon est rincé, d'abord au PBS, puis à l'eau distillée deux fois durant 30 secondes pour enfin être séché sous flux d'azote et stocké en boite hermétique.

• Fixation de l'anticorps via la protéine A elle-même fixée par l'intermédiaire d'un silane.

Le but de cette expérience est l'emploi de protéine A pour une orientation des anticorps commerciaux. Les anticorps seront fixés via leur domaine Fc par adsorption sur la protéine A préalablement fonctionnalisée à l'alumine poreuse.

Comme précédemment, les échantillons d'alumine poreuse subissent une étape de fonctionnalisation d'APTES sous atmosphère inerte. Une fois cette étape effectuée, les échantillons sont plongés dans une solution contenant 100µg/ml de protéine A (Sigma Aldrich 1578805) activée à l'aide du mélange DCC/NHS pendant deux heures à température ambiante (aux mêmes proportions que précédemment). Une fois la réaction terminée, l'échantillon est rincé, d'abord au PBS, puis à l'eau distillée durant 30 secondes pour enfin être séché sous flux d'azote.

Les échantillons sont ensuite bloqués par une solution de lait écrémé à 5% pendant deux heures, afin de permettre une spécificité de fixation de l'anticorps anti-MMP9 à la protéine A. Une fois les échantillons lavés au PBS, ils subissent une étape d'adsorption comme précédemment mentionné avec une solution d'anticorps anti-MMP9 au 1/2000^{ème} diluée dans du PBS pendant 12 heures en pochon scellé.

Après réaction, les supports sont lavés une première fois au PBS, puis à l'eau distillée avant d'être séchés sous flux d'azote et stockés.

3.2.2- Avec le VHH commercial

Une preuve de concept avec fonctionnalisation d'un VHH tiers a été élaborée pendant le projet afin de la comparer au système utilisant l'anticorps conventionnel dirigé contre MMP9. Le VHH commercial choisi pour cette étape est dirigé contre la Green Fluorescent Protein (GFP) (GFP VHH recombinant binding protein, Chromotek gt-250) et possède un domaine C-terminal terminé par 6 résidus histidine pour faciliter sa purification et permettre une orientation de sa fixation sur les supports. Pour les expériences de fixation du VHH sur les supports d'alumine poreuse, trois pH ont été étudiés : 7.5 ; 8.5 ; et 9.2. Les morceaux d'alumine poreuse sont collés à l'intérieur d'une poche plastique, face avec les électrodes audessus. Le mélange PBS/VHH aux différents pH et à une concentration de 4μ g/ml est introduit dans la pochette qui est ensuite scellée et mise sous agitation toute la nuit à 4°C. Après

réaction, les supports sont lavés une première fois au PBS, puis à l'eau distillée avant d'être séchés et stockés.

Tous les échantillons greffés, que ce soit de manière covalente ou par adsorption, subissent une étape supplémentaire de « *blocking* » avant toute analyse. Cette étape permet le blocage des sites non greffés, diminuant ainsi les interactions parasites (autres qu'entre l'anticorps et la cible) sur les supports. Pour cela, les échantillons sont déposés dans une solution de lait écrémé à 5% dans du PBS pendant deux heures. Ils sont ensuite récupérés, rincés à l'eau distillée et séchés avant d'être stockés en boîte hermétique à l'abri de la lumière.

3.3/Validation de la fonctionnalisation des biocapteurs

3.3.1- Tests biologiques

a) Avec l'anticorps conventionnel

• Quantification de l'anticorps commercial Anti-MMP9

Ces tests sont dérivés du test ELISA (paragraphe 1.3.1, *Quantification par technique ELISA*). Les échantillons précédemment fonctionnalisés (via adsorption ou fixation covalente) ainsi que des morceaux d'alumine poreuse nus sont découpés en carrés de 3mm sur 3mm, la partie faisant office de biocapteur avec les électrodes étant mise de côté pour les expériences électriques. Chaque carré obtenu est pesé, mis dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et annoté. Les morceaux sont ensuite récupérés et lavés au PBS. Le but de l'expérience étant d'avoir des informations semi-quantitatives sur la quantité d'anticorps anti-MMP9 présente sur le support, l'étape suivante est la fixation d'un anticorps secondaire (*Stabilized Goat Anti-Rabbit IgG, (H+L) Peroxidase Conjugated*, Thermo Scientific, No : 32460, lot : LK152969) spécifique de l'anticorps précédemment fixé aux supports. Cet anticorps est dilué dans du PBS au 1 /2000^{ème} et déposé sur les supports pendant deux heures. Certains supports contrôles négatifs ne

Les supports sont une nouvelle fois lavés puis 100µl de solution de révélation sont ajoutés. Les échantillons sont laissés une heure à température ambiante. L'ABTS agit en tant que substrat de l'enzyme peroxydase et amène une coloration bleue lorsque les anticorps secondaires sont présents sur les supports analysés.

Enfin, le milieu réactionnel est récupéré et déposé dans une plaque 96 puits avant d'être analysé par spectrophotométrie à 415nm. Les données brutes obtenues sont par la suite traitées, la densité optique de chaque échantillon étant ramenée à sa surface pour obtenir des valeurs de densité optique par mm² d'alumine.

• Quantification de la MMP9 après analyses électriques

subissent pas cette étape, et ne reçoivent que du PBS.

Les échantillons précédemment fonctionnalisés ainsi que des morceaux d'alumine poreuse nus bloqués ayant été mis en contact avec des concentrations croissantes de MMP9 sont récupérés puis découpés en carrés de 3mm sur 3mm. Chaque carré obtenu est pesé, mis dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et annoté. Comme précédemment, les morceaux sont lavés au PBS. Le but de l'expérience étant d'avoir des informations semi-quantitatives sur la quantité de MMP9 présente sur le support, l'étape suivante est la fixation d'un anticorps primaire (*Mouse monoclonal [56-2A4] to MMP9*, Abcam ab58803) différent de l'anticorps précédemment fixé aux supports. Cet anticorps est dilué dans du PBS au 1 /1000^{ème} et déposé sur les supports pendant deux heures. Les supports sont ensuite lavés et l'anticorps secondaire (*Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP,* Thermo Scientific 62-6520) spécifique de l'anticorps primaire est déposé au rapport 1 /2000^{ème} pendant deux heures.

Les supports sont une nouvelle fois lavés puis 100µl de solution de révélation sont ajoutés aux tubes Eppendorfs.



Figure 23: ELISA sur alumine : vérification de la présence de MMP9 sur les supports greffés avec l'anticorps. Dépôt d'anticorps primaire et secondaire, suivi d'une révélation et d'une quantification en spectrophotométrie. Des lavages sont effectués entre chaque étape, permettant l'élimination d'interactions non spécifiques.

Les échantillons sont laissés une heure à température ambiante. Le milieu réactionnel est récupéré et déposé dans une plaque 96 puits avant d'être analysé par spectrophotométrie à 415nm. Les données brutes obtenues sont par la suite traitées comme expliqué précédemment (paragraphe 3.3.1.a), *Avec l'anticorps conventionnel*).

b) Avec le VHH commercial

La préparation des échantillons et l'étape de lavage sont similaires au paragraphe 3.3.1.a), Avec l'anticorps conventionnel. Le but de cette expérience est d'évaluer l'efficacité du dépôt de VHH à différents pH, ainsi que leur capacité à accrocher la GFP lors des expériences électriques (voir paragraphes 3.4.2, Mesure d'ajouts de molécule cible sur échantillons nus et fonctionnalisés : expériences de saturation : sensibilité du biocapteur et 3.4.3, Mesure d'ajouts de sérum humain dopé sur échantillons nus et fonctionnalisés : spécificité du biocapteur). Après trois lavages au PBST, l'anticorps commercial anti-GFP (*Anticorps Rabbit polyclonal anti GFP* abcam ab290) dilué au 1/1000^{ème} est déposé dans les tubes Eppendorfs et laissé deux heures à température ambiante.

Les supports sont une nouvelle fois lavés trois fois au PBST et un anticorps de révélation (*Stabilized Goat Anti-Rabbit IgG, (H+L) Peroxidase Conjugated*, Thermo Scientific, No : 32460, lot : LK152969) dilué au 1/2000^{ème} est déposé au contact des différents échantillons et laissé deux heures à température ambiante. Enfin, après de nouveaux lavages, 100µl d'ABTS sont ajoutés dans les tubes Eppendorfs et les échantillons sont laissés une heure à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite récupéré et déposé dans une plaque 96 puits avant d'être analysé par spectrophotométrie à 415nm.Les données brutes obtenues sont par la suite traitées comme expliqué précédemment (paragraphe 3.3.1.a), *Avec l'anticorps conventionnel*).

3.3.2- Tests d'imagerie

Les expériences de microscopie électronique à balayage (MEB) ont été effectuées sur un microscope Quanta FEG 200 (FEI France, Thermo Scientific) équipé d'un système de microanalyse à sélection d'énergie (EDS) avec un détecteur SDD (Oxford Instruments Oxford Inca 350). Les supports ne nécessitent aucune préparation préalable avant analyse.

3.4/Tests électriques

Les échantillons préalablement fonctionnalisés sont analysés sur banc de mesure électrique (Cf figure 24) afin de déterminer une méthode de lecture fiable pour le biocapteur, de voir l'effet des fonctionnalisations et enfin de voir les limites de saturation des supports avec des expériences d'ajouts successifs de protéine (MMP9 ou GFP, suivant la cible étudiée) diluée dans du PBS (conditions simples) puis en conditions complexes, diluée dans du sérum humain. Bien que notre objectif soit de nous projeter vers une utilisation normale du pansement connecté pour une plaie chronique avec son environnement humide, nous avons choisi, dans les mesures électriques présentées dans cette partie, d'effectuer les mesures après rinçage à l'eau distillée et séchage sous flux d'azote de la surface fonctionnalisée. Ces expériences nous permettent donc de démontrer une preuve de concept sur la correspondance entre notre ERB et sa cible.



Figure 24: Banc de mesure électrique : le capteur capacitif est placé sur le banc comme indiqué sur les images A et B. L'échantillon d'alumine poreuse fonctionnalisé (C) est ensuite testé via l'analyseur d'impédance (D).

Les échantillons d'alumine poreuse sont testés via un analyseur d'impédance HP 4192A relié à un ordinateur muni du logiciel LabVIEW. Une calibration de l'analyseur a été faite en circuit fermé / circuit ouvert pour éviter toute capacité parasite provenant des deux sondes de mesure sur la gamme de fréquence utilisée. Cette calibration a ensuite été validée en mesurant des capacités de précision issues du commerce.

Lors de cette mesure, le capteur capacitif fonctionnalisé peut être assimilé au modèle électrique présenté en figure 25. Celui-ci se compose de deux impédances identiques, formées par une résistance (Ri) en parallèle avec une capacité (Ci). Nous avons en effet une impédance liée à la structure poreuse (R_{Po}, C_{Po}) et une seconde en lien avec la fonctionnalisation biologique (R_F, C_F). Les électrodes de mesures sont positionnées entre les points A et B, et l'analyseur d'impédance HP 4192A est configuré afin de donner directement la valeur de R_P et C_P, ces dernières étant issues du modèle électrique parallèle.



Figure 25: Modélisation électrique du biocapteur capacitif à base d'alumine poreuse fonctionnalisée. Le schéma de droite représente la modélisation de la mesure électrique sur l'analyseur d'impédance. Légende : A et B : points de prise de mesures (électrodes), F : fonctionnalisé, Po : poreux.

A partir des valeurs obtenues de R_P et C_P, nous pouvons déterminer l'impédance électrique Z_{AB} entre les points A et B ainsi que son module $|Z_{AB}|$.



3.4.1- Mesures d'échantillons bruts

Ces expériences préliminaires ont été faites pour les échantillons fonctionnalisés avec l'anticorps conventionnel uniquement. Les mesures préliminaires sont faites sur des fréquences allant de 5Hz à 1MHz, afin de voir le comportement du support sur de grandes variations de fréquences. Les valeurs de capacitances ainsi obtenues sont analysées afin de comparer les deux méthodes de fixation de l'anticorps commercial sur le support d'alumine poreuse pour, à terme, obtenir un modèle de mesure répétable entre les supports pour chaque mode de fonctionnalisation étudié.

3.4.2- Mesures d'ajouts de molécule cible sur échantillons nus et fonctionnalisés : expériences de saturation : sensibilité du biocapteur



Figure 26: Représentation schématique du support : expérience de saturation : le cas de l'anticorps commercial

Les différents échantillons fonctionnalisés, lavés et séchés sont analysés une première fois, puis sont mis en contact avec une solution de MMP9 recombinante à une concentration de 500ng/ml pour les échantillons fonctionnalisés avec l'anticorps conventionnel ou avec une solution de GFP (*Green Fluorescent Protein*, abcam ab84191) à 2µg/ml pour les échantillons fonctionnalisés avec le VHH. Ces concentrations en protéine cible ont été déterminées en amont. Ils sont ensuite rincés à l'eau distillée et séchés sous flux d'azote avant d'être analysés à nouveau. Les analyses se font à des fréquences basses comprises entre 10 et 100 kHz et le pas de mesure est de 1KHz. L'expérience est répétée autant de fois que nécessaire pour arriver à une saturation du support. Les données brutes sont ainsi récupérées et traitées sur le logiciel Origin.

3.4.3- Mesures d'ajouts de sérum humain dopé sur échantillons nus et fonctionnalisés : spécificité du biocapteur

Ces expériences sont similaires à celles expliquées au paragraphe 3.4.2, *Mesure d'ajouts de molécule cible sur échantillons nus et fonctionnalisés : expériences de saturation : sensibilité du biocapteur,* la MMP9 et la GFP étant diluées dans du sérum humain (Biowhittaker 14-402 E) aux mêmes concentrations que précédemment (respectivement 500ng/ml et 2µg/ml). Un inhibiteur de protéases (cOmpleteTM Protease Inhibitor Cocktail 11697498001) a été ajouté aux différentes solutions.

Chapitre 3-Résultats : De l'ERB au

pansement connecté.

Partie I : La recherche de l'élément de reconnaissance biologique

1.1/ Choix de la cible

Comme développé précédemment dans la partie « objectif de mon projet de thèse », l'étude bibliographique préalable nous a amené à nous focaliser sur le type de plaie chronique à étudier ainsi que sur la cible moléculaire la plus pertinente pour l'élaboration d'un dispositif de pansement connecté permettant le suivi de la plaie. Ma thèse repose donc sur l'élaboration d'un biocapteur intégré à un système de pansement intelligent afin de détecter le taux de MMP9 chez les patients diabétiques atteints de plaies au niveau du pied.

Les précédents choix étant validés, l'étape suivante était l'élaboration d'une stratégie d'obtention de ce biocapteur avec trois phases essentielles : l'obtention de l'ERB, l'immobilisation de celui-ci sur un support poreux flexible et la mise au point d'un prototype fonctionnel.

Mais avant cela, pour mener à bien ce projet, d'importantes quantités d'enzyme cible MMP9 devaient être produites. Au départ, une enzyme commerciale fonctionnelle (M8945-10UG, Sigma Aldrich) a été utilisée, mais le coût important de celle-ci (10µg pour 643€) et les besoins en quantité grandissants, nous avons été amenés à élaborer une nouvelle stratégie d'obtention pour cette enzyme.

La solution idéale fut de passer par un système de production en baculovirus, permettant l'obtention de grandes quantités en MMP9 fonctionnelle et purifiée.

1.2/ Production et caractérisation de la MMP9 recombinante

1.2.1- Élaboration du système de production en baculovirus

Pour les besoins du projet, l'équipe CNRS *Baculovirus et Thérapie* de Saint-Christol-Lès-Alès, spécialisée dans l'utilisation du système d'expression baculovirus/cellules d'insectes pour la production de protéines recombinantes a été mise à contribution.

Le système baculovirus/cellules d'insectes est un système simple et rapide qui permet la production de protéines recombinantes fonctionnelles présentant les mêmes caractéristiques que la protéine naturelle. A part la présence de glycannes plus simples, de type paucimannosidique, la grande majorité des modifications post-traductionnelles sont

effectuées par les cellules de lépidoptères. C'est la raison pour laquelle ce système a été choisi pour produire la MMP9 recombinante. Un motif 6-His a été ajouté en C-terminal de la protéine pour pouvoir la purifier plus facilement. La construction du baculovirus recombinant a été réalisée par Thomas Janson, stagiaire en Licence 3 Biologie à l'Université de Nîmes.

Les premières expériences de caractérisation effectuées sur la protéine recombinante brute sécrétée dans le milieu de culture purifié montrent que cette protéine à la masse molaire attendue, 92kDa (figure ci-dessous) et qu'elle présente une activité gélatinase.



Figure 27: Mise en évidence de la protéine recombinante MMP9 par Western Blot.

A, B, et C : Extraits cellulaires préparés à partir de cellules infectées avec 3 clones de baculovirus recombinants indépendants (D4051, D4052 et D4056). T : Échantillon contrôle : sérum de veau. PC : 75µg de MMP9 commerciale (Sigma Aldrich, M8945-10UG).

1.2.2- Caractérisation de la MMP9 recombinante

Suite aux expériences préliminaires présentées précédemment, un nouveau *batch* de MMP9, cette fois-ci en plus grande quantité, a été produit et purifié par l'équipe *Baculovirus et Thérapie*. Cette MMP9 m'a été confiée (1ml à 0,8mg/ml) afin de faire les tests de caractérisation nécessaires avant toute utilisation.

J'ai effectué trois types d'expériences afin de caractériser cette enzyme : un Western Blot, permettant la détection et l'identification de la protéine recombinante, un test ELISA sur plaque afin d'avoir une comparaison entre la MMP9 produite et la MMP9 commerciale suivant une gamme de concentration prédéfinie et une zymographie sur gel gélatinase afin d'avoir des informations sur la taille et l'activité de l'enzyme produite.



Figure 28: Comparaison MMP9 recombinante/MMP9 commerciale : ELISA. Représentation de la mesure de densité optique à 415nm en fonction de la quantité de MMP9 déposée dans les puits en ng.

Cette expérience, répétée trois fois, montre une diminution de signal de l'ordre de 46% en moyenne pour la MMP9 recombinante.



Figure 29: Zymographie sur gel gélatinase : comparaison MMP9 recombinante/MMP9 commerciale. Gel à 7.5% en polyacrylamide avec 0.1% de gélatine. Dépôts théoriques de 25 et 50ng (de gauche à droite) de MMP9 recombinante et commerciale. Une diminution de signal de l'ordre de 35% entre la MMP9 commerciale et la MMP9 produite est observée sur cette expérience (quantification ImageJ).



MMP9 recombinante MMP9 commerciale

L'analyse en Western blot effectuée avec un dépôt de 50ng calculés de chacune des MMP9 montre qu'il y a beaucoup plus de MMP9 dans l'échantillon commercial.

Cette différence peut s'expliquer de plusieurs manières, (i) La MMP9 commerciale est beaucoup plus concentrée qu'indiquée. En effet, les données fournisseur ne sont pas très précises « *concentration supérieure ou égale à 0.25mg/ml* » celle-ci pouvant varier suivant les *batchs* (ii) La concentration de la MMP9 recombinante produite au laboratoire n'a pas été correctement évaluée. Cette dernière hypothèse a été éliminée puisque deux dosages BCA effectuées par deux laboratoires différents ont donné la même mesure de concentration que précédemment, à savoir 0.8mg/ml.

La MMP9 recombinante qui présente une masse moléculaire correcte et une activité gélatinase a donc été validée pour la poursuite des travaux.

1.3/ Recherche de l'ERB à partir de banques commerciales

Sélection de l'ERB par la technique du « phage display »

1.3.1- Type d'ERB

La première phase expérimentale de mon projet de thèse a été la recherche d'un ERB spécifique à la MMP9. Plusieurs possibilités ont été étudiées pour ce projet, chacune présentant avantages et inconvénients.

Figure 30: Western-Blot : Film photographique après révélation pour la MMP9 recombinante (gauche) vs MMP9 commerciale (droite). Dépôts en enzyme MMP9 de 50ng.



Figure 31: ERB potentiels : Anticorps conventionnel, VHH et peptides ; avantages et inconvénients.

Très tôt, il a été déterminé que l'anticorps conventionnel déjà disponible dans le commerce (IgG conventionnelle dirigée contre MMP9) pourrait être utilisé dans le cadre de l'élaboration d'une preuve de concept, notre objectif premier étant d'obtenir un ou plusieurs ERB spécifiques originaux. En effet, ce type de molécule est déjà largement utilisé en tant qu'ERB dans plusieurs domaines notamment pour l'élaboration de tests de type ELISA permettant un dosage immuno-enzymatique de molécules sur support solide. A titre d'exemple, Milne et al., (<u>Milne</u> et al., *Proceedings of the 2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 2014) utilise déjà cette méthode dans l'élaboration de son capteur à MMP9 (paragraphe 3.3.2.2-e) *Les métalloprotéases matricielles*).

Parmi ces nouvelles molécules, les VHH semblaient présenter toutes les qualités requises pour une telle utilisation. Les VHH sont de petites protéines de 15kDa isolées à partir des domaines variables des chaines lourdes d'anticorps de camélidés. Ces fragments d'anticorps présentent la particularité d'être environ 10 fois plus petits que les anticorps conventionnels.

87



Figure 32: L'Anticorps conventionnel vs l'anticorps de camélidé. Le VHH est isolé à partir des domaines variables des chaînes lourdes des anticorps de camélidé.

Ils constituent une cible de choix dans l'élaboration d'un biocapteur car ils sont résistants à des variations extrêmes de température et de pH (<u>Van der Linden</u> et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, <u>Dumoulin</u> et al., *Protein Science*, 2002). Ces protéines présentent également l'avantage de pouvoir être produites en grande quantité en système microbien, réduisant ainsi les coûts de production.

J'ai également étudié la possibilité d'utiliser un ERB à base de peptide. Ces fragments dont la taille n'excède pas les 50 acides aminés ont la particularité d'être relativement solubles et ont été étudiés dans de nombreux projets au cours des dernières décennies. Ils ont l'avantage de pouvoir être synthétisés chimiquement, amenant là aussi une facilité de production en grande quantité. En ce qui concerne les dispositifs connectés, les travaux de Biela et al., (<u>Biela</u> et al., *Biosensors and Bioelectronics*, 2015) utilisent un peptide clivable par la MMP9 dans l'élaboration de leur biocapteur pour le suivi des plaies chroniques.

Ainsi, au démarrage de cette thèse, je disposais donc de l'anticorps commercial anti-MMP9 (abcam ab76003), et de différents matériels pour isoler des ERB originaux : deux banques de phage display commerciales présentant des peptides de 7- et 12-mer (*NEB*, E8110S, E8100S) et un mélange de trois banques VHH naïves fournies par la société CamInnov.

1.3.2- Principe du phage display

La méthode de choix pour identifier une molécule possédant une affinité pour une cible donnée est la méthode du Phage display, méthode décrite pour la première fois par George P. Smith en 1985 (Smith, Science, 1985), lors de la démonstration de la présentation de peptides à la surface d'un phage filamenteux grâce à la fusion du peptide d'intérêt à un gène spécifique du phage. Cette méthode a ensuite été perfectionnée au fil du temps, notamment grâce à McCafferty et Winter (McCarfferty et al., Nature, 1990) pour la présentation d'anticorps à domaines variables à la surface des phages pour un criblage dirigé contre un antigène spécifique.





Les banques de phages comportant à leur surface des VHH ou des peptides (suivant le type de banque étudiée) sont présentés à la molécule d'intérêt préalablement immobilisée (ici MMP9). Des lavages successifs permettent l'élimination des phages non spécifiques. Les phages possédant une affinité potentielle pour la cible sont ensuite élués et amplifiés pour subir un nouveau tour de sélection.

Cette technique de criblage *in vitro* repose sur l'élaboration d'une banque, spécifique ou non, contenant des virus ou phages ayant deux particularités : ils n'infectent que les bactéries et ont la capacité de présenter à leur surface des protéines ou des peptides. Ces phages peuvent ainsi présenter des ERB potentiels qui pourront être sélectionnés en présence d'une molécule cible préalablement immobilisée. Les phages comportant à leur surface un ERB possédant une affinité pour la cible restent alors fixés sur celle-ci là où les phages dits non spécifiques sont éliminés. Les phages ainsi fixés sont ensuite récupérés et criblés à nouveau lors d'un nouveau tour de sélection. Le but est de se débarrasser au maximum des phages non spécifiques. En général, 2 à 5 tours de *screening* sont nécessaires afin de sélectionner une ou plusieurs molécules « *hit* » possédant une bonne affinité pour la cible étudiée.

1.3.3- Sélection à partir de banques naïves

Cette sélection a été faite à partir d'un protocole fourni par la société CamInnov, société spécialisée dans l'élaboration et le criblage de banques d'anticorps de camélidé.

Trois tours ont été faits pour chaque banque étudiée (VHH et peptidiques).



Figure 34: La recherche de l'ERB.

Suite au phage display, les phages présentant à leur surface une molécule possédant une affinité potentielle pour la cible sont analysés par ELISA afin de subir une nouvelle étape de sélection par quantification de l'affinité ERB/cible. Les ERB sélectionnés sont ensuite séquencés, pour vérifier l'intégrité des séquences ADN. Suite à cela, les ERB sont produits en grandes quantités afin de faire des tests d'affinité complémentaires afin de les valider ou non comme ERB spécifique à MMP9.

Comme expliqué précédemment, le phage display permet la sélection d'un ou plusieurs phages présentant à leur surface une molécule possédant une affinité pour la cible étudiée. Une fois cette première étape terminée, le ou les phages ainsi sélectionnés vont être récupérés et analysés via ELISA, afin de vérifier la spécificité entre le *hit* et la cible MMP9. Par la suite, leur ADN est extrait pour être séquencé et inséré dans un vecteur d'expression spécifique pour production de la molécule en grande quantité. La dernière étape est une nouvelle vérification d'affinité entre la molécule produite et la cible. Le protocole complet de ces différentes expériences est détaillé dans la partie Matériel et Méthodes, paragraphe II. Utilisation de la technique de phage display pour la sélection d'un ERB.

Les résultats obtenus pour les différentes banques testées (VHH naïve, peptidique 7-mer et 12-mer) sont présentés ci-après.

1.3.2.1- Tours de sélection I à III

Chacune des banques étudiées a subi trois expériences de sélection différentes sur la cible MMP9. Pour chaque expérience de criblage, trois tours de *screening* ont été effectués (Matériel et méthodes, *2.1- Sélection de l'ERB*).

A l'issue de chaque expérience de phage display, 384 colonies ont été isolées. Chaque colonie repiquée présente des phages comportant la même séquence ADN ce qui donne un total de 384 ERB potentiel.

Ces colonies ont ensuite été amplifiées afin d'être analysées par ELISA.

Les expériences réalisées avec les banques VHH se sont déroulées comme prévu avec le protocole fourni. En revanche, les expériences faites à partir des banques peptidiques se sont avérées plus compliquées. Le protocole fourni par le fournisseur spécifiait qu'avant toute utilisation des banques peptidiques, une étape d'amplification devait être effectuée. J'ai donc suivi le protocole fourni à la lettre, mais je n'ai obtenu aucun clone à l'issue de cette étape d'amplification. Après plusieurs tentatives infructueuses, j'ai finalement décidé d'utiliser les banques telles qu'elles sans cette étape préalable. Par la suite, lors des premières expériences avec les banques non amplifiées, aucune colonie n'apparaissait sur les boîtes de pétri à l'issue du premier tour de sélection et ce malgré la répétition des expériences et l'augmentation de la quantité de phages déposés. Pour parer à ce problème, une adaptation du protocole a à nouveau été nécessaire afin de pouvoir faire un screening des banques peptidiques fournies.

1.3.2.2- Recherche des clones spécifiques : Tests ELISA

Chaque phage isolé précédemment a été testé par ELISA pour son affinité pour MMP9. La MMP9 a été adsorbée sur une plaque dite « Contrôle positif », une plaque « Contrôle négatif » a été adsorbée suivant le même protocole mais avec le tampon de *coating* uniquement comme détaillé dans la partie Matériel et Méthodes (paragraphe 2.2, *Analyse par ELISA des phages sélectionnés pour la cible MMP9*). Chaque clone est ensuite transféré puits par puits

sur les plaques tests, suivi par un dépôt d'anticorps primaire puis secondaire marqué permettant une révélation par spectrophotométrie.

Un phage est considéré comme comportant un « *hit* » lorsque le rapport des densités optiques à 415nm des puits positif/négatif est supérieur ou égal à 2.

J'ai obtenu les résultats suivants :

- Banque VHH : 4 puits positifs nommés VHH1, VHH2, VHH3 et VHH4
- Banque peptidique 12-mer : 2 puits positifs nommés SP1 et SP2
- Banque peptidique 7-mer : aucun puits positif

Les expériences de criblage ont donc abouti à la sélection d'un grand nombre de clones bactériens. Malgré cela, la recherche de clones spécifiques pour l'enzyme MMP9 n'a apporté que peu de résultats. Si on considère qu'en général lors d'un phage display classique, nous passons de 2x10¹² phages potentiels à 1 à 10 ERB par type de banques testées, ces résultats sont faibles bien qu'attendus, puisque les banques testées ne présentaient pas de spécificité particulière pour la cible MMP9.

1.3.2.3- Séquençage des clones sélectionnés

L'ADN des phagemides positifs a été extrait et purifié pour être ensuite séquencé par un organisme externe (GATC Biotech, maintenant Eurofins genomics). Cette étape permet de vérifier l'intégrité des séquences obtenues à l'issue du phage display, notamment la présence ou l'absence des différents domaines structuraux nécessaires à l'obtention d'un ERB fonctionnel ou encore la présence éventuelle d'un codon stop en milieu de séquence, la rendant ainsi inexploitable. Les séquences d'acides aminés obtenues à l'issue de ce séquençage sont exposées ci-dessous :

Séquence VHH1

DVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGFTFGDYAMGWFRQVPGKECELVAKIKNDGTVTNIIPSLRGRFTF SRDNDKHVVYLEMTSLQPSDTAVYFCAPSGQVWCSGQGTQVTVSSAAAAHHHHHHGAEQKLISEEDLS *

Séquence VHH2

DVQLQESGGGSVQPGGSLRLSCATSGFTFGIYNMNWLRQAPGKGLEWVSYIQSDGDETYYADFVKGRFT ISRDNAKNTLYLQMNNLKSDDTGLYYCAAGSATKFGYYAWGQGTQVTVSSAAAAHHHHHHGAEQKLISE EDLS*

Séquence VHH3

DVQLQMISLKPEDTGIYSCAARRPWRDGSCHLDVHFDYWGQGTQVTVSSAAAAHHHHHHGAEQKLISE EDLS*

Séquence VHH4

DVQLQESGGGLVQPGGSLTLSCVASGFTASNYWMFWVRQAPGKGLEWVSSIYTGGDITYYADSVKGRFTI SRDNARNTVYLQMNSLKSEDTALYTCEISQLRGRGTQVTVSSAAAAHHHHHHGAEQKLISEEDLS*

Séquence peptidique SP1

MKKSLVLKASVAVATLVPMLSFAAEGDDPAKAAFNSLQASATEYIGYAWAMVVVIVGATIGIKLFKKFTSKA S*

Séquence peptidique SP2 MPSFGAEGGDPAKAAFNSLQASAAEYIGYAWAMVVVLVGANIGIQLVKKFPLKAR*

Le code couleur exposé ici permet simplement de mettre en évidence les similarités de séquence pour respectivement les séquences VHH et les séquences peptidiques.

Concernant les séquences VHH, celles-ci présentent la structure habituelle représentée dans la littérature (<u>Govaert</u> et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2011) avec la présence de régions charpentes (*Frameworks*) et de domaines CDR (*Complementary Determining Region*). Le schéma ci-après permet de mieux comprendre la structure recherchée.

FR1 CDR1 FR2 CDR2 DVQLQESGGGSVQPGGSLRLSCATS GFTFGIYN MNWLRQAPGKGLEWVSY IQSDGDET FR3 CDR3 FR4 YYADFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLKSDDTGLYYC AAGSATKFGYYA WGQGTQVTVSS His-Tag Myc-Tag AAAAHHHHHHGAEQKLISEEDLS*

Figure 35: Séquence en acides aminés du VHH : l'exemple de VHH2. FR : régions charpentes (Framework), CDR : régions variables (Complementary Determining Regions), His-Tag : étiquette 6 histidines, Myc-Tag : étiquette Myc.

Les domaines CDR correspondent aux parties hypervariables des anticorps, contribuant ainsi à leur diversité et à la reconnaissance spécifique d'une grande variété d'antigènes. Les régions charpentes sont quant à elles plus conservées. Comme leur nom l'indique, elles constituent la structure de base des VHH. En plus de ces différents domaines, les VHH étudiés ici présentent un enchaînement de six histidines en fin de séquence. Ce domaine porte le nom de His-Tag et est mis à profit notamment pour la purification de VHH sur billes de type Ni-NTA (les billes interagissent avec le noyau imidazole des histidines) ou encore pour les phénomènes de détection avec l'utilisation d'anticorps anti-His commerciaux. Enfin, ces VHH possèdent également une autre étiquette appelée Myc-Tag. A l'image du His-Tag, cette étiquette spécifique permet aussi la reconnaissance de la séquence VHH, notamment lors des expériences ELISA où l'utilisation d'un anticorps anti-Myc est possible.

Cette structure caractéristique est retrouvée chez trois des quatre VHH séquencés, le VHH3 présentant une structure plus courte que les autres avec seulement le domaine FR4 complet.

Les séquences peptidiques présentent elles aussi des similarités de séquence, bien qu'ayant des tailles différentes. De plus, ces similarités de séquence ne se trouvent pas aux mêmes positions dans l'enchaînement des acides aminés, le SP1 présentant 18 acides aminés supplémentaires en position N-terminale. Ce manque d'homogénéité dans la taille des séquences semble être issu de remaniements de plusieurs enchainements d'acides aminés. Si on se réfère au protocole fournisseur, la séquence 12-mer potentiellement spécifique pour la cible étudiée doit se trouver directement en position N-terminale de la séquence, suivie par un « insert » de trois glycines et du primer de séquençage de 28 acides aminés. Cependant, aucune des séquences obtenues ne possède cette structure Au-delà de ce constat, nous observons, a l'image des séquences VHH différents domaines conservés au niveau de ces séquences peptidiques (domaines en bleu, rose et rouge).

Sur les 6 séquences obtenues, seulement 3 semblent exploitables pour la suite du projet. La séquence VHH3 étant plus courte que les autres avec des domaines manquants a été éliminée car ne permet pas l'obtention d'un VHH fonctionnel. Les séquences peptidiques, bien que présentant des similarités de séquences avec des domaines se répétant ont également été éliminées. En effet, celles-ci présentaient un signal relativement faible lors des expériences ELISA (respectivement 1.8 et 1.9 fois plus élevés que le contrôle négatif). Le signal obtenu devant être supérieur ou égal à 2 au départ, nous avions quand même choisi d'envoyer ces peptides au séquençage mais nous avons déterminé plus tard que ces peptides ne

94

présentaient finalement pas une affinité suffisante pour être considéré comme ERB potentiel pour une utilisation sur des mélanges complexes (exsudats de plaies).

1.3.2.4- Production des clones pour tests de spécificité

Les VHH « *hits* » sélectionnés précédemment, VHH1, VHH2 et VHH4, ont été produits en grande quantité afin de pouvoir faire des tests d'affinité complémentaires vis à vis de la MMP9. Pour ce faire, les fragments d'ADN codant les différents VHH ont été isolés du vecteur original pour être intégrés dans un vecteur optimisé pour la production. Ce vecteur, pET-22b, permet l'expression de protéines recombinantes chez *E. coli.* et possède un promoteur T7 qui contrôle, dans la bactérie hôte, la transcription du gène inséré par la T7 ARN polymérase.



Figure 36: Coupure enzymatique et insertion de la séquence ADN VHH dans le vecteur d'expression pET-22b. Ncol, Notl : Enzymes de restriction.

Les plasmides générés ci-dessus ont ensuite été intégrés dans les bactéries BL21 pour la production.

Cette étape s'est avérée plus complexe que prévu. En effet, les nouvelles constructions plasmidiques en pET-22b ont été difficiles à obtenir (problèmes de ligation, de digestion...). Après de multiples essais infructueux, nous avons obtenu les constructions finales pour pouvoir produire les 3 VHH.

Après extraction des bactéries, les VHH obtenus ont été purifiés sur billes de Ni-NTA et analysés sur gel SDS-PAGE.



Figure 37: Gel SDS-PAGE à 18% en polyacrylamide. Coloration au bleu de Coomassie. Visualisation de la production de VHH. La bande obtenue doit être aux alentours des 15kDa.

Le gel ainsi obtenu présente des bandes aux alentours des 15kDa, poids moléculaire caractéristique des VHH.

Après purification, analyse sur gel SDS-PAGE, et concentration (volume final : 1ml par VHH) la production a été évaluée au Nanodrop.

[VHH1]= 5,966 mg/ml [VHH2]= 1,607 mg/ml [VHH4]= 9,597 mg/ml

• Tests d'affinité des VHH produits vis à vis de la cible MMP9

La dernière étape de la recherche d'ERB à partir de banques naïves consistait à tester l'affinité des VHH produits précédemment vis-à-vis de la MMP9. Bien qu'ayant montré un rapport contrôle positif/contrôle négatif supérieur à 2 lors de l'ELISA des phages sélectionnés, de nouveaux tests de spécificité de liaison VHH/MMP9 sont nécessaires afin de valider ces VHH comme ERB potentiels pour le développement du pansement intelligent. Les différentes expériences ont donné les résultats suivants :



Figure 38: Test de spécificité VHH1, 2 et 4 vs MMP9 (n=6). Représentation de la densité optique à 415 nm pour les trois VHH produits et les contrôles négatifs sans VHH, sans anticorps primaire et sans anticorps secondaire.

Le graphique ci-dessus montre que les VHH1, 2 et 4 donnent une activité 1.15 à 3.5 fois supérieure aux contrôles négatifs. Le VHH 1 semble avoir une meilleure affinité vis à vis de MMP9. Les VHH 2 et 4, quant à eux, donnent une réponse se rapprochant des contrôles négatifs sans anticorps primaire et sans VHH, montrant ainsi une faible spécificité de liaison de ces VHH à la MMP9.

Les différentes expériences ELISA faites avec ces VHH issus de banques naïves n'ont pas apporté les résultats espérés. En effet, le VHH1 possédant le meilleur résultat après analyse ne présente cependant pas une affinité suffisamment élevée pour être considéré comme un ERB potentiel pour la suite du projet.

Ces expériences de phage display n'ont donc pas permis d'isoler d'ERB présentant une affinité suffisante pour la cible MMP9.

Les anticorps de camélidé possédant des avantages indéniables pour l'élaboration d'un biocapteur pour le suivi des plaies chroniques, nous avons choisi de rester sur cette voie en élaborant, en partenariat avec la société Caminnov, une banque de VHH spécifiques à MMP9.

Une banque de VHH spécifique est obtenue après généralement sept injections espacées de deux semaines à un dromadaire de la protéine d'intérêt, ici la MMP9. A la fin de cette phase

97
d'immunisation, des lymphocytes B circulants sont prélevés, les régions VHH sont amplifiées par PCR puis clonées dans les phagemides comme décrit précédemment.

L'élaboration d'une banque de VHH spécifique est un procédé qui peut prendre jusqu'à 5 mois.

Pendant cette période, je me suis donc focalisée sur la seconde partie de mon projet, à savoir l'immobilisation d'ERB potentiels sur support flexible, l'alumine poreuse. N'ayant pas obtenu de VHH possédant une affinité suffisante pour MMP9, je me suis donc orientée vers l'élaboration d'une preuve de concept avec un anticorps conventionnel dirigé contre MMP9.

Partie II : Preuve de concept réalisée avec un anticorps conventionnel

2.1/Description du capteur capacitif à base d'alumine poreuse

Comme expliqué précédemment, (Introduction, *Objectif de mon projet de thèse*) l'élaboration d'un système connecté pour le suivi de plaies chroniques suppose plusieurs prérequis tels que la stabilité de l'ERB fonctionnalisé, la biocompatibilité du capteur, sa flexibilité, sa simplicité d'utilisation ou encore son coût. Le capteur utilisé pour ce projet est composé d'alumine poreuse, matériau largement étudié au cours de ces dernières années, notamment pour son potentiel dans le développement de dispositifs de détection bioélectronique en raison de ses nombreux avantages tels que sa facilité de fabrication avec structure en nid d'abeille où le diamètre des pores est contrôlable, sa résistance chimique, sa stabilité thermique ou encore de sa biocompatibilité (<u>Santos</u> et al.,*Trends in Analytical Chemistry*, 2013).

2.1.1- Elaboration

L'aluminium est un composé qui réagit spontanément avec l'oxygène de l'air afin de former, à sa surface, une couche d'oxyde de quelques nanomètres. Cette couche hermétique d'alumine, de formule chimique Al₂O₃, est un composé minéral très dur qui protège l'aluminium contre la corrosion ou une oxydation plus profonde. En 1857, Buff découvre que lorsque de l'aluminium est placé en tant qu'anode dans le processus d'électrolyse, ce même film protecteur se forme à sa surface. Ce procédé, appelé anodisation, a depuis donné lieu à de nombreuses études et s'est fortement développé, notamment pour sa potentielle utilisation pour des applications de détection et de séparation moléculaire par exemple (<u>Md</u> <u>Jani</u> et al., *Progress in Materials Science*, 2013).

Le principe de l'oxydation anodique ou anodisation est basé sur celui de l'électrolyse de l'eau. L'échantillon à traiter est placé en tant qu'anode dans une cellule d'électrolyse contenant un acide dilué, dans lequel est aussi introduit la cathode, composée d'un métal inerte (platine, plomb...). Une différence de potentiel est ensuite appliquée entre les deux électrodes. Le transfert de charges entre anode et cathode, la formation d'ions aluminium et d'espèces contenant de l'oxygène issues de l'électrolyte vont amener la formation d'oxyde d'aluminium suivant la réaction globale suivante :

$$2 \text{ AI} + 3 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{AI}_2\text{O}_3 + 3 \text{ H}_2$$

Le choix de l'acide est très important lors de l'anodisation, puisqu'il va déterminer la structure de l'oxyde de métal résultant. Un électrolyte ne présentant pas d'action dissolvante, par exemple l'acide borique ou l'acide citrique amènera à la formation d'un film d'oxyde fortement adhérent et non conducteur sur l'anode (<u>Panitz et Sharp</u>, *Thin Solid Films*, 1982). L'utilisation d'un acide à action dissolvante tel que l'acide sulfurique ou l'acide phosphorique va amener la formation d'une oxydation anodique à l'interface métal/oxyde mais aussi la dissolution de la couche d'alumine formée, entrainant la formation de pores en surface (<u>Thompson</u>, *Thin Solid Films*, 1997), comme on peut l'observer sur l'image ci-dessous :



Figure 39: L'alumine poreuse : image en microscopie électronique à balayage. Support nu analysé au sein de l'IMT mines Ales. Grossissement x10000.

Schématiquement, cet oxyde de métal poreux présente une structure avec deux couches distinctes, une couche externe épaisse et poreuse reposant sur une couche interne dense et diélectrique, comme représenté sur le schéma suivant :



Figure 40: Représentation schématique : alumine poreuse.

Les supports d'alumine poreuse utilisés pendant ma thèse ont été préparés au sein de l'Institut d'Électronique et des Systèmes de Montpellier à partir d'aluminium simple ou déposé sur une couche de 8µm de PET (PolyEthylene Terephtalate). L'anodisation, dans sa globalité, comporte trois étapes avec préparation de l'échantillon, anodisation et traitement des supports (Matériel et méthodes, 3.1 *Préparation des supports*). La réaction d'anodisation se fait en régime galvanostatique, ce qui signifie que l'intensité du courant reste constante tout au long de la réaction. L'électrolyte utilisé est l'acide phosphorique, acide à action dissolvante pour la création de pores. La température doit être maintenue en dessous de 5°C. Cette faible température est généralement employée lors des expériences d'anodisation dites « dures » car elle permet d'augmenter l'épaisseur de l'alumine formée de 20-25µm à environ 100µm. Les analyses en microscopie électronique à balayage ont montré que les échantillons obtenus suite à cette expérience présentent des pores dont le diamètre varie de 70 à 150 nm, ce qui est cohérent avec les données de la littérature (<u>Aramesh et Cervenka</u>, *Nanomedicine*, 2014, <u>Balde</u> et al., *Sensors and Actuators B : Chemical*, 2015).

Suite à la réaction d'anodisation, les supports obtenus vont subir une étape supplémentaire de dépôts d'électrodes. Cette ultime étape permet de passer d'un support d'alumine poreuse

simple à un capteur par dépôt de deux fines bandes de 300nm d'aluminium sur les supports, comme présenté sur le schéma ci-après.



Figure 41: Élaboration du biocapteur. Exemple de fonctionnalisation d'un anticorps conventionnel.

Ces électrodes vont permettre des mesures de capacitance. L'alumine poreuse joue le rôle de diélectrique entre les deux électrodes, à l'image d'un condensateur.

2.1.2- Utilisations des supports

Les propriétés uniques de l'alumine poreuse telles que sa structure ordonnée et uniforme, sa grande surface ainsi que ses possibilités de fonctionnalisation en font un matériau intéressant pour un grand nombre d'applications. Parmi ces applications se trouve l'étude de l'alumine poreuse pour son potentiel dans la formation de capteurs capacitifs. Les recherches dans la littérature mettent en évidence plusieurs types de capteurs capacitifs, le plus représenté étant le capteur d'humidité, où les variations de capacitance mesurées sont à corréler avec une augmentation ou une diminution de l'humidité ambiante. En effet, plus le capteur est « chargé » en molécules d'eau, plus la capacitance va augmenter. Parmi les nombreux exemples de capteurs d'humidité présents dans la littérature, Balde et al., (Balde et al., *Sensors and Actuators B : Chemical*, 2015) présentent un capteur capacitif à base d'alumine poreuse avec électrodes en aluminium pour la mesure d'humidité ambiante. Leurs résultats montrent un capteur fonctionnel sur des gammes d'humidité variant entre 20 et 80% à 25°C.

Outre ces utilisations de l'alumine « simple », une autre voie de développement de biocapteurs à base d'alumine a également été explorée ces dernières années. En effet, la couche d'oxyde formée par l'anodisation de l'aluminium offre des possibilités de fonctionnalisation de ces supports avec de nombreuses molécules. Plusieurs articles issus de la littérature mentionnent l'utilisation d'oxyde d'aluminium poreux dans des expériences de fonctionnalisation avec par exemple des polymères (<u>Popat</u> et al., *Langmuir*, 2004), des

protéines (<u>Hyndman</u> et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 1992) ou encore de l'ADN (<u>Matsumoto</u> et al., *Advanced Materials*, 2004).

Popat et al., (<u>Popat</u> et al., *Langmuir*, 2004) proposent un capteur à base d'alumine poreuse fonctionnalisé avec du poly(éthylène)glycol pour une administration ciblée de médicaments. Le polymère subit une première étape de silylation avec le tétrachlorure de silicium, permettant l'accrochage de celui-ci via les groupements alcool en surface de l'alumine. Le polymère ainsi fonctionnalisé peut par la suite accueillir diverses molécules pour une libération contrôlée de principes actifs, pouvant ainsi aboutir à l'élaboration d'un pansement connecté par exemple.

Hyndman et al., (<u>Hyndman</u> et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 1992) ont travaillé sur l'immobilisation d'une enzyme, la papaïne, sur des supports d'alumine poreuse. Cette immobilisation se fait à l'aide d'intermédiaires phosphorés comme par exemple la phosphoryléthanolamine préalablement adsorbés sur l'alumine. Cette étude a permis de déterminer un effet de la longueur du bras espaceur phosphoré sur le taux d'adsorption en surface de l'alumine ainsi que sur la quantité d'enzyme accrochée au support.

Enfin, Matsumoto et al., (<u>Matsumoto</u> et al., *Advanced Materials*, 2004), présentent leurs travaux de fonctionnalisation d'ADN sur des supports d'alumine poreuse à l'aide d'un intermédiaire poly-L lysine. Ces travaux ont pour objectif l'élaboration de puces à ADN permettant la détection de mutations génétiques, le principe reposant sur une hybridation de l'ADN fonctionnalisé au support par un ADN déposé en surface.

Ces différentes utilisations de l'alumine poreuse et l'intérêt grandissant qu'il suscite en font un support de choix dans l'élaboration d'un pansement connecté. La suite de mes résultats se focalise sur la fonctionnalisation et l'analyse de ce support afin d'élaborer un biocapteur utilisable pour le projet.

2.2/Production d'un prototype à partir de l'anticorps commercial

2.2.1 - Méthodes de fixation

Les différentes expériences biologiques effectuées au début de ma thèse n'ayant pas apporté les résultats espérés, j'ai dû avancer mon projet de pansement connecté avec l'élaboration d'une preuve de concept fonctionnelle. Pour cela, je me suis basée sur l'utilisation d'un anticorps conventionnel dirigé contre la MMP9, et j'ai fait différentes recherches bibliographiques afin de déterminer le type de fixation à privilégier.

La méthode de fonctionnalisation est un élément essentiel pour la formation d'un biocapteur. Elle est dépendante à la fois du type de molécule à greffer mais également de l'utilisation associée. En effet, la liaison entre la surface et la biomolécule à greffer doit être suffisamment forte pour résister à des environnements souvent humides avec variations de températures ou de pH, et doit être également contrôlée afin d'avoir une orientation de l'ERB optimale pour la reconnaissance de sa cible.

Plusieurs méthodes ont été mises en évidence ces dernières années pour l'immobilisation de molécules sur support solide (<u>Li et Chen</u>, *Nanomaterials*, 2018). Parmi les plus retrouvées on notera l'adsorption physique, où la molécule est fixée au support via des liaisons faibles de type van der Waals (<u>Langmuir</u>, *Physical Review*, 1916). Une autre méthode classique de fonctionnalisation de molécules sur support solide est la chimisorption qui permet la formation de liaisons fortes pouvant être ioniques, métalliques ou covalentes entre la molécule et le support (<u>Langmuir</u>, *Journal of the American Chemical Society*, 1917).

Ces deux méthodes ont des caractéristiques différentes avec chacune leurs avantages et leurs inconvénients comme détaillé dans le tableau suivant :

Type de fonctionnalisation	Avantages	Inconvénients
Adsorption	-Facile à mettre en œuvre	-Molécule non orientée
	-Non destructif pour la	-Liaisons faibles : la molécule
	molécule (pas d'utilisation	peut se décrocher suivant les
	de produits chimiques)	conditions d'utilisation
Chimisorption	-Molécule pouvant être	-Utilisation de produits chimiques pouvant dégrader la molécule/le
	orientée	
	-Liaison forte entre le	support
	support et la molécule	

Tableau 6: Adsorption vs chimisorption, avantages et inconvénients.

La fixation d'un anticorps conventionnel pouvant se faire par la création de liaisons faibles ou fortes, j'ai donc choisi de comparer ces deux méthodes de fonctionnalisation afin de pouvoir élaborer une preuve de concept optimale pour la création du pansement connecté et j'ai mis au point trois protocoles de fixation de l'anticorps sur l'alumine, comme résumé dans le schéma suivant :



Figure 42: Méthodes de fonctionnalisation de l'anticorps commercial.

La première méthode étudiée est l'adsorption directe de l'anticorps sur l'alumine poreuse avec la formation de liaisons faibles entre l'anticorps et la surface. La seconde méthode étudiée est la création de liaisons covalentes via l'intermédiaire d'un bras espaceur (paragraphe 2.2.1.2 *Chimisorption*). La troisième méthode envisagée est mixte puisqu'elle présente une création de liaisons covalentes entre un bras espaceur et une protéine spécifique, la protéine A sur laquelle vient interagir l'anticorps commercial. La protéine A permet une orientation privilégiée de l'anticorps sans l'emploi de produits chimiques pouvant s'avérer destructifs pour celui-ci.

2.2.1.1- Adsorption

L'immobilisation d'anticorps sur des surfaces solides est un critère déterminant, que ce soit pour l'élaboration d'un test d'activité biologique de type ELISA ou encore pour la formation d'un biocapteur. La liaison doit être suffisamment solide pour être maintenue tout au long de l'analyse mais doit également permettre la reconnaissance de l'antigène en surface. De ce fait, l'anticorps doit être fixé à la surface par un domaine autre que celui permettant la reconnaissance spécifique de l'antigène, ici MMP9. L'adsorption est une des méthodes les plus simples pour une fonctionnalisation de molécules sur support. Cette méthode permet la création de liaisons faibles entre la surface et la molécule à fixer mais ne permet pas d'obtenir une orientation spécifique de l'anticorps sur la surface.

Au-delà de la méthode de fixation de l'ERB sur le support, un autre paramètre à prendre en compte est la concentration de l'ERB à utiliser afin d'avoir un tapissage optimal de la surface à étudier. Pour ces premières expériences de fonctionnalisation, trois dilutions d'anticorps commercial anti-MMP9 ont été déposées sur les supports : 1/500^{ème}, 1/2000^{ème} et 1/5000^{ème}.

Pour ces dilutions, je me suis basée sur le fait que la dilution optimale lors des expériences ELISA donnée par le fournisseur est au 1/2000^{ème}. L'ELISA étant également basé sur des phénomènes d'adsorption, j'ai choisi cette valeur centrale, accompagnée de deux autres rapports, un plus élevé et un plus faible, l'objectif étant à la fois de fixer le plus d'anticorps possibles sur le support mais également d'éviter les phénomènes d'agrégation en surface, qui bloqueraient l'interaction de l'anticorps avec l'enzyme MMP9. Ces expériences se font sur 12 heures, le support et la solution d'anticorps commercial étant déposés en poches hermétiques comme expliqué dans la partie Matériel et méthodes, *3.2.1-a) Via adsorption*.

2.2.1.2- Chimisorption

La chimisorption permet la création de liaisons fortes pouvant être ioniques, métalliques ou covalentes. Ici, l'objectif est de créer un attachement covalent entre l'anticorps conventionnel et le support d'alumine. Comme vu précédemment, l'idéal lors de la fixation d'une molécule relativement volumineuse sur une surface est l'utilisation d'un bras espaceur ce qui, en principe, devrait permettre à la fois l'éloignement de la molécule de la surface et donc une meilleure disponibilité de celle-ci mais également dans notre cas la création d'une extrémité qui sera plus réactive avec l'ERB à fixer. Il existe plusieurs bras espaceurs réactifs avec des groupements hydroxy, les plus utilisés étant les dérivés silylés avec l'exemple de Vashist et al., (Vashist et al., Chemical Reviews, 2014) qui utilisent le (3-Aminopropyl)triethoxysilane pour la fonctionnalisation d'anticorps sur différentes surfaces pour des applications diagnostiques. La particularité de cette molécule repose sur le fait que l'atome de silicium possède quatre fonctions réactives : une fonction 3-Aminopropyl- et trois fonctions ethoxy. Les trois fonctions ethoxy ont la capacité de réagir avec les fonctions hydroxy de l'alumine (Figure 43) et le 3-Aminopropyl nous permet d'avoir la fonction de bras espaceur pour la création d'une liaison de type peptidique avec l'anticorps, pour une chimisorption simple ou avec la protéine A permettant l'adsorption orientée de l'anticorps (Figure 44).



Figure 43: Fixation du bras espaceur APTES ((3-Aminopropyl)triethoxysilane) sur l'alumine poreuse.

La réaction permettant la formation de la liaison amide entre l'anticorps ou la protéine A et le silane se fait à l'aide d'activateurs spécifiques. Ces activateurs fonctionnent généralement en couple et permettent la formation d'un intermédiaire qui va pouvoir réagir avec l'amine primaire de l'APTES comme montré sur le schéma ci-dessous.



Figure 44: Mécanisme réactionnel : couplage au carbodiimide (DCC/NHS) pour la formation de liaison amide.

2.2.2- Validation de la fonctionnalisation des biocapteurs

L'objectif de ce chapitre est l'élaboration d'une preuve de concept avec la fonctionnalisation d'un anticorps conventionnel sur les supports d'alumine poreuse. Le but premier est donc d'obtenir un capteur présentant des variations mesurables lorsque l'anticorps fonctionnalisé interagit avec l'enzyme cible MMP9. Dans un premier temps, plusieurs tests préliminaires ont été effectués afin de pouvoir vérifier et quantifier la présence d'anticorps sur les supports et ce pour chaque méthode de fonctionnalisation étudiée. Les paragraphes suivants regroupent les résultats obtenus lors d'analyses biologiques où un anticorps secondaire vient capter l'anticorps fonctionnalisé, d'analyses par imagerie où la microscopie électronique permet une vérification de l'intégrité des supports, et enfin d'analyses électriques permettant à la fois de vérifier la présence d'anticorps sur les supports mais également l'effet d'ajouts d'enzyme cible MMP9.

2.2.2.1- Evaluation par ELISA

Après les différentes expériences de greffages, il m'a fallu élaborer une méthode me permettant de démontrer la présence d'anticorps sur les supports. Afin d'obtenir une densité de molécules par unité de surface, je me suis penchée sur la méthode ELISA, qui, par définition, permet de détecter la présence d'anticorps ou d'antigène via un dosage immunoenzymatique sur support solide. Le protocole est le même que pour un ELISA classique, la différence étant le type de support sur lequel est déposé l'anticorps. Conventionnellement, l'anticorps ou l'antigène à analyser est adsorbé sur plaque 96 puits. Dans mon cas, il est fonctionnalisé via adsorption ou chimisorption sur de l'alumine poreuse. J'ai donc découpé mes supports d'alumine greffés en petits carrés que j'ai mis en tube Eppendorf, afin de mimer des puits et j'ai fait mon ELISA par la suite. Les données brutes obtenues ont été ensuite rapportées à la surface des différents supports découpés afin d'obtenir une densité optique par mm² d'alumine. Les résultats compilés des analyses biologiques des supports adsorbés et covalents sont présentés sur la figure 45.



Figure 45: Analyse biologique : ELISA sur Alumine : représentation de la densité optique à 415nm par unité de surface (mm²) d'alumine poreuse pour les différentes méthodes de fonctionnalisation (n=9).

Adsorption : trois dilutions d'anticorps 1/500^{ème} 1/2000^{ème} 1/5000^{ème} et le support nu en contrôle négatif. Système covalent simple : deux contrôles négatifs (support nu, dépôt du bras espaceur) et dépôt d'anticorps au taux de dilution 1/2000^{ème}. Système protéine A : contrôle négatif sans anticorps et dépôt d'anticorps au taux de dilution 1/2000^{ème}.

Le choix du taux de dilution de l'anticorps commercial pour les expériences covalentes a été motivé par deux raisons majeures : la quantité limitée d'anticorps anti-MMP9 et de supports d'alumine poreuse à disposition. Ayant préalablement fait plusieurs tests d'adsorption de l'anticorps sur l'alumine, le choix du taux de dilution optimal, 1/2000^{ème}, s'est fait grâce aux résultats issus de cette première méthode, accompagné des données fournisseur de l'anticorps commercial.

Globalement, ce graphique montre une différence entre les supports nus et les supports greffés. Sans l'anticorps commercial, on observe un signal de base correspondant à la fixation non spécifique de l'anticorps secondaire. Ce contrôle négatif a été fait pour les expériences d'adsorption ainsi que pour les expériences covalentes. On observe une forte répétabilité des

expériences, les valeurs de densité optique par mm² d'alumine pour nos deux contrôles négatifs étant similaires, avec de faibles écarts-types.

Il est important de souligner que les signaux obtenus lors des expériences en adsorption ne semblent pas augmenter en fonction de la concentration en anticorps, la dilution au 1/2000^{ème} présentant un signal plus élevé que celle au 1/500^{ème}. Cela s'explique par le fait qu'une quantité trop élevée d'anticorps déposée sur les surfaces peut déclencher des phénomènes d'agrégation, masquant ainsi le site d'interaction de l'anticorps anti-MMP9 pour l'anticorps secondaire.

Les surfaces greffées ayant subi un grand nombre de lavages, que ce soit lors du greffage ou lors de l'analyse ELISA, nous pouvons affirmer que les liaisons entre anticorps et alumine sont solides, ces expériences en adsorption présentant des résultats relativement répétables. Ceci est intéressant pour le projet, notamment car ce système se trouvera en contact indirect avec les exsudats de plaies et donc dans un environnement humide, la liaison entre ERB et alumine doit donc être suffisamment résistante pour être maintenue dans ces conditions.

Les expériences de chimisorption sont divisées en deux parties : la chimisorption simple avec dépôt direct d'anticorps anti-MMP9 sur l'APTES et l'expérience mixte avec ajout de protéine A. Les expériences covalentes simples présentent deux contrôles négatifs : les supports nus et les supports avec dépôt d'APTES. Ces deux contrôles négatifs sont relativement proches avec de faibles écarts types, montrant ainsi la spécificité de l'anticorps secondaire pour sa cible. Les supports greffés avec l'anticorps commercial présentent une densité optique par mm² d'alumine plus de 1,7 fois supérieure à ces contrôles, gage de l'efficacité de cette méthode de fonctionnalisation sur l'alumine.

Les dernières expériences de chimisorption présentées sont celles avec greffage de protéine A via l'intermédiaire APTES pour une adsorption orientée de l'anticorps anti-MMP9. Comme en chimisorption simple, j'ai également mis en place des contrôles négatifs avec le support nu, le support avec le bras espaceur APTES ainsi que le support avec APTES et protéine A. Tous ces contrôles négatifs sont proches en termes de valeurs, le contrôle spécifique APTES + protéine A présentant une DO/surface plus faible que les autres mais avec un écart type plus élevé. Le contrôle positif avec adsorption d'anticorps présente un rapport DO/surface insatisfaisant pour le projet, puisque semblable aux contrôles négatifs avec cependant un

écart-type plus élevé, gage d'une faible reproductibilité malgré la répétition des expériences. Cette méthode ne semble pas convenir aux besoins du projet et a donc été éliminée.

En ce qui concerne la comparaison adsorption/chimisorption simple, même si le rapport DO/surface des échantillons analysés est plus petit en conditions covalentes simples, l'écart type est également 9,2 fois plus petit que les supports adsorbés pour la même concentration en anticorps, démontrant ainsi une meilleure reproductibilité de l'expérience. De plus, la force des liaisons crées en chimisorption diminue le risque de relargage des anticorps de la surface.

Ces tests préliminaires seraient donc en faveur de la chimisorption simple comme méthode de choix pour la fonctionnalisation de notre biocapteur.



2.2.2.2- Analyse par microscopie électronique à balayage

Figure 46: Images en Microscopie Électronique à Balayage des différentes méthodes de fonctionnalisation de l'anticorps conventionnel sur alumine poreuse. Grossissement x200000.

La figure ci-dessus regroupe les différentes images obtenues en microscopie électronique à balayage pour chaque méthode de fonctionnalisation étudiée. Sur la ligne du haut sont présentés les différents échantillons adsorbés ainsi que deux échantillons greffés au taux de dilution 1/2000^{ème} et ayant été exposés à l'enzyme cible MMP9 en conditions simples (PBS) ou complexes (SH : sérum humain) (Matériel et méthodes, *3.4. Tests électriques*). Sous ces images se trouvent, à gauche, l'échantillon contrôle n'ayant subi aucun greffage, suivi des

échantillons covalents simples avec le contrôle négatif APTES, l'ajout d'anticorps et les expositions à l'enzyme en conditions simples ou complexes.

Globalement, nous observons que la structure caractéristique en nid d'abeille des différents supports d'alumine poreuse est maintenue sur toutes les conditions étudiées.

Il est intéressant de souligner que les échantillons adsorbés présentent des zones de surbrillance surtout visibles pour les dilutions au 1/500^{ème} et 1/2000^{ème}. Ces zones éclaircies, plus présentes sur l'échantillon 1/2000^{ème}, suggèrent un effet du dépôt d'anticorps anti-MMP9, corroborant les résultats biologiques présentés précédemment.

En ce qui concerne l'analyse par MEB du processus covalent simple, les premières observations ne montrent aucun changement radical entre l'échantillon nu et l'échantillon contrôle ne comportant que le silane. Cependant, on observe une diminution nette du diamètre des pores (de 110nm à 80nm en moyenne) lors de l'ajout de l'anticorps anti-MMP9, suggérant un revêtement de la surface et ce même après plusieurs lavages successifs. En plus de la réduction de la taille des pores, on peut observer la présence à certains endroits d'une granulation pouvant être synonyme d'une agrégation de sels issus de la solution de fonctionnalisation. Cette granulation est elle aussi maintenue malgré plusieurs lavages et séchages de la surface.

Pour ce qui est des supports ayant subi des ajouts d'enzyme cible, plusieurs constats ont été faits suivant les conditions d'analyses. Dans un premier temps, hormis une légère diminution du diamètre des pores, il n'y a pas de différence due à l'ajout de MMP9 pure en adsorption. En revanche, lors des ajouts de MMP9 mélangée au sérum humain, nous avons observé une diminution nette du diamètre des pores accompagnée d'une légère granulation de la surface. Ce phénomène semble être dû à la composition complexe du mélange mis en contact avec nos surfaces. Cette granulation est également observée sur les échantillons covalents et ce que ce soit en conditions simples ou complexes.

L'apparition de ce phénomène de granulation a été exclue comme signe de dégradation des échantillons puisque des mesures électriques ont été effectuées sur tous les supports analysés en microscopie électronique à balayage. Une perturbation de l'intégrité des échantillons aurait rendu impossible l'établissement d'une quelconque mesure entre les électrodes.

2.2.2.3- Analyses électriques

Comme détaillé dans la partie Matériel et méthodes, *3.4. Tests électriques,* les échantillons fonctionnalisés sont analysés sur banc de mesure électrique afin de pouvoir déterminer une méthode de mesure fiable pour le biocapteur. Il est important de préciser que toutes les analyses électriques des supports d'alumine poreuse fonctionnalisés sont faites en milieu sec et non en milieu humide. Ces analyses constituent donc une étape préliminaire de faisabilité du biocapteur mais ne reflètent pas du modèle réel qui lui sera en milieu humide. L'objectif premier ici est de voir le comportement global des supports afin de valider une preuve de concept de biocapteur capable de capter spécifiquement l'enzyme cible MMP9.

L'objectif a été double avec, dans un premier temps, une étude préliminaire sur de grandes gammes de fréquences afin de voir le comportement des supports suivant les fonctionnalisations, suivi d'une seconde étude plus ciblée en termes de fréquence et axée sur la saturation des supports greffés avec l'enzyme MMP9. Ces deux études complémentaires avaient donc pour objectif l'élaboration d'une méthode la plus fiable et répétable possible pour l'élaboration du biocapteur.

Les analyses préliminaires de supports greffés en adsorption ou chimisorption ont été effectuées sur des fréquences comprises entre 5Hz et 2,5MHz. Chaque mesure a été faite sur une durée d'environ 1h40 avec une augmentation de fréquence par paliers de 500Hz chaque seconde. Les résultats bruts ont ensuite été traités sur Origin pour obtenir différentes courbes suivant les conditions analysées. Les courbes correspondant aux conditions précédemment analysées (*2.2.2.1 Évaluation par ELISA* et *2.2.2.2 Analyse par microscopie électronique à balayage*) sont regroupées dans la figure 47.



Figure 47: Expériences préliminaires : Comportement des supports greffés sur hautes fréquences. Représentation de la partie réelle en fonction de la partie imaginaire des supports nus, adsorbés 1/500, 1/2000 et 1/5000 et du support covalent 1/2000.

Cette étude a été intéressante pour le projet puisqu'elle a permis de pouvoir faire plusieurs constats quant au comportement électrique des supports greffés. Dans un premier temps, j'ai pu observer que les différents supports fonctionnalisés, que ce soit en adsorption ou en chimisorption, n'ont pas été dégradés lors des greffages et supportent bien les expériences électriques, et ce sur des gammes de fréquences larges. Lors de l'analyse des résultats obtenus suite aux mesures, j'ai pu mettre en évidence une différence de signal entre le support nu et les différents supports greffés, la condition « nue » étant celle dont la courbe est le plus faible. Les différentes courbes semblent également évoluer dans le même sens que les résultats biologiques présentés précédemment avec, du plus faible au plus élevé le support nu, suivi par le support adsorbé 1/5000^{ème}, le support adsorbé 1/500^{ème} et enfin les supports 1/2000^{ème} adsorbés et chimisorbés. Cette étude conforte les résultats obtenus précédemment quant au taux de dilution à privilégier pour les greffages d'anticorps anti-MMP9 sur alumine poreuse.

Ainsi, à partir de cette étude et des nombreuses analyses biologiques, j'ai choisi de me focaliser uniquement sur le taux de dilution 1/2000^{ème} pour la suite du projet, que ce soit pour les supports adsorbés ou covalents.

Suite à ces premiers résultats montrant un système de capteur greffé fonctionnel, j'ai voulu aller plus loin dans les tests de faisabilité avec des expériences de saturation du capteur avec l'enzyme cible, en conditions simples dans un premier temps, puis en conditions complexes mimant ainsi les exsudats de plaie. Ces expériences se sont avérées plus complexes que prévu car elles ont nécessité une longue phase d'optimisation, notamment pour ce qui est de la répétabilité des expériences suivant les *batchs* d'alumine à disposition, mais également pour ce qui est de la représentation des résultats la plus pertinente à choisir pour permettre de voir les variations attendues sur les différents supports.

Chaque expérience électrique présentée ci-après montre le comportement des échantillons adsorbés et covalents à une fréquence fixe de 40 KHz, fréquence utilisée avec le type de puce RFID choisie pour le projet.



Figure 48: Expérience de saturation en conditions simples : adsorption vs chimisorption. Représentation de la variation de capacitance (ΔC en Farad) des différents supports fonctionnalisés en fonction de la quantité théorique de MMP9 déposée par unité de surface d'alumine poreuse (ng/mm²) à une fréquence fixe de 40kHz.
Chaque condition de fonctionnalisation a été analysée sur 4 capteurs différents (n=4).

La figure 48 montre la variation de capacitance du capteur en fonction des additions de MMP9 dans du PBS à 40KHz dans trois conditions : échantillon nu, échantillon adsorbé et échantillon covalent, tous deux à un taux de dilution en anticorps anti-MMP9 de 1/2000^{ème}. L'abscisse ici représente la quantité théorique de MMP9 déposée sur les différents supports analysés suite à des ajouts répétés de cette enzyme en solution à une concentration connue.

Tout d'abord, il est intéressant de noter que les échantillons nus présentent une variation de capacitance minimale, voire nulle malgré les ajouts successifs de MMP9, montrant à la fois la sensibilité et la spécificité de chaque méthode de greffage étudiée. En effet, si nous n'avons pas de variation de capacitance malgré les ajouts d'enzyme cible, c'est qu'il n'y a pas de variations mesurables sur la surface, donc qu'aucune molécule ne vient s'y fixer. Le second point intéressant à prendre en compte est la sensibilité du capteur avec une variation de signal dès les premiers ajouts de MMP9 sur les surfaces greffées. Après calculs, nous obtenons une sensibilité du capteur en conditions covalentes d'environ 100pF/ng/mm². Cette sensibilité est 10 fois plus petite pour les échantillons adsorbés, amenant ainsi un avantage de la méthode covalente comme méthode de choix pour cette preuve de concept.

Ensuite, les échantillons adsorbés montrent une variation de capacitance avec saturation à environ 18ng/mm² de MMP9, soit environ 200 fmol/mm². Ce phénomène de saturation est également observé pour les échantillons covalents, mais avec une capacitance supérieure à celle des supports adsorbés et pour une quantité plus faible de MMP9 déposée sur la surface (environ 7,5 ng/mm²). Si on compare les amplitudes de signaux à saturation, les échantillons covalents présentent une saturation presque trois fois plus élevée que les échantillons adsorbés. Cette amplitude supérieure est importante pour le projet. L'objectif principal étant une mesure de concentration de MMP9 dans le lit de la plaie, plus la sensibilité est élevée, meilleure est la traduction du signal pour une surveillance précise de l'évolution de la plaie chronique. Pour ces tests en conditions simples, la saturation est suivie d'une lente diminution et d'une stabilisation du signal. Ce comportement communément appelé Hook effect, ou effet prozone, est un phénomène connu pouvant arriver lors de l'élaboration d'immunodosages par exemple (Namburi et al., Journal of Dr. NTR University of Health Sciences, 2014). Il donne lieu à une représentation dite en cloche du signal en fonction de la concentration et est généralement synonyme d'une agrégation de molécules sur la surface. Les agrégats ainsi formés ne sont pas forcément liés avec l'anticorps présent sur la surface et peuvent être

décrochés au fur et à mesure des lavages, ce qui pourrait également expliquer la forme des courbes obtenues.

Ces courbes montrent donc une saturation des supports à 18 et 7,5 ng/mm², pour les conditions adsorbés et covalentes respectivement. Le fait qu'il y ait diminution et stabilisation du signal au-delà de ces valeurs montre qu'il n'y a plus de fixation de molécules sur les différents supports. Globalement, ce graphique permet de mettre en évidence un comportement similaire des différents échantillons, et ce quelle que soit la méthode de fonctionnalisation associée. En revanche, la saturation des supports chimisorbés arrive pour une quantité en MMP9 relativement faible, montrant éventuellement une limite dans l'élaboration du biocapteur. Le signal ainsi que la sensibilité associée restent néanmoins plus élevés au niveau de ces supports, renforçant tout de même le choix de la méthode covalente pour la suite du projet.

Bien qu'étant pertinents pour ma thèse, ces résultats ne reflètent pas la réalité puisqu'ils montrent le comportement des différents supports lors d'une exposition à l'enzyme cible conditions simples. L'objectif est l'élaboration d'un pansement connecté en contact avec les exsudats de plaies, mélanges très complexes comportant entre autres des débris cellulaires, des enzymes, ou encore des facteurs inflammatoires. La complexité de ces mélanges peut interférer avec les analyses, voire rendre le système non fonctionnel en se saturant avec des molécules non spécifiques par exemple, donnant ainsi des mesures de concentration faussées.

La seconde partie de mon étude de saturation reposait donc sur une visualisation du comportement des supports fonctionnalisés en conditions dites « complexes ».

Ainsi, j'ai eu besoin d'un milieu pouvant mimer ces conditions complexes. Après différentes recherches au sein du laboratoire, le milieu me paraissant le plus proche d'exsudats de plaies s'est avéré être du sérum humain (Biowhittaker 14-402 E), milieu couramment utilisé en tant de tampon de blocage dans des expériences d'immunohistochimie par exemple.

Des tests préliminaires de ce sérum ont été nécessaires avant toute utilisation lors d'analyses électriques. Dans un premier temps ce sérum a été dosé en ELISA afin de mettre en évidence la présence éventuelle de MMP9 risquant de fausser les résultats de saturation.



Figure 49: Comparaison sérum humain seul face à une gamme de concentration de MMP9 dans du PBS : expérience ELISA. Représentation de la densité optique en fonction d'ajouts de MMP9 dans la gamme de concentration.

Cette expérience montre l'absence d'enzyme MMP9 dans le Sérum humain seul, le signal obtenu sur tous les puits testés étant proche de 0.

La seconde étape a donc été de « doper » ce sérum par ajout de quantités données de MMP9 afin de le comparer à une même gamme étalon en conditions simples. Le but de cette nouvelle expérience est de vérifier la présence éventuelle de dégradation de l'enzyme cible par le mélange complexe. Ce mélange dopé étant par la suite utilisé lors des analyses électriques, il est important d'avoir une concentration en MMP9 relativement constante au cours du temps afin de pouvoir obtenir des valeurs de saturation non faussées lors de l'interprétation des données. Les résultats compilés des expériences ELISA sérum humain dopé sont présentés dans la figure 50.



Figure 50: Comparaison MMP9 conditions simples / conditions complexes. Expérience ELISA : représentation de la densité optique à 415 nm en fonction de l'augmentation de la quantité de MMP9 déposée en ng. Conditions testées : MMP9 diluée dans du PBS avec ou sans inhibiteur de protéases, MMP9 diluée dans du sérum humain avec ou sans inhibiteur de protéases.

Ces tests ont été mis en place avec ou sans inhibiteur de protéases (noté IP). Cette molécule a été ajouté à la fois à la gamme étalon et à la gamme sérum humain. Le but de cet ajout est de minimiser le plus possible les chances de dégradation de l'enzyme cible dans le sérum humain complexe. Le sérum humain n'est pas ajouté en même temps que la MMP9 lors de l'étape de *coating* mais après pour éviter tout phénomène de compétition. Le sérum est donc déposé sur les puits contenant une concentration connue de MMP9 et est laissé deux heures sous agitation à température ambiante. Le reste de l'expérience (ajouts d'anticorps et révélation) est effectué suivant le protocole ELISA classique détaillé dans la partie matériel et méthodes, *1.3.1 Quantification par technique ELISA*.

Ces résultats montrent que l'utilisation d'inhibiteur de protéases semble avoir un effet sur le taux de dégradation de MMP9 en conditions complexes. Ils montrent également une légère augmentation de signal en conditions simples. Cet effet peut être dû à la présence éventuelle d'impuretés lors de l'analyse. Globalement, la comparaison des différents signaux issus de ces analyses ne montre pas de dégradation suivant les conditions étudiées. La diminution de signal de l'ordre de 10% en conditions complexes est suffisamment faible pour ne pas avoir de conséquences lors des analyses électriques.

A partir de ces résultats, un nouveau batch de supports a été fonctionnalisé afin de faire les expériences de saturation en conditions simples et en conditions complexes. Les solutions d'enzyme cible ont été préparées à une concentration de 500ng/ml et l'inhibiteur de protéase a également été ajouté aux différents mélanges. Les expériences de saturation se sont déroulées de la même manière que précédemment (Matériel et méthodes, *3.4.3, Mesure d'ajouts de sérum humain dopé sur échantillons nus et fonctionnalisés : spécificité du biocapteur*) et ont permis d'obtenir le graphique suivant :



Figure 51: Expérience de saturation : comparaison entre conditions simples et complexes. Représentation de la variation de capacitance (ΔC en Farad) des différents supports (nus et chimisorbés) en fonction de la quantité théorique de MMP9 déposée par unité de surface d'alumine poreuse (ng/mm²) à une fréquence fixe de 40kHz. Chaque condition de fonctionnalisation a été analysée sur 4 capteurs différents (n=4).

La figure 51 représente la variation de capacitance en fonction de la quantité théorique de MMP9 en conditions simples ou complexes déposée sur des supports nus et covalents. Dans un premier temps, à l'image du précédent, ce graphique ne montre pas de variations des contrôles négatifs (échantillons nus), que ce soit en conditions simples ou en conditions

complexes, renforçant ainsi la spécificité des anticorps déposés sur les surfaces d'alumine. Il est aussi intéressant de noter, comme pour l'expérience précédente, une augmentation de signal dès les premiers ajouts de MMP9, attestant d'une sensibilité importante du capteur. Le modèle covalent analysé en conditions simples a permis de mettre en évidence une sensibilité de 80pF/ng/mm², cette valeur étant du même ordre que l'expérience précédente. Le même modèle analysé en conditions complexes présente une légère baisse de sensibilité avec une valeur d'environ 50pF/ng/mm². Ces valeurs restent tout de même dans le même ordre de grandeur, montrant à la fois une bonne sensibilité du système quelles que soient les conditions d'analyses mais également une reproductibilité entre les supports.

Enfin, ces nouvelles analyses ont permis de mettre en évidence une différence majeure suivant le milieu utilisé sur les supports greffés avec disparition du Hook effect sur les surfaces exposées aux conditions complexes. Pour cette condition, l'augmentation de signal se fait en paliers et non de manière linéaire et atteint un palier de saturation sans diminution de signal par la suite. L'augmentation en incréments de ces signaux peut être expliquée par le fait que dans un mélange complexe, un phénomène de compétition se produit où d'autres molécules peuvent s'accumuler sur les surfaces via interactions faibles pour ensuite être remplacées par MMP9. Suivant ces conditions, MMP9 semble également être plus stabilisée qu'en conditions simples, ce qui pourrait également expliquer la saturation sans diminution de signal. La saturation en conditions simples se produit à environ 8ng/mm² ce qui est similaire aux résultats précédents. Pour ce qui est des conditions complexes, le support atteint son seuil de saturation pour une quantité de MMP9 plus élevée, avoisinant ainsi les 15ng/mm². Ce seuil de saturation plus élevé est utile pour le projet, le capteur ayant ainsi une fenêtre fonctionnelle plus grande. En effet, l'objectif premier étant une mesure de concentration de MMP9 présente dans les exsudats de plaies, le capteur développé doit donc avoir une sensibilité (concentration la plus faible détectable par le capteur) et une spécificité (reconnaissance spécifique de l'enzyme cible) les meilleures possibles mais doit également posséder une fenêtre de mesure suffisamment grande pour être employé le plus longtemps possible avant saturation. Pour rappel, les données fournies par Liu et al., ainsi que par Li et al., (Liu et al., Diabetes Care, 2009; Li et al., The International Journal of Lower Extremity Wounds, 2017), mesuraient la quantité de MMP9 présente dans les plaies du pied diabétique non cicatrisantes sur une gamme allant de 0,37 à 2,90 µg/ml suivant la sévérité de l'ulcération. Si on considère qu'une gaze classique de 5x5cm peut absorber 3,25±1,25 ml de liquide avec d'être changée (<u>Hughes</u> et al., *Dermatology Online Journal*, 2007), nous pouvons en déduire que le seuil de saturation maximal pour l'élaboration d'un pansement d'une surface de 2x2cm (surface arbitraire suivant les dimensions du capteur) se situe aux alentours des 520µl de liquide. En se rapportant aux données citées plus tôt, cela correspond donc à une quantité de MMP9 variant de 192 à 1500ng pour une saturation complète du pansement. La surface entre les électrodes de mes capteurs est d'environ 20mm², soit une quantité de MMP9 avoisinant les 300ng en moyenne, je rentre donc dans la limite inférieure de la gamme de saturation calculée plus tôt.

En conclusion, deux méthodes de fonctionnalisation de l'anticorps commercial anti-MMP9 sur l'alumine poreuse ont été étudiées dans le but de faire une preuve de concept pour la faisabilité du projet de pansement connecté. Les tests biologiques, les images MEB et la mise au point électrique m'ont permis de faire plusieurs constats :

- La méthode d'anodisation de l'aluminium est maintenant valide et produit des surfaces similaires avec une faible variation de la taille des pores.
- La chimisorption semble être la meilleure méthode d'immobilisation d'anticorps conventionnels avec les tests biologiques et les tests électriques montrant des signaux élevés avec une faible variabilité.
- Les images MEB sont cohérentes entre les différentes expériences, montrant un maintien de l'intégrité des surfaces malgré les réactions et les nombreux lavages.
- La spécificité et la sélectivité de la méthode covalente sont renforcées avec les expériences en milieu complexe.

Cette mise au point avec utilisation de l'anticorps commercial a donc permis d'avoir une preuve de faisabilité du biocapteur avec des résultats plus que satisfaisants. En effet, j'ai réussi à avoir un système fonctionnel présentant des mesures exploitables avec un seuil de saturation qui entre dans les gammes retrouvées dans la littérature.

Mais l'objectif principal de mon projet repose sur l'élaboration d'un système novateur, pouvant se démarquer des systèmes déjà en cours de développement, notamment avec l'utilisation d'un VHH en guise d'ERB.

La suite du projet devait donc naturellement être consacrée à l'obtention d'un VHH possédant une forte affinité pour MMP9 et sa fonctionnalisation sur l'alumine. L'objectif de cette étape étant de pouvoir par la suite comparer le système VHH au système anticorps conventionnel déjà élaboré et déterminer la meilleure approche pour l'élaboration du pansement connecté. Malheureusement, je n'ai pas pu avoir accès à la banque VHH anti-MMP9 et je n'ai donc pas pu continuer dans cette direction.

J'ai malgré tout voulu explorer la faisabilité d'un capteur à base de VHH. J'ai donc cherché un couple VHH/molécule cible commerciaux afin d'élaborer une nouvelle preuve de concept, cette fois ci sans rapport avec les plaies du pied diabétique ou encore MMP9.

Après quelques recherches, j'ai finalement choisi un VHH anti-GFP commercial pour cette nouvelle partie du projet, détaillée dans le chapitre suivant.

Partie III : Preuve de concept : le VHH commercial

3.1/Méthode de fixation et tests préliminaires

Comme détaillé dans le chapitre précédent, l'objectif de ce projet est l'élaboration d'un système fonctionnel permettant de capter et mesurer le taux de MMP9 en surface des plaies. Une première preuve de concept a été élaborée à l'aide d'un anticorps conventionnel, où deux méthodes de fonctionnalisation ont été comparées pour l'obtention d'un système fonctionnel et répétable. La suite du projet proposait donc une reprise de cette étude préliminaire et son adaptation à un nouveau type d'ERB pour l'élaboration d'un système novateur.

Le VHH portant une affinité pour la cible du projet, MMP9, n'ayant pas été à ma disposition je me suis donc adaptée en choisissant un couple VHH/cible commerciaux pour une nouvelle étude de faisabilité.

Plusieurs prérequis ont été pris en compte lors de la recherche du VHH commercial. Dans un premier temps, la cible du VHH devait être facilement accessible et relativement stable, notamment pour ce qui est des expériences de saturation, une molécule volatile ne permettant pas la mise en œuvre d'expériences se passant sur six à sept heures à température ambiante. De plus, cette molécule devait également présenter une structure protéique relativement proche de la MMP9 utilisée lors de mon projet afin d'avoir un système le plus proche possible de mon étude de départ. Ensuite, le VHH devait présenter un tag en fin de séquence, cet élément étant essentiel à sa fixation sur support. En effet, le but étant d'avoir une orientation privilégiée de la molécule se différenciant de l'anticorps conventionnel et les séquences VHH pouvant être modifiées avant production en système bactérien (Résultats, 1.3.2.3-Séquençage des clones sélectionnés), la présence d'une étiquette spécifique était donc une solution idéale afin de faciliter l'étape de fonctionnalisation. A partir de ces deux conditions préalables, j'ai démarré mes recherches afin de trouver un VHH accessible remplissant ces conditions. J'ai été confrontée à quelques problèmes lors de mes recherches. Dans un premier temps, je me suis rendue compte que peu d'entreprises proposaient des VHH directement à la vente, la plupart proposant des constructions « à façon » pour une cible précise, celles-ci présentant un délai de fabrication non compatible avec mon projet. De plus, ces constructions sont relativement onéreuses car demandant plus de travail en amont.

Ensuite, la plupart des VHH proposés directement à la vente ne possédaient pas de *tag*, ceuxci ayant été éliminés après purification.

Un VHH dirigé contre la GFP ou Green Fluorescent Protein a finalement été trouvé. Celui-ci possède une étiquette 6 histidines en fin de séquence, entrant ainsi dans les critères cités précédemment. La GFP est une protéine qui a été décrite pour la première fois en 1979 par Osamu Shimomura (Shimomura, FEBS Letters, 1979). Elle est extraite de la méduse Aequorea victoria et a la particularité d'émettre une fluorescence de couleur verte sous UV sans ajouts de substrats. Structuralement, cette protéine présente 238 acides-aminés organisés en 11 feuillets β et une hélice α formant ainsi une « cage » dans laquelle sont emprisonnés les trois acides aminés formant le chromophore de la molécule (Georget et al., médecine/sciences, 1999). La GFP est une protéine largement accessible et relativement peu chère. Bien que présentant elle aussi une structure protéique organisée, cette protéine reste cependant plus petite que la cible de départ de mon projet (27kDa contre 92kDa pour la MMP9) risquant ainsi de donner des résultats ne pouvant pas être comparés avec le système précédent. En plus du VHH et de la protéine, j'ai également recherché un anticorps conventionnel dirigé contre la cible GFP afin de pouvoir faire différentes analyses biologiques avant et après fonctionnalisation sur l'alumine poreuse (Matériel et méthodes, 3.3.1-b) Avec le VHH commercial).

Une fois le VHH, sa cible et l'anticorps conventionnel trouvés, l'étape suivante a été la fixation du VHH sur les supports d'alumine poreuse afin de faire une étude complète avec analyses biologiques, microscopiques et électriques, à l'image de la preuve de concept présentée précédemment.

Cette fonctionnalisation de VHH sur alumine poreuse a demandé de nouvelles recherches bibliographiques, la méthode différant des méthodes précédemment vues pour l'anticorps conventionnel. En effet, j'ai choisi un VHH présentant une étiquette 6 histidines afin d'avoir une fixation préférentielle via cette extrémité, j'ai donc orienté mes recherches dans ce sens. Palit et Moulik, (<u>Palit et Moulik</u>, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2001), présentent une étude de l'adsorption de L-Histidine et DL-Tryptophane sur plusieurs supports tels que le graphite, le silicone ou encore l'alumine poreuse. Cette adsorption se fait à un pH de 9.2 et à des températures variant de 25 à 50°C. Les supports ainsi greffés sont ensuite analysés et

comparés afin de trouver la méthode la plus appropriée suivant le support étudié. Dans leur étude, l'histidine a été mise en solution à pH 9.2 puis mise en contact avec le support d'alumine 24 heures. Les résultats montrent une adsorption efficace sur l'alumine et ce pour toutes les températures étudiées, les courbes obtenues présentant le même comportement. Je me suis donc basée sur cette étude pour étudier les phénomènes d'adsorption spécifiques de mes VHH sur la surface. J'ai néanmoins choisi d'élargir la gamme de pH pour mon étude, afin d'avoir une comparaison du comportement de l'adsorption suivant les pH étudiés. J'ai donc fait ces expériences à 3 pH différents : 7.5, 8.5 et 9.2.

3.2/Validation de la fonctionnalisation des biocapteurs

3.2.1- Evaluation par ELISA

Avant toute fonctionnalisation du VHH sur supports d'alumine poreuse, des expériences ELISA préliminaires sur plaque 96 puits ont été nécessaires afin de vérifier l'affinité du couple VHH/cible commerciaux. Le graphique ci-dessous présente les résultats compilés de ces expériences :



Figure 52: Tests ELISA préliminaires : VHH GFP.

Contrôles positifs : Vert : « coating » de VHH à 10µg/ml et VHH 1µg/ml. Lendemain : dépôt de GFP à 10µg/ml, d'anticorps anti GFP, d'anticorps de révélation et d'ABTS. Bleu : « coating » d'anticorps anti GFP. Lendemain : dépôt de GFP à 10µg/ml, de VHH anti-GFP à 10µg/ml et 1µg/ml, d'anticorps anti-His, d'anticorps de révélation et d'ABTS. Orange : « coating » de GFP à 10µg/ml. Lendemain : dépôt de VHH anti-GFP à 10µg/ml et 1µg/ml, d'anticorps anti-His, d'anticorps de révélation et d'ABTS. Contrôles négatifs : conditions précédentes sans ajout de GFP (kaki et gris) et contrôle négatif sans dépôt de VHH (bleu). L'anticorps anti-GFP est dilué au 1/1000^{ème}, l'anticorps anti-His au 1/1000^{ème} et l'anticorps de révélation au 1/2000^{ème}.

Globalement, nous voyons qu'une des conditions étudiées se démarque des autres : la condition où les VHH sont fixés au fond des puits et vont ensuite capter la GFP. Cette condition est la plus importante à prendre en compte puisqu'elle mime les expériences de fonctionnalisations sur support. Les conditions où l'anticorps et la GFP sont fixés sur les puits donnent des signaux plus faibles, bien qu'étant significatifs avec des valeurs en moyenne 5 fois supérieures aux contrôles négatifs.

Cette expérience préliminaire montre donc que le VHH est possède une bonne affinité pour sa cible GFP, avec des signaux largement supérieurs aux conditions anticorps commercial ou GFP, qui présentent tout de même des valeurs significatives. Les deux concentrations étudiées (10µg/ml et 1µg/ml), choisies arbitrairement pour ces expériences présentent des résultats proches en termes de signaux, et ce pour toutes les conditions étudiées.

Nous nous sommes basés sur ces résultats afin d'élaborer une nouvelle expérience, cette foisci en comparant deux gammes de concentration de VHH anti-GFP déposés sur plaque 96 puits et mis en présence de GFP en conditions simples (diluée dans du PBS) ou en conditions complexes (diluée dans du sérum humain).

Cette comparaison est faite avec du sérum humain comme mime de conditions complexes, comme lors des expériences précédentes avec l'enzyme MMP9. Le but de ces expériences est double avec dans un premier temps la détermination de la meilleure concentration de VHH à déposer sur les supports d'alumine, mais également la visualisation du comportement de la GFP en conditions complexes afin de vérifier s'il y a, là aussi, une diminution de signal, de la quantifier pour pouvoir, le cas échéant, la prendre en compte lors des analyses électriques.

Les résultats obtenus lors de ces expériences sont compilés dans le graphique suivant :



Figure 53: Comparaison du comportement de la GFP en conditions simples (PBS) vs en conditions complexes (SH). Représentation de la densité optique à 415nm en fonction de la quantité de VHH déposée dans les puits en ng (n=4).

Dans un premier temps, on observe un comportement similaire des courbes obtenues, que ce soit en conditions simples ou en conditions complexes, avec augmentation du signal suivant la quantité de VHH déposée. A partir de ces expériences, nous avons choisi la quantité de 200 ng par puits pour les expériences de fonctionnalisation afin d'occuper tous les sites potentiels de fixation pour avoir le signal le plus élevé lors des expériences de greffage et de caractérisation. Cette quantité adsorbée de 200ng/puits a été obtenue à partir d'une solution de VHH à une concentration initiale de 4µg/ml. Cette concentration de VHH a donc été utilisée pour les différents greffages.

Ensuite, comme attendu aux vues des résultats précédents, une diminution de signal de l'ordre de 35% apparaît en conditions complexes. Cette diminution est supérieure à celle observée dans les expériences avec le système anticorps conventionnel/MMP9. Nous verrons par la suite s'il y a une incidence de cette diminution lors des expériences de saturation électrique.

Les expériences préliminaires ayant apporté des résultats à l'image du modèle précédemment étudié, j'ai donc continué mes expériences avec le greffage des VHH anti-GFP sur mes supports d'alumine. Comme expliqué dans le chapitre introductif (*3.1/ Méthodes de fixation et tests préliminaires*) la gamme de pH pour l'adsorption des VHH sur mes surfaces a été élargie, avec trois pH étudiés : 7.5, 8.5 et 9.2, ce dernier étant issu de données bibliographiques. Les expériences de fonctionnalisation se sont déroulées de la même manière que pour l'adsorption de l'anticorps conventionnel (Matériel et méthodes, *3.2.2- Avec le VHH commercial*). A la suite de cette étape de fonctionnalisation, chaque support a été découpé, la partie avec les électrodes laissée de côté pour les analyses électriques, et une analyse via ELISA a été faite sur les différents supports avec de vérifier la présence de VHH. Cette expérience a donné les résultats regroupés sur le graphique suivant :



Figure 54: ELISA sur alumine : vérification de la fonctionnalisation de VHH suivant les différents pH testés. Mesure de la densité optique à 415nm par mm2 d'alumine pour les supports nus et adsorbés aux pH 7.5, 8.5 et 9.2 (n=4).

A l'image des expériences précédentes, nous avons les résultats de lecture de densité optique à 415nm par unité de surface en mm² pour chaque condition testée : supports nus, faisant office de contrôle négatif, supports greffés à un pH de 7.5, supports greffés à un pH de 8.5 et enfin les supports greffés à un pH de 9.2. Dans un premier temps, il est important de noter que les résultats obtenus ne semblent pas corroborer les données issues de la littérature, les supports ayant subi l'adsorption de VHH à un pH de 9.2 présentant les résultats les plus faibles. En revanche, les supports ayant été soumis à un greffage a pH 7.5 présentent des résultats environ 2.5 fois plus élevés que le contrôle négatif avec un écart type très faible. Étant donné que cette expérience permet d'observer le taux de molécules en surface de nos capteurs, nous pouvons supposer que l'expérience à pH 7.5 serait l'expérience la plus intéressante pour la suite du projet. Ce dosage de VHH en surface est la première expérience qui a été faite suite aux fonctionnalisations, elle donne donc un premier aperçu quant à la méthode à privilégier pour cette preuve de concept mais ne permet pas de tirer de conclusions définitives. En effet, l'objectif étant d'élaborer un capteur capacitif à base d'anticorps de camélidés pouvant venir capter l'enzyme cible, nous devons donc, comme expliqué dans la partie II, faire une simulation au travers d'expériences de saturation des supports avec mesures de capacitance afin de voir le comportement des différents supports en conditions se rapprochant du réel.

3.2.2- Analyse par microscopie électronique à balayage

De la même manière que pour le chapitre précédent, les supports greffés avec le VHH anti-GFP aux différents pH ont été analysés par microscopie électronique à balayage. Les différentes images présentées sur la figure 55 ont été prises après expériences de saturation avec la protéine cible, GFP en conditions simples (haut) et en conditions complexes (bas).



Figure 55: Images MEB : greffage de VHH à différents pH. Grossissement x200000.

Globalement, la structure en nid d'abeille caractéristique du support d'alumine est maintenue au cours des analyses, que ce soit lors du greffage ou de l'expérience de saturation.

Les supports semblent tout de même présenter quelques différences visuelles. Si nous comparons ces images à celles des supports adsorbés par l'anticorps commercial vues au chapitre précédent (*2.2.2.2-Analyse par microscopie électronique à balayage*), nous voyons là aussi une apparition de surbrillance sur certains des supports analysés. Ce phénomène est particulièrement présent sur les supports où le VHH a été adsorbé à un pH de 7.5. Il est également retrouvé sur le support ayant subi un greffage à un pH de 8,5 et ayant été en conditions simples lors de l'expérience de saturation.

Le second point à mettre en évidence est l'aspect « aplati » des supports ayant été greffés à un pH de 9.2. Cette modification de la surface présente uniquement dans ces conditions peut être due au pH basique employé lors de l'adsorption.

3.2.3- Analyses électriques

Pour l'élaboration de cette nouvelle preuve de concept, je me suis appuyée sur le modèle créé avec l'anticorps conventionnel afin de mettre au point les conditions d'analyses électriques.

Bien que possédant une cible différente, l'objectif était de voir le comportement d'un VHH fonctionnalisé sur les supports suivant les mêmes expériences de saturation qu'avec le système anticorps conventionnel/MMP9. Afin de minimiser les variables entres expériences, toutes les analyses électriques (en conditions simples et en conditions complexes) ont été effectuées la même journée.



Figure 56: Expérience de saturation - GFP en conditions simples. Représentation de la variation de capacitance (∆C en Farad) des différents supports adsorbés en fonction de la quantité théorique de GFP déposée par unité de surface d'alumine poreuse (ng/mm²) à une fréquence fixe de 40kHz.

Le graphique ci-dessus représente la variation de capacitance du capteur en fonction des additions de GFP dans du PBS à 40KHz suivant les trois conditions d'adsorption : pH 7.5, 8.5 et 9.2. L'abscisse de ce graphique représente la quantité théorique de GFP déposée sur les différents supports analysés suite à des ajouts répétés de cette molécule cible en solution a une concentration connue. Dans un premier temps, on peut observer une augmentation de signal pour toutes les conditions de greffage étudiées. Cependant, aucune d'entre elles n'a la

même tendance, chaque courbe ayant sa propre évolution. La condition semblant se démarquer le plus est la condition pH 7.5, avec une courbe d'apparence similaire aux résultats obtenus lors de la preuve de concept avec l'anticorps commercial, plus précisément pour la fixation covalente analysée en conditions simples. Nous observons ici aussi un *Hook effect* avec une augmentation de signal franche suivie d'un phénomène de diminution et de stabilisation du signal, avec un plateau de saturation atteint ici pour une quantité en GFP d'environ 50ng/mm² et une sensibilité de l'ordre de 20pF/ng/mm². La condition de greffage à pH 9.2 ne donne pas de résultats exploitables. En effet, après une forte augmentation, le signal ne semble pas se stabiliser donnant ainsi cet aspect de courbe en pics. Enfin, la condition de fonctionnalisation à pH 8.5, bien que moins irrégulière que la condition à pH 9.2 ne permet pas non plus une visualisation optimale d'un quelconque phénomène de saturation et stabilisation du signal. Ces premiers résultats semblent être en adéquation avec les analyses présentées précédemment, avec l'adsorption a pH 7.5 considérée comme la condition la plus prometteuse pour cette preuve de concept.

Le graphique présenté figure 57 montre quant à lui le comportement des différents supports soumis à des bains complexes de GFP.


Figure 57: Expérience de saturation - GFP en conditions complexes. Représentation de la variation de capacitance (ΔC en Farad) des différents supports adsorbés en fonction de la quantité théorique de GFP déposée par unité de surface d'alumine poreuse (ng/mm²) à une fréquence fixe de 40kHz.

A l'image des analyses précédentes, ce graphique représente la variation de capacitance du capteur en fonction des additions de GFP dans du sérum humain à 40KHz suivant les trois pH étudiés pour l'adsorption orientée de VHH sur les supports d'alumine poreuse. Tout comme en conditions simples, chaque condition de fonctionnalisation donne une allure de courbe différente lors de l'analyse de saturation en conditions complexes. Dans un premier temps, il est intéressant de noter que la courbe obtenue pour la condition de greffage a pH 7.5 présente une augmentation de signal en paliers et une saturation du signal avec apparition d'un plateau aux alentours de 60ng/mm². Ce type de courbe est celui retrouvé dans la partie précédente lors des expériences de saturation en conditions complexes de l'anticorps commercial fonctionnalisé via chimisorption. Cette expérience renforce donc les résultats obtenus précédemment quant à la meilleure méthode de fonctionnalisation de VHH sur alumine poreuse. La fonctionnalisation a pH 9.2, condition donnant des valeurs de capacitance hautes en intensité mais ne permettant pas de conclure sur une quelconque saturation en conditions simples, montre ici une légère augmentation de signal pour ensuite redescendre à un niveau

proche de zéro. Aux vues des différentes courbes obtenues en conditions simples et complexes, l'emploi de pH basique pour la fonctionnalisation d'alumine poreuse par un VHH ne semble pas être une méthode optimale. Enfin, le pH médian de ces expériences, 8.5, montrant ici une courbe avec un aspect en cloche a également été écarté comme méthode potentielle de fixation du VHH anti-GFP, l'aspect de la courbe n'étant pas caractéristique d'une expérience de saturation avec apparition d'un plateau.

Suite à ces expériences électriques, les supports étudiés ont été récupérés puis analysés par ELISA. Le but de cette nouvelle expérience est de quantifier le taux de GFP capté par les VHH sur la surface d'alumine et de vérifier une éventuelle concordance avec les résultats obtenus précédemment, que ce soit les tests ELISA préliminaires, les analyses MEB ou encore les expériences électriques.



Figure 58: ELISA sur alumine - Mesure du taux de GFP en surface des différents supports précédemment soumis aux expériences de saturation. Lecture de la densité optique à 415 nm rapportée à la surface des supports en mm². PBS : conditions simples SH : conditions complexes.

Le graphique en figure 58 représente la lecture de densité optique par unité de surface des différents supports étudiés précédemment en conditions simples (PBS) et en conditions complexes (SH). Il est intéressant de noter un maintien de la tendance globale avec les signaux les plus élevés pour la condition de greffage à pH 7.5. On observe cependant pour cette condition une diminution de signal de 36% entre les analyses en conditions simples et en conditions complexes. Cette diminution est à mettre en parallèle avec les premiers résultats obtenus sur plaque 96 puits lors de l'analyse de la GFP en conditions simples ou complexes

qui présentaient là aussi une diminution de signal de 35% pour la GFP en conditions complexes. La diminution de signal pour les conditions complexes est donc suffisamment élevée pour être ressentie sur ces expériences de saturation.

Pour aller plus loin, j'ai regroupé sur le même graphique les résultats électriques obtenus au pH 7.5 en conditions simples ou complexes. Ces résultats sont exposés sur la figure suivante :





Ce graphique représente la variation de capacitance des différentes surfaces étudiées en fonction des ajouts de GFP en conditions simples ou complexes à une fréquence fixe de 40kHz. Comme présenté sur les analyses précédentes nous observons, là aussi une diminution de signal entre conditions simples et conditions complexes. Cette diminution, de 38% en moyenne corrobore les résultats observés précédemment. En plus de vérifier les résultats préliminaires sur plaque 96 puits, ces résultats permettent également de faire un parallèle entre ces courbes et celles obtenues pour la preuve de concept avec l'anticorps commercial. Il est intéressant de noter que les résultats présentés ci-dessus reflètent ceux qui ont été

obtenus précédemment sur les supports chimisorbés lors de la preuve de concept précédente utilisant l'anticorps conventionnel. Nous retrouvons un Hook effect en conditions simples et une croissance en paliers suivie d'un plateau dans les conditions complexes. Ces résultats montrent ainsi que, bien que ne se basant pas sur la création de liaisons covalentes en surface, ce mécanisme d'adsorption orienté avec création de liaisons de type van der Waals apporte des résultats valides avec une fixation résistante des VHH en surface.

Les deux systèmes étudiés sont donc comparables en termes de comportement global, notamment avec des allures de courbes similaires. En ce qui concerne la comparaison des performances entre les deux systèmes, celle-ci est plus difficile à analyser. En effet nous avons d'un côté, un anticorps conventionnel de 150kDa, d'environ 10 nm de long, bivalent qui va venir capter la MMP9 qui a une masse molaire de 92kDa et de l'autre un VHH de 15kDa, d'environ 4nm de long, monovalent, qui va capter la GFP de 27kDa. Cette différence, tant sur la masse molaire que sur la taille des différentes molécules étudiées se ressent néanmoins lorsqu'on compare les valeurs à saturation de chaque système. Pour le système anticorps conventionnel, nous pouvons estimer la quantité de MMP9 adsorbée entre 7.5 et 15ng/mm² correspondant à une densité comprise entre 4,9x10¹⁰ et 9,9x10¹⁰ molécules de MMP9 par mm² d'alumine fonctionnalisée. Pour le système VHH avec des valeurs de saturations en GFP de 50 et 60ng/mm², nous obtenons une densité en GFP de 1,1x10¹² à 1,3x10¹² molécules par mm² d'alumine, soit un nombre de molécules 10 à 20 fois plus élevé que le système anticorps conventionnel. Plusieurs raisons pourraient être à l'origine de cette augmentation de la quantité de molécule cible captée par le système VHH. En premier lieu, la densité d'immobilisation de l'anticorps sur l'alumine pourrait avoir un effet sur le nombre de molécules cible captées. Ensuite, l'encombrement des anticorps greffés sur les surfaces pourraient également avoir un effet sur l'accessibilité de la cible lors des expériences de saturation.

A partir de ces expériences préliminaires, plusieurs perspectives s'offrent à nous afin d'aller plus loin dans l'analyse des supports d'alumine poreuse fonctionnalisés. Dans un premier temps, on pourrait se pencher sur une méthode de quantification du nombre de liaisons disponibles sur les supports d'alumine nus, par exemple par XPS ou spectrométrie photoélectronique X.

137

Celle-ci pourrait ensuite être comparée au nombre de sites restants après fonctionnalisation pour nous permettre d'avoir un pourcentage d'occupation en anticorps. Une étude de l'affinité entre l'anticorps et sa cible peut également être envisagée, en utilisant par exemple la résonnance plasmonique de surface pour déterminer la force de liaison ligand/récepteur. Enfin, une modélisation informatique de l'interaction entre l'anticorps et sa cible pourrait être intéressante et nous donner des informations sur l'encombrement stérique de la cible captée sur la surface d'alumine. Conclusion et perspectives.

Le but de ce projet était d'élaborer un système complexe où un biocapteur fonctionnalisé avec une molécule cible viendrait capter l'enzyme la plus représentative de l'état inflammatoire prolongé des plaies du pied diabétique, la métalloprotéase matricielle 9, ou Gélatinase B. Ce capteur transfèrerait par la suite les données collectées au niveau des exsudats de plaies directement sur un moniteur utilisé par le professionnel de santé pour statuer sur l'état de la blessure étudiée. Ce système novateur permettrait donc à la fois une collection de données précises sur la quantité d'enzyme présente dans le lit de la plaie mais permettrait également d'avoir un suivi de cicatrisation des plaies du pied diabétique, avec éventuellement une corrélation de patients en patients, afin de pouvoir mieux appréhender les mécanismes complexes régissant la physiopathologie de ce type de plaie.

Plusieurs prérequis avaient été posés lors de l'élaboration de ce projet, avec par exemple l'utilisation d'un capteur capacitif à base d'alumine poreuse, amenant ainsi flexibilité, facilité d'utilisation, sensibilité ainsi qu'un faible coût de production intéressant pour le projet. Un second prérequis était l'utilisation d'un type d'ERB particulier, petit et résistant afin de se démarquer des systèmes déjà en cours de développement. Notre choix s'est donc porté sur l'étude de VHH ou de peptides comme ERB potentiels pour l'élaboration de ce pansement.

Pour atteindre les objectifs fixés au travers de différentes questions scientifiques, plusieurs parties distinctes avaient été développées dans le projet, avec (i), la recherche de l'ERB possédant une forte affinité pour la cible étudiée, MMP9, (ii) la réalisation d'une preuve de concept par immobilisation de l'ERB sur le support flexible poreux et enfin (iii) la mise en point d'un prototype de pansement connecté pour une utilisation sur matrices biologiques.

Dans un premier temps, la recherche de l'ERB à partir de banques naïves de VHH ou de banques peptidiques commerciales par la méthode de phage display n'a pas permis d'isoler de candidats suffisamment intéressant pour être considérés comme possédant une affinité acceptable pour la cible étudiée, le VHH produit possédant la meilleure affinité présentant un signal que 1.7 fois supérieur au contrôle négatif.

Pour parer à ce premier contretemps, nous nous sommes focalisés sur l'élaboration d'un biocapteur capacitif à base d'alumine poreuse fonctionnalisé avec un anticorps conventionnel trouvé dans le commerce. Cet anticorps anti-MMP9 a donc été greffé sur l'alumine poreuse de différentes manières, par l'élaboration de liaisons faibles avec la méthode d'adsorption et

140

via chimisorption, amenant à la création de liaisons covalentes entre le support et l'anticorps par l'intermédiaire d'un bras espaceur silylé, l'objectif étant de comparer ces deux méthodes pour élaborer une preuve de concept fiable sensible et répétable.

Ainsi, au travers d'une étude complète, avec analyses biologiques et électrique notamment, il a été possible de mettre en évidence la faisabilité d'un biocapteur fonctionnalisé via chimisorption avec cet anticorps conventionnel. Au-delà des tests classiques de laboratoire en conditions simples, nous sommes allés plus loin avec l'utilisation d'un milieu complexe pouvant mimer les exsudats de plaies afin de soumettre ce prototype a des conditions d'utilisation se rapprochant de conditions réelles. Les résultats obtenus sont encourageants, avec une sensibilité en conditions complexes de l'ordre de 50pF/ng/mm² et un seuil de saturation d'environ 300ng de MMP9, entrant dans les gammes de concentration retrouvées dans la littérature. Mais, bien que présentant des résultats reproductibles et prometteurs, ce système n'est pas celui qui avait été imaginé au début de ce projet, l'utilisation d'une molécule moins conventionnelle étant un des points clés se différenciant des autres projets en cours de développement.

Un contretemps supplémentaire ayant empêché l'utilisation d'une banque de VHH spécifique à l'enzyme cible étudiée, nous nous sommes de nouveau adaptés en nous dirigeant vers l'élaboration d'un nouveau prototype de biocapteur, cette fois ci avec l'utilisation d'un VHH commercial dirigé contre une protéine autre que la MMP9, la GFP ou Green Fluorescent *Protein*. Ce couple VHH/protéine a donc été soumis au même cahier des charges que lors de l'élaboration du biocapteur précédent et ce afin de pouvoir avoir deux systèmes les plus comparables possibles. Une différence a cependant été prise en compte quant à la méthode de fonctionnalisation de cet ERB d'un nouveau genre sur l'alumine poreuse. Les VHH ayant l'avantage d'être facilement modifiables, une extrémité composée de six histidines en position C-terminale, servant au départ à la purification de ces molécules, a été ajoutée à la séquence de ce VHH anti-GFP. Cette étiquette particulière a permis d'étudier une nouvelle voie de fonctionnalisation, cette fois-ci orientée, répondant ainsi à une des principales limites mises en évidence à la suite de l'élaboration du prototype à l'aide de l'anticorps conventionnel. Différentes recherches bibliographiques ont permis de mettre en évidence l'effet du pH sur la fonctionnalisation de ces VHH His-tag sur différents supports solides. Ainsi, trois conditions ont été évaluées : pH 7.5, 8.5 et 9.2.

141

Cette seconde preuve de concept a permis d'obtenir des résultats exploitables et intéressants, avec, là aussi, une méthode d'adsorption se démarquant des autres. En effet, la fonctionnalisation à un pH de 7.5 semble être la méthode idéale pour le greffage de VHH sur nos supports poreux, amenant des résultats comparables à l'étude précédente, rapprochant ainsi les résultats obtenus avec la preuve de concept où l'anticorps conventionnel était fixé de manière covalente sur la surface.

Nous partions donc d'un déroulé de thèse simple avec trois grandes parties théoriques. Cependant, comme tous travaux de recherche, celui-ci a été modifié au fur et à mesure de l'avancement du projet afin de s'adapter aux différentes contraintes n'ayant pas été prises en compte au départ.

Néanmoins, ces travaux de thèse ont tout de même permis d'étudier la faisabilité d'un pansement connecté pour le suivi de plaies du pied diabétique. Nous rentrons donc dans les objectifs spécifiés en début de projet avec la mise en place et l'optimisation de deux prototypes de capteurs capacitifs, un premier avec l'utilisation d'un anticorps conventionnel dirigé contre MMP9, cible du projet, et un second avec fonctionnalisation d'un VHH dirigé contre la GFP, faisant office de modèle mais ne s'appliquant pas à un suivi de plaies du pied diabétique. Chacun de ces modèles est utile pour la suite du projet, ouvrant ainsi la voie à plusieurs perspectives à court terme :

- La mise en évidence d'un ou plusieurs VHH possédant une forte affinité pour la cible via phage display de la banque spécifique ciblée anti-MMP9 : La méthode de sélection mise en place au cours de cette thèse est valide, et permettrait l'obtention d'un ou plusieurs VHH spécifiques pour la cible étudiée.
- <u>L'élaboration d'une nouvelle preuve de concept avec un VHH anti-MMP9 :</u> Ce nouveau prototype regroupera les avantages de l'utilisation du VHH (prototype 2) tout en étant dirigé contre la cible du projet (prototype 1). Le cahier des charges pour la caractérisation de cette nouvelle preuve de concept se calquera sur les modèles précédents avec des tests biologiques, une analyse par microscopie électronique à balayage et des expériences électrique des supports fonctionnalisés. L'objectif, en plus d'obtenir ce système novateur, serait d'augmenter la sensibilité du biocapteur vis à vis des résultats obtenus précédemment ainsi que d'augmenter également la limite de

saturation, afin d'agrandir les gammes de mesures du capteur et d'augmenter son temps d'utilisation sur les plaies.

 L'incorporation de la puce RFID pour l'élaboration d'un système de suivi sans fil : Un autre aspect important à prendre en compte dans ce projet est la capacité du support d'alumine fonctionnalisé à pouvoir être couplé à un système de transmission de données dans fil.

Ce point est essentiel pour le projet car, au-delà de l'aspect novateur, il permettrait au patient utilisant ce dispositif de pansement connecté de maintenir un minimum de mobilité au cours de son utilisation. Au-delà de ce point cela pourrait également ouvrir des portes pour une éventuelle utilisation du dispositif en soins ambulatoires.

• L'intégration de ce biocapteur capacitif dans un système de pansement :

Le biocapteur capacitif ainsi créé au travers du troisième prototype, avec utilisation d'un VHH possédant une affinité MMP9 serait incorporé entre une matrice adhésive et une gaze. La matrice adhésive permettrait de maintenir le capteur sur la plaie et la gaze ferait office d'intermédiaire entre les exsudats et le support d'alumine fonctionnalisé, faisant remonter les exsudats par capillarité jusqu'au capteur fonctionnalisé, comme représenté sur le schéma ci-dessous.

Matrice adhésive	
Biocapteur capacitif fonctionnalisé	
Gaze	
Plaie chronique exsudative	

Figure 60: le prototype de pansement.

D'un point de vue scientifique, d'autres perspectives peuvent être envisagées, cette fois-ci à plus long terme :

• La mise en place d'un protocole d'évaluation du dispositif en conditions réelles :

Le dispositif dans sa globalité étant élaboré, l'étape suivante serait, dans un premier temps, un test en laboratoire suivant des conditions similaires à celles testées lors de l'élaboration de nos prototypes, avec une comparaison lors d'une utilisation en conditions simples et en conditions complexes par exemple. Ces tests auraient cependant de nouvelles contraintes à prendre en compte, notamment pour ce qui est de l'élaboration d'un protocole de mesure et de la transmission de données sans fil.

• <u>L'utilisation du produit fini en phase clinique :</u>

La validation du protocole de mesure en laboratoire permettrait de passer à l'étape suivante, à savoir une utilisation du dispositif en conditions réelles, dans un premier temps à l'état de prototype, pour ensuite se diriger vers une industrialisation et une commercialisation.

Références

- Aboyans, V., Sevestre, MA., Désormais, I., Lacroix, P., Fowkes, G., Criqui, MH., Epidémiologie de l'artériopathie des membres inférieurs. *La Presse Médicale*, 2018; 47 : 38-46.
- Aderibigbe, BA., Buyana, B., Alginate in Wound Dressings. *Pharmaceutics*, 2018; 10(2): 42.

Aerts, A., Nevelsteen, D., Renard, F., Soins des plaies. 1997: 74-80.

- Alavi, A., Sibbald, G., Mayer, D., Goodman, L., Botros, M., Armstrong, DG., Woo, K., Boeni, T., Ayello,
 EA., Kirsner, RS., Diabetic foot ulcers. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2014;
 70: 1.e1-1.e18.
- Alexiadou, K., Doupis, J., Management of Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Therapy*, 2012; 3:4.
- Aljghami, ME., Saboor, S., Amini-Nik, S., Emerging Innovative Wound Dressings. *Annals of Biomedical Engineering*, 2019; 47: 659-675.
- Ameli, https://www.ameli.fr/infirmier/actualites/bien-traiter-les-plaies-chroniques (dernière ouverture : 16/07/19)
- American Diabetes Association, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 2014; 37: S81-S90.
- Annabi, N., Mithieux, SM., Boughton, EA., Ruys, AJ., Weiss, AS., Dehghani, F., Synthesis of highly porous crosslinked elastin hydrogels and their interaction with fibroblasts *in vitro*. *Biomaterials*, 2009; 30: 4550-4557.
- Aramesh, M., Cervenka, J., Surface modification of porous anodic alumina for medical and biological applications. *Nanomedicine*, 2014: 438-466.
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, A., Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 2009; 3: 203-230.
- Atiyeh, BS., Ioannovich, J., Al-Amm, CA., El-Musa, KA., Management of Acute and Chronic Open Wounds: The Importance of Moist Environment in Optimal Wound Healing. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2002; 3: 179-195.
- Aytekin, AO., Morimura, S., Kida, K., Synthesis of chitosan-caffeic acid derivatives and evaluation of their antioxidant activities. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011; 111: 212-216.
- Balde, M., Vena, A., Sorli, B., Fabrication of porous anodic aluminum oxide layers on paper for humidity sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015; 220: 829-839.
- Barrois, B., Colin, D., Allaert, FA., Nicolas, B., Epidémiologie des escarres en France. *Revue francophone de cicatrisation*, 2017; 3 : 10-14.
- Bauer, EA., Stricklin, GP., Jeffrey, JJ., Collagenase Production by Human Skin Fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1975; 64: 232-240.
- Battu, V., Prévention et traitement des escarres. Actualités pharmaceutiques, 2018; 57(578): 55-58.
- Bella, J., Collagen structure: new tricks from a very old dog. *Biochemical Journal*, 2016; 473: 1001-1025.
- Biela, A., Watkinson, M., Meier, UC., Baker, D., Giovannoni, G., Becer, CR., Krause, S., Disposable MMP 9 sensor based on the degradation of peptide cross-linked Hydrogel films using electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015; 68: 660-667.
- Boateng, JS., Matthews, KH., Stevens, HNE., Eccleston, GM., Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008; 97: 2892-2923.
- Bode, W., Gomis-Rüth, FX., Stöckler, W., Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the "metzincins". *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 1993; 331: 134-140.

- Bommer, C., Sagalova, V., Heesemann, E., Manne-Goehler, J., Atun, R., Bärnighausen, T., Davies, J., Vollmer, S., Global economic burden of diabetes in adults: projections from 2015 to 2030. *Diabetes Care*, 2018; 41: 963-970.
- Boulton, AJM., Vileikyte, L., Ragnarson-Tennvall, G., Apelqvist, J., The global burden of diabetic foot disease. *The Lancet*, 2005; 336: 1719-1724.
- Brett, D., A Review of Collagen and Collagen-based Wound Dressings. Wounds, 2008; 20: 347-356.
- Brew, K., Nagase, H., The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010; 1803: 55-71.
- Brown, MS., Ashley, B., Koh, A., Wearable Technology for Chronic Wound Monitoring: Current Dressings, Advancements, and Future Prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2018; 6, 47.
- Bryant, RA., Nix, DP., Acute and Chronic Wounds: Current Management Concepts, 5th edition, 2016 46.
- Caley, MP., Martins, VLC., O'Toole, EA., Metalloproteinases and Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 2015; 4: 225-234.
- Castano, L., Eisenbarth, S., Type-I Diabetes: A Chronic Autoimmune Disease of Human, Mouse, and Rat. Annual Review of Immunology, 1990; 8: 647-679.
- Chan, S., Horner, SR., Fauchet, PM., Miller, BL., Identification of Gram Negative Bacteria Using Nanoscale Silicon Microcavities. *Journal of the American Chemical Society*, 2001; 123: 11797-11798.
- Chantrain, C., DeClerk, YA., Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Medecine Sciences*, 2002; 18: 565-575.
- Chen, WY., Abatangelo, G., Functions of Hyaluronan in Wound Repair. *Wound Repair and Regeneration*, 2002; 7: 79-89.
- Chi Fai Cheung, R., Ng, TB., Wong, JH, Chan, WY. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*, 2015; 13: 5156-5186.
- Daly, CH., Biomechanical Properties of Dermis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 1982; 79: 17s-20s.
- Davis, FM., Kimball, A., Boniakowski, A., Gallagher, K., Dysfunctional Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers: New Crossroads. *Current Diabetes Reports*, 2018; 18: 2.
- Defloor, T., The risk of pressure sores: a conceptual scheme. *Journal of Clinical Nursing*, 1999; 8: 206-216.
- Du, YC., Ciou, WS., A Sensor Gauze with Multi-Channel Moisture and pH Monitoring for CW Care. *IEEE* Access, 2019; 7: 29185-29192.
- Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaeghe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, LGJ., Muyldermans, S., Wyns, L., Matagne, A., Single-domain antibody fragments with high conformational ability. *Protein Science*, 2002; 11: 500-515.
- Edmonds, M., Diabetic Foot Ulcers: Practical Treatment Recommendations. Drugs, 2006; 66: 913-929.
- Fernandez, ML., Upton, Z., Edwards, H., Finlayson, K., Shooter, GK., Elevated uric acid correlates with wound severity. *International Wound Journal*, 2012; 9: 139-149.
- Fleck, CA., Simman, R., Modern Collagen Wound Dressings: Function and Purpose. *Journal of the American College of Certified Wound Specialists*, 2010; 2: 50-54.
- Fowkes, FGR., Rudan, D., Rudan, I., Aboyans, V., Denenberg, JO., McDermott, MM., Norman, PE., Sampson, UKA., Williams, LJ., Mensah, GA., Criqui, MH., Comparison of global estimates of prevalence and risk for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *The Lancet*, 2013, 382: 1329-1340.

- Galea, CA., Nguyen, HM., Chandy, KG., Smith, BJ., Norton, RS., Domain structure and function of matrix metalloprotease 23 (MMP23): role in potassium channel trafficking. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2014; 71: 1191-1210.
- Galloway, A., Murphy, G., Sandy, JD., Gavrilovic, J., Cawston, TE., Reynolds, JJ., Purification and characterization of rabbit bone metalloproteinase that degrades proteoglycan and other connective-tissue components. *Biochemical Journal*, 1983; 209: 741-752.
- Georget, V., Nicolas, JC., Sultan, C., La green fluorescent protein: application à la dynamique intracellulaire des récepteurs stéroïdiens. *médecine/sciences*, 1999; 15 : 45-55.
- Gethin, G., O'Connor, GM., Abedin, J., Newell, J., Flynn, L., Watterson, D., O'Loughlin, A., Monitoring of pH and temperature of neuropathic diabetic and non-diabetic foot ulcers for 12-weeks: an observational study. *Wound Repair and Regeneration*, 2018; 26: 251-256.
- Gethin, G., The significance of surface pH in chronic wounds. Wounds UK, 2007;3: 52-56.
- Gianino, E., Miller, C., Gilmore, J., Smart Wound Dressings for Diabetic Chronic Wounds. *Bioengineering*, 2018; 5, 51.
- Gill, SE., Parks, WC., Metalloproteinases and Their Inhibitors: Regulators of Wound Healing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008; 40: 1334-1347.
- Goldman, R., Growth Factors and Chronic Wound Healing: Past, Present, and Future. Advances in Skin & Wound Care, 2004; 17: 24-35.
- Gonzalez, ACO., Andrade, ZA., Costa, TF., Medrado ARAP., Wound healing A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2016; 91 : 614-620.
- Govaert, J., Pellis, M., Deschacht, N., Vincke, C., Conrath, K., Muyldermans, S., Saerens, D., Dual Beneficial Effect of Interloop Disulfide Bond for Single Domain Antibody Fragments. *Journal of Biological Chemistry*, 2011; 287: 1970-1979.
- Grey, JE., Enoch, S., Harding, K.G, Venous and arterial leg ulcers. *British Medical Journal*, 2006; 332: 347-350.
- Gross, J., Lapiere, CM., Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues: A Tissue Culture Assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1962; 48: 1014-1022.
- Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph, https://www.hpsj.fr/specialites/medecine-vasculairephlebologie/pathologies/ulceres-de-jambe/ (dernière ouverture : 13/09/19)
- Haake, A., Scott, GA., Holbrook, KA., Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. *The Biology of the skin*, 2001; 19-45.
- Han, G., Ceilley, R., Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatment. *Advanced Therapy*, 2017; 34: 599-610.
- Hattori, Y., Falgout, L., Lee, W., Jung, SY., Poon, E., Lee, JW., Na, I., Geisler, A., Sadhwani, D., Zhang, Y.,
 Su, Y., Wang, X., Liu, Z., Xia, J., Cheng, H., Webb, RC., Bonifas, AP., Won, P., Jeong, JW., Jang,
 KI., Song, YM., Nardone, B., Nodzenski, M., Fan, JA., Huang, Y., West, DP., Paller, AS., Alam, M.,
 Yeo, WH., Rogers, JA., Multifunctional Skin-Like Electronics for Quantitative, Clinical
 Monitoring of Cutaneous Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials*, 2014; 3: 1597-1607.
- Hazari, A., Maiya, A., Agouris, I., Monteiro, A., Shivashankara, Prediction of peak plantar pressure for diabetic foot: The regressional model. *The foot*, 2019; 40: 87-91.
- Hong, WX., Hu, MS., Esquivel, M., Liang, GY., Rennert, RC., McArdle, A., Paik, KJ., Duscher, D., Gurtner, GC., Lorenz, HP., Longaker, MT., The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing. Advances in Wound Care, 2014; 3: 390-399.
- Hôpitaux Universitaires de Genève, https://www.hug-ge.ch/plaies-cicatrisation/ulceres (dernière ouverture : 13/09/19)

- Hughes, K., Chang, YC., Sedrak, J., Torres, A., A clinically practical way to estimate surgical blood loss. *Dermatology Online Journal*, 2007; 13 (4): 17.
- Hyndman, D., Lever, G., Burrell, R., Flynn, TG., Protein immobilization to alumina supports: I. characterization of alumina-organophosphate ligand interactions and use in the attachment of papain. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992; 40: 1319-1327.
- International Diabetes Federation, https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/factsfigures.html (dernière ouverture : 16/07/19)
- Ilium, L., Chitosan and Its Use as a Pharmaceutical Excipient. *Pharmaceutical Research*, 1998; 15: 1326-1331.
- Järbrink, K., Ni, G., Sönnergren, H., Schmidtchen, A., Pang, C., Bajpai, R., Car, J., Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Systematic Reviews*, 2016; 5:152.
- Jeffcoate, WJ, Harding, KG., Diabetic foot ulcers. *The Lancet*, 2003; 361: 1545-1551.
- Jones, RE., Foster, DS., Longaker, MT., Management of Chronic Wounds 2018. Journal of the American Medical Association, 2018; 320: 1481-1482.
- Kahn, CR., Insulin Action, Diabetogenes, and the Cause of Type II Diabetes. *Diabetes*, 1994; 43: 1066-1084.
- Kanitakis, J., Anatomy, histology and immunohistochemistry of the normal human skin, *European Journal of dermatology*, 2002; 12: 390-399.
- Kassal, P., Zubak, M., Scheipl, G., Mohr, GJ., Steinberg, MD., Murkovic Steinberg, I., Smart bandage with wireless connectivity for optical monitoring of pH. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017; 246: 455-460.
- Kassal, P., Kim, J., Kumar, R., de Araujo, WR., Murkovic Steinberg, I., Steinberg, MD., Wang, J., Smart bandage with wireless connectivity for uric acid biosensing as an indicator of wound status. *Electrochemistry Communications*, 2015; 56: 6-10.
- Kawabata, S., Kanda, N., Hirasawa, Y., Noda, K., Matsuura, Y., Suzuki, S., Kawai, K., The Utility of Silkelastin Hydrogel as a New Material for Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery -Global Open*, 2018
- Kim, YS., Joh, TH., Matrix Metalloproteinases, New Insights into the Understanding of Neurodegenerative Disorders. *Biomolecules and Therapeutics*, 2012; 20: 133-143.
- Langmuir, I., The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids II. *Journal of the American Chemical Society*, 1917; 39: 1848-1906.
- Langmuir, I., The Evaporation, Condensation and Reflection of Molecules and the Mechanism of Adsorption. *Physical Review*, 1916; 8: 149-176.
- Lazaro, JL., Izzo, V., Meaume, S., Davies, AH., Lobmann, R., Uccioli, L., Elevated levels of matrix metalloproteinases and chronic wound healing: an updated review of clinical evidence. *Journal* of Wound Care, 2016; 25: 277-287.

Leider, M., On the Weight of the Skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 1949; 12: 187-191.

- Li, G., Zou, X., Zhu, Y., Zhang, J., Zhou, L., Wang, D., Li, B., Chen, Z., Expression and Influence of Matrix Metalloproteinase-9/Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-I and Vascular Endothelial Growth Factor in Diabetic Foot Ulcers. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 2017; 16: 6-13.
- Li, Z., Chen, GY., Current conjugation methods for immunosensors. Nanomaterials, 2018; 8: 278.
- Liotta, LA., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, CM., Shafie, S., Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, 1980; 284: 67-68.

- Liu, H., Wang, C., Li, C., Qin, Y., Wang, Z., Yang, F., Li, Z., Wang, J., A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. *Royal Society* of Chemistry, 2018; 8: 7533-7549.
- Liu, Y., Min, D., Bolton, T., Nubé, V., Twigg, SM., Yue, DK., McLennan, SV., Increased Matrix Metalloproteinase-9 Predicts Poor Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Care*, 2009; 32: 117-119.
- Löffek, S., Schilling, O., Franzke, CW., Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *European Respiratory Journal*, 2010; 38: 191-208.
- Manring, MM., Hawk, A., Calhoun, JH., Andersen, RC., Treatment of War Wounds. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2009; 467: 2168-2191.
- Matsumoto, F., Nishio, K., Masuda, H., Flow-through-type DNA array based on ideally ordered anodic porous alumina substrate. *Advanced Materials*, 2004; 16: 23-24.
- Matzeu, G., Losacco, M., Parducci, E., Pucci, A., Dini, V., Romanelli, M., Di Francesco, F., Skin temperature monitoring by a wireless sensor. *IECON 2011-37th Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society*, 2011: 3533-3535.
- McCafferty, J., Griffiths, AD., Winter, G., Chiswell, DJ., Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains, *Nature*, 1990; 348: 552-554.
- McLister, A., Davis, J., Molecular Wiring in Smart Dressings: Opening a New Route to Monitoring Wound pH. *Healthcare*, 2015; 3: 466-477.
- Md Jani, AM., Losic, D., Voelcker, NH., Nanoporous anodic aluminium oxide: advances in surface engineering and emerging applications. *Progress in Materials Science*, 2013; 58: 636-704.
- Medzhitov, R., Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. Cell, 2010; 140: 771-776.
- Milne, SD., Connolly, P., Al Hamad, H., Seoudi, I., Development of Wearable Sensors for Tailored Patient Wound Care. *Proceedings of the 2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* 2014: 618-621.
- Milne, SD., Seoudi, I., Al Hamad, H., Talal, TK., Anoop, AA., Allahverdi, N., Zakaria, Z., Menzies, R., Connolly, P., A wearable wound moisture sensor as an indicator for wound dressing change: an observational study of wound moisture and status. *International Wound Journal*, 2016; 13: 1309-1314.
- Morton, LM., Phillips, TJ., Wound healing and treating wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2016; 74:589-605.
- Mostafalu, P., Lenk, W., Dokmeci, MR., Ziaie, B., Khademhosseini, A., Sonkusale, SR., Wireless flexible smart bandage for continuous monitoring of wound oxygenation. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, 2015; 9: 670-677.
- Murphy, G., Stanton, H., Cowell, S., Butler, G., Knaüper, V., Atkinson, S., Gavrilovic, J., Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS*, 1999; 107: 38-44.
- Murphy, G., Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biology*, 2011; 12: 233.
- Nagase, H., Visse, R., Murphy, G., Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 2006; 69: 565-573.
- Namburi, R., Kancherla, V., Ponnala, A., High-dose hook effect. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, 2014; 3: 5-7.
- Nelson, AR., Fingleton, B., Rothenberg, ML., Matrisian, LM., Matrix Metalloproteinases: Biologic Activity and Clinical Implications. *Journal of Clinical Oncology*, 2000; 18: 1135-1149.
- Niekraszewicz, A., Chitosan in Medical Dressings. Fibres & Textiles in Eastern Europe, 2005; 13: 16-18.

- Oltulu, P., Ince, B., Kokbudak, K., Findik, S., Kilinc, F., Measurement of Epidermis, Dermis, and Total Skin Thicknesses from Six Different Body Regions with a new Ethical Histometric Technique. *Turkish Journal of Plastic Surgery*, 2018; 26: 56-61.
- Ouvry, P., Les ulcères veineux : bilan diagnostique et options thérapeutiques. *Revue Francophone de cicatrisation*, 2017; 4 : 28-33.
- Palit, D., Moulik, SP., Adsorption Behaviors of L-Histidine and DL-Tryptophan on Cholesterol, Silica, Alumina and Graphite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2001; 239: 20-26.
- Panitz, JKG., Sharp, DJ., Characteristics of barrier anodized coatings on 6061 aluminum alloy. *Thin Solid Films*, 1982; 95: 113-118.
- Pitocco, D., Spanu, T., Di Leo, M., Vitiello, R., Rizzi, A., Tartaglione, L., Fiori, B., Caputo, S., Tinelli, G., Zaccardi, F., Flex, A., Galli, M., Pontecorvi, A., Sanguinetti, M., Diabetic foot infections: a comprehensive overview. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2019; 23: 26-37.
- Popat, KC., Mor, G., Grimes, CA., Desal, TA., Surface modification of nanoporous alumina surfaces with poly(ethylene glycol). *Langmuir*, 2004; 20: 8035-8041.
- Price, RD., Myers, S., Leigh, IM., Navsaria, HA., The Role of Hyaluronic Acid in Wound Healing. *American Journal of clinical dermatology*, 2005; 6: 393-402.
- Queen, D., Orsted, H., Sanada, H., Sussman, G., A dressing history. *International Wound Journal*, 2004; 1: 59-77.
- Rajeev, G., Xifre-Perez, E., Prieto Simon, P., Cowin, AJ., Marsal, LF., Voelcker, NH., A label-free optical biosensor based on nanoporous anodic alumina for tumour necrotic factor-alpha detection in chronic wounds. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018; 257: 116-123.
- Rayment, EA., Upton, Z., Shooter, GK., Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. *British Journal of Dermatology*, 2008; 158: 951-961.
- Rerolle, JP., Vigneau, C., Hertig, A., Berrou, J., Rondeau, E., L'inhibiteur de type 1 des activateurs du plasminogène : physiologie et rôle en physiopathologie rénale. *Néphrologie*, 2001; 22: 5-13.
- Salvo, P., Calisi, N., Melai, B., Dini, V., Paoletti, C., Lomonaco, T., Pucci, A., Di Francesco, F., Piaggesi, A., Romanelli, M., Temperature- and pH-sensitive wearable materials for monitoring foot ulcers. *International Journal of Nanomedicine*, 2017; 12: 949-954.
- Santos, A., Kumeria, T., Losic, D., Nanoporous anodic aluminum oxide for chemical sensing and biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, 2013; 44: 25-38.
- Schultz, GS., Wysocki, A., Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 2009; 17: 153-162.
- Sen, CK., Human Wounds and its Burden: An Updated Compendium of Estimates. *Advances in wound care*, 2019; 8: 39-48.
- Shah, JB., The History of Wound Care. *Journal of the American College of Certified Wound Specialists*, 2011; 3: 65-66.
- Shimizu, N., Ishida, D., Yamamoto, A., Kuroyanagi, M., Kuroyanagi, Y., Development of a functional wound dressing composed of hyaluronic acid spongy sheet containing bioactive components: evaluation of wound healing potential in animal tests. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2014; 25:1278-1291.
- Shimomura, O., Structure of the Chromophore of *Aequorea* Green Fluorescent Protein. *FEBS Letters*, 1979; 104: 220-222.

- Silva, R., Singh, R., Sarker, B., Papageorgiou, DG., Juhasz-Bortuzzo, JA., Roether, JA., Cicha, I., Kaschta, J., Schubert, DK., Chrissafis, K., Detsch, R., Boccaccini, AR., Hydrogel matrices based on elastin and alginate for tissue engineering applications. *Biological Macromolecules*, 2018; 114: 614-625.
- Simon, DA., Dix, FP., McCollum, CN., Management of venous leg ulcers. *British Medical Journal*, 2004; 328: 1358-1362.
- Singh, N., Armstrong, DG., Lipsky, BA., Preventing Foot Ulcers in Patients with Diabetes. *Journal of the American Medical Association*, 2005; 293: 217-228.
- Smith, GP., Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science*, 1985; 228: 1315-1316.
- Tallant, C., Marrero, A., Gomis-Rüth, FX., Matrix Metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research*, 2010; 1803: 20-28.
- Tamayol, A., Akbari, M., Zilberman, Y., Comotto, M., Lesha, E., Serex, L., Bagherifard, S., Chen, Y., Fu, G., Ameri, SK., Ruan, W., Miller, EL., Dokmeci, MR., Sonkusale, S., Khademhosseini, A., Flexible pH-Sensing Hydrogel Fibers for Epidermal Applications. *Advanced Healthcare Materials*, 2016; 5: 711-719.
- Téot, L., Les pansements de traitement par pression négative. Soins, 2015; 61: 45-47.
- Thet, NT., Alves, DR., Bean, JE., Booth, S., Nzakizwanayo, J., Young, AER, Jones, BV., Jenkins, ATA., Prototype Development of the Intelligent Hydrogel Wound Dressing and Its Efficacy in the Detection of Model Pathogenic Wound Biofilms. *American Chemical Society: Applied Materials & Interfaces*, 2016; 8: 14909-14919.
- Thompson, GE., Porous anodic alumina: fabrication, characterization and applications. *Thin Solid Films*, 1997; 297: 192-201.
- Tsukada, K., Tokunaga, K., Iwama, T., Mishima, Y., The pH changes of pressure ulcers related to the healing process of wounds. *Wounds*, 1992; 4: 16-20.
- Tuomilehto, J., Lindström, J., Eriksson, J., Valle, TT, Hämäläinen, H., Ilanne-Parikka, P., Keinänen-Kiukaanniemi, S., Laakso, M., Louheranta, A., Rastas, M., Salminen, V., Uusitupa, M., Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus by Changes in Lifestyle among Subjects with Impaired Glucose Tolerance. *The New England Journal of Medicine*, 2001; 344: 1343-1350.
- Van der Linden, RHJ., Frenken, LGJ., De Geus, B., Harmsen, MM., Ruuls, RC., Stok, W., De Ron, L., Wilson, S., Davis, P., Verrips, CT., Comparison of physical chemical properties of Ilama V_{HH} antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999; 1431: 37-46.
- Vashist, SK., Lam, E., Hrapovic, S., Male, KB., Luong, JHT., Immobilization of antibodies on 3aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. *Chemical Reviews*, 2014; 114: 11083-11130.
- Vater, CA., Mainardi, CL., Harris, ED., Inhibitor of Human Collagenase from Cultures of Human Tendon. *The Journal of Biological Chemistry*, 1978; 254: 3045-3053.
- Velasco, G., Pendás, AM., Fueyo, A., Knaüper, V., Murphy, G., Lòpez-Otìn, C., Cloning and Characterization of Human MMP-23, a New Matrix Metalloproteinase Predominantly Expressed in Reproductive Tissues and Lacking Conserved Domains in the Other Family Members. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999; 274: 4570-4576.
- Visse; R., Nagase, H., Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function and Biochemistry. *Circulation Research*, 2003; 92: 827-839.

- Wallace, HJ., Stacey, MC., Levels of Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) and Soluble TNF-α Receptors in Chronic Venous Leg Ulcers – Correlations to Healing Status. *The Journal of Investigative Dermatology*, 1998; 110: 292-296.
- West, DC., Hampson, IN., Arnold, F., Kumar, S., Angiogenesis Induced by Degradation Products of Hyaluronic Acid. *Science*, 1985; 228: 1324-1326.
- Whelan, J., Smart bandages diagnose wound infection. Drug Discovery Today, 2002; 7: 9-10.
- Wickett, RR., Visscher, MO., Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control*, 2006; 34: S98-S110.
- Wilson, M., Henry, M., Quill, R., Byrne, P., The pH of varicose ulcer surfaces and its relationship to healing. *European Journal of Vascular Medicine*, 1979
- Yager, DR., Nwomeh, BC., The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 1999; 7: 433-441.
- Zhao, R., Liang, H., Clarke, E., Jackson, C., Xue, M., Inflammation un Chronic Wounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016; 17: 1-14.

Abréviations

- ABTS : acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique
- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- AOMI : Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs
- APS : Ammonium Persulfate
- APTES : 3-Aminopropyltriethoxysilane
- DCC : N-N'dicyclohexylcarbodiimide
- DM : Dispositif Médical
- DO : Densité Optique
- EDTA : Ethylènediaminetétraacétic Acid
- ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
- ERB : Élément de Reconnaissance Biologique
- F : Farad
- GFP : Green Fluorescent Protein
- HAS : Haute Autorité de Santé
- HIF-1 : Hypoxia Inducible Factor 1
- His : Histidine
- HRP : HorseRadish Peroxidase
- IgG : Immunoglobulin G
- IL : Interleukine
- IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
- KDa : Kilo Dalton
- LB : Lysogeny Broth
- MCP: Monocyte Chemotactic Protein
- MMP : Métalloprotéase Matricielle

NHS: N-hydroxysuccinimide

PBS : Phosphate Buffered Saline

PBST : Phosphate Buffered Saline with Tween @ 20

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PEG : Poly Ethylène Glycol

PET : PolyEthylene Terephtalate

PFU : *Plaque Forming Units*

PIPES : piperazine-N-N'-bis(2-ethanesulfonic acid)

RFID : Radio Frequency IDentification

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate

SDS PAGE : Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Sf : Spodoptera frugiperda

SOB : Super Optimal Broth

SOC : Super Optimal broth with Catabolite repression

TAE : Tris Acétate EDTA

TE : Tampon d'électrophorèse

TB : Terrific Broth

TEMED : Tetramethylethylenediamine

TES : Tris EDTA Sucrose

TIMP : Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase

 $\mathsf{TNF}\alpha$: Tumor Necrosis Factor alpha

VHH : Single Variable domain on a Heavy chain

Résumé

En 2017, il a été estimé que 425 millions de personnes souffraient de diabète. Les raisons de ce boom, liées au contexte socio-économique actuel, représentent une dépense globale de 1.3 milliard de dollars par an avec des estimations atteignant jusqu'à 2.1 milliards de dollars en 2030 (<u>Bommer</u> et al., *Diabetes Care*, 2018). Au-delà de dérèglements physiologiques, cette maladie peut engendrer de nombreux effets secondaires si elle n'est pas traitée correctement, notamment la formation de plaies chroniques se trouvent les plaies du pied diabétique avec une prévalence globale de 6,3% (<u>Sen</u>, *Advances in Wound Care*, 2019) et une probabilité de développement chez les personnes diabétiques de 25% (<u>Boulton</u> et al., *The Lancet*, 2005). Ces plaies possèdent de nombreux facteurs participant à ce phénomène de pérennisation, dont les métalloprotéases matricielles ou MMP, endopeptidases à zinc aux rôles variés.

Ces travaux de thèse s'intéressent à l'élaboration d'un dispositif de pansement connecté pour le suivi de l'évolution des plaies du pied diabétique. Ce suivi se fait par mesure de la concentration d'une enzyme clé dans les phénomènes d'inflammation de ce type de plaie, la métalloprotéase matricielle 9 (MMP9), également appelée Gelatinase B. Ce système se base sur l'utilisation d'alumine poreuse fonctionnalisée avec un Élément de Reconnaissance Biologique (ERB) capable d'interagir avec la cible, MMP9.

Dans un premier temps, une recherche d'ERB possédant une affinité pour la cible est étudiée. Cette recherche se base sur un *screening* de banques d'anticorps de camélidé (VHH) et de banques peptidiques par la méthode de phage display.

La suite du projet se focalise sur l'élaboration de deux prototypes de biocapteurs capacitifs, l'un avec l'étude de la fonctionnalisation d'un anticorps conventionnel anti-MMP9, l'autre avec l'utilisation d'un VHH tiers possédant une affinité pour la GFP. Ces deux preuves de concept seront utiles pour la continuité du projet.

Abstract

In 2017, it was estimated that 425 million people worldwide had diabetes. The main reason for this skyrocketing number is related to the current socio-economic context of the world with global expenses reaching 1.3 billion dollars a year with estimates reaching up to 2.1 billion dollars by 2030 (<u>Bommer</u> et al., *Diabetes Care*, 2018). Above all physiological unbalances, this disease can cause many side effects if left untreated, one of them being chronic wounds, wounds that don't follow the usual healing process. Among the different types of chronic wounds are diabetic foot ulcers (DFUs), with a prevalence of 6.3% (<u>Sen</u>, *Advances in Wound Care*, 2019) and a lifetime risk for the diabetic population as high as 25% (<u>Boulton</u> et al., *The Lancet*, 2005). These wounds have many factors involved in the permanent inflammation state that they are in, one of them being matrix metalloproteinases (MMPs) zinc endopeptidases with various roles.

This project is focused on the development of a smart dressing for the monitoring of DFUs. This monitoring is done by measuring the concentration of a key enzyme in the inflammation process, MMP9 or Gelatinase B. This system is based on the use of porous alumina functionalized with a Biological Recognition Element (BRE) able to detect MMP9.

The first part of the project is the search for BREs based of the screening of camelid antibodies (VHHs) or peptide libraries by phage display. Then, the project focuses on the development of two prototypes of capacitive biosensors, one for the study of the functionalization of a conventional anti-MMP9 antibody, the other with the use of a third-party VHH and its target, GFP. These two proofs-of-concept will be useful for the continuity of the project.