Structuration en 3D de phases cristal-liquides pour la formation biomimétique de tissus osseux

Elora Bessot

▶ **To cite this version:**

Elora Bessot. Structuration en 3D de phases cristal-liquides pour la formation biomimétique de tissus osseux. Matériaux. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS161 . tel-03412566v2

HAL Id: tel-03412566
https://theses.hal.science/tel-03412566v2

Submitted on 3 Nov 2021

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 397 : Physique et Chimie des Matériaux

Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris

Structuration en 3D de phases cristal-liquides pour la formation biomimétique de tissus osseux

Par Elora Bessot

Thèse de doctorat de Chimie des Matériaux

Dirigée par Nadine Nassif

Présentée et soutenue publiquement le 15 Décembre 2020

Devant un jury composé de :

M. J. Chevalier	Professeur, INSA Lyon	Rapporteur
Mme. C. Moali	Directrice de Recherche CNRS, Lyon 1	Rapportrice
M. P. Fratzl	Professeur, Max Planck Institute, Potsdam	Examinateur
Mme. M.-C. Durrieu	Directrice de Recherche CNRS, Bordeaux	Examinatrice
M. L. Bouteiller	Directeur de Recherche CNRS, SU	Examinateur
M. A. Abou-Hassan	Maître de Conférences, SU	Examinateur
Mme N. Nassif	Chargée de Recherche CNRS, SU	Directrice
M. F. Artzner	Directeur de Recherche CNRS, Rennes 1	Co-encadrant, invité
M. M. Faustini	Maître de Conférences, SU	Co-encadrant, invité
M. C. Sanchez	Professeur, Collège de France	Invité
Mme. M.-M. Giraud-Guille	Directrice d'Etudes, EPHE	Invitée

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Remerciements

« Mak'gora. » Varok Saurcroc

« Respect et robustesse » Caius Céplus

Après trois longues années de dur labeur, ce joyeux dénouement n'aurait pas été possible sans l'implication de nombreuses personnes. Après une soutenance riche en émotions je peux enfin les remercier sans pleurer.

Je tiens à remercier respectueusement les membres du jury d'avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail et d'avoir mené une discussion enrichissante et passionnante lors de ma soutenance.

Nadine, je ne saurai par où commencer pour te remercier de ce que tu m'as apporté durant ces trois dernières années (et demi !) autant scientifiquement qu'humainement. Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir cru en moi quand moi-même je n'y croyais pas et de m'avoir confié ce sujet si « facile » (haha !). Je sais que tu as « lutté pour me faire montrer mes résultats » mais quels résultats finalement ! Merci de m'avoir appris le Nadine-translate et de m'avoir soutenue tout au long. Le savoir que tu m'as transmis est inestimable et je te remercie de m'avoir transmis le goût de la Recherche et le fait d'adorer passer un nombre incongru d'heures au(x) microscope(s). Cela a été un véritable plaisir de travailler avec toi dans les bons moments comme dans les difficiles. Merci pour les gâteaux, les restos (oui à l'époque ça existait encore), etc. Ces années seront gravées dans ma mémoire…

Marco, il est vrai que notre première année n'a pas commencé sur les chapeaux de roues entre les difficultés techniques et les difficultés de communications qu'on a pu rencontrer. Petit à petit, nous avons avancé ensemble et je te remercie de t'être impliqué dans ce travail et de m'avoir conseillé sur les résultats qu'on a pu observer. Merci d'avoir participé à la mise en place d'expériences « maison » avec les fameuses brosses à dents, on est vraiment les MacGyver de la science !

Je tiens à remercier **Franck** et **Arnaud** pour leur implication dans ce travail. Sans vous, je n'aurai pu faire ce bond de géant dans l'avancement de ma thèse. Franck, merci d'avoir accepté de collaborer avec Nadine et merci pour les explications (et les très nombreuses formules mathématiques qui en ont découlé haha) que tu m'as donné sur les cristaux liquides. Arnaud, merci de m'avoir formé à l'utilisation du PolScope et au traitement des images. Merci à vous deux de m'avoir toujours accueilli avec le sourire à l'IPR lors de mes voyages à Rennes.

Cette aventure n'aurait pas été possible sans l'intervention du **Professeur Clément Sanchez**, qui a transmis ma candidature spontanée de stage de deuxième année de Master à Nadine. Je vous remercie de nous avoir mis en contact et d'avoir toujours su me donner des avis et conseils avisés sur mon travail lors de nos réunions.

Je tiens à remercier **Marie-Madeleine Giraud-Guille** pour les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir sur ce travail. Votre savoir m'a été très précieux.

Cette thèse s'est déroulée au sein du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris et je remercie les actuels et anciens directeurs du laboratoire, **Christian Bonhomme**, **François Ribot** et **Florence Babonneau**, pour m'avoir accueilli au sein de l'unité.

Je remercie très chaleureusement les gestionnaires du laboratoire, **Corinne Pozzo Di Borgo** et **Hélène Gervais**, pour leur disponibilité et leur bonne humeur communicative et sans qui on serait perdus. Merci pour tous ces moments de fous rires dans votre bureau et lors des sessions « zoom-confinement » avec Corinne (à quand la prochaine session ?).

Je tiens à remercier également les autres personnels administratifs du laboratoire qui nous permettent de travailler dans d'excellentes conditions, **Simon Dadoun** et **Diana Lesueur** pour les commandes de matériels et le matériel informatique.

Tout ce travail n'aurait pu se faire sans l'utilisation d'appareils sur lesquels j'ai pu être formée. Merci à **Patrick Le Griel** et **Isabelle Genois** pour la formation sur le MET et le MEB et merci pour votre gentillesse quand je vous appelais pour m'aider à régler des soucis sur ses appareils. Merci à **Christophe Helary**, **Corinne Illoul** et **Bernard Haye** pour m'avoir formé à la préparation des échantillons en histologie et MEB/MET. Merci à **Mohamed Selmane** pour m'avoir formé sur la DRX et merci de m'avoir passé des échantillons en capillaire lorsque j'en avais besoin. Merci à **Guillaume Laurent** et **Thierry Azais** de m'avoir passé des échantillons en RMN et d'avoir essayé de m'apprendre « la RMN pour les nuls ». Merci à **Chakib** du MNHN pour la formation à l'ultramicrotomie et merci pour ton savoir-faire en microscopie et les bons moments passés avec toi au Museum (ahhhh Chakib !).

Merci à **Stanislas Von Euw** pour avoir pris de si beaux clichés au SHIM au Trinity College Dublin et aussi pour les pintes parce que la Recherche ce sont aussi des moments de partage autour d'une bonne Guinness !

Je souhaite remercier de manière générale l'ensemble des membres permanents et non-permanents du laboratoire pour la très bonne ambiance de travail qui y règne avant de passer à des remerciements particuliers.

Tout d'abord, je souhaite remercier mes deux équipes, le groupe MHP (Matériaux Hybrides et Procédés) et la « team » Biomin avec qui j'ai passé de très bons moments au laboratoire mais aussi à l'extérieur (les restaurants et les escape games me manquent !). Merci donc à **Thierry**, **Marie**, **Cédric**, **Laurence** et **Lionel** du côté des permanents et à **Maxime**, **Ludovic**, **Nadège**, **Florian**, **Marion**, **Aude**, **Laetitia**, **Claudia**, **Miléna**, **Camilla**, **Caroline**, **Alexis**, **Viviane**, **Julie**, **Tristan**, etc.

Merci à **Laurence Bonnet-Lericque** et **Corinne Chanéac** de m'avoir aidé et soutenu lorsque j'en ai eu besoin.

Viennent ensuite les remerciements des équipes non conventionnelles du laboratoire.

La **team Nerf** regroupant d'intrépides jeunes chercheurs voulant se défouler et que seules les oreilles averties peuvent entendre dans les couloirs. Merci à **Maxime**, **Guillaume**, **Alexandre**, **Florian**, **Marion**, **Aude**, **Viviane**, **Ludovic**, **Camille** et **Chloé** pour les grands moments de rigolade et les coups à bout portant.

La team **des daleuses** regroupant les râleuses et affamées du laboratoire que sont Laura et Nadège et moi-même. Merci à vous deux pour tous ces moments de fous rires et votre compassion sans faille. Je crois sans me tromper que l'on c'est bien trouver toutes les trois. Vous me manquez déjà terriblement.

Le groupe du vendredi 17h pour les soirées aux Rattrapages (ou tout autre bar où on se donnait la peine d'aller) car un chercheur ça a aussi besoin de décompresser.

Le trio des **alternatifs ou des BG du 44-34 414** que sont mes chers co-bureau **Maxime**, **Guillaume** et **Alexandre** aka Jacqueline, Josiane et Geneviève. Ma thèse aurait été bien moins fun sans votre présence au quotidien. Nos craquages au bureau ont bien dû me couter quelques heures de manips en moins mais ça valait totalement le coup, surtout pour avoir filmé ou photographié un nombre incalculable de dossiers sur vous, vivement vos soutenances !

Je remercie enfin mes amis en dehors du laboratoire qui, de près ou de loin m'ont toujours soutenu. Merci aux copines du lycée (qui sont toujours là après 11 ans d'amitié !), les gogolles de la LPro et les garçons des 3C.

Viennent enfin les remerciements à ma famille qui me soutient depuis toujours, m'a toujours poussé à me dépasser et qui m'a supporté quand parfois ça n'allait pas. Merci à ma maman, ma sœur, Papi, Mmie, Hadrien d'avoir partagé ce moment avec moi.

Je remercie évidemment Jean-Luc qui est une source intarissable de mignonneries et qui a inspiré beaucoup de décorations dans le bureau et certains cadeaux.

Un dernier merci particulier à Thomas qui m'a supporté au quotidien (ce n'était pas de la tarte !) et de m'avoir soutenu avec amour. Je ne te remercierais jamais assez de tout ce que tu as fait pour moi.

Merci à tous.

« Force et honneur »

- Maximus Decimus Meridius -

Table des Matières

Table des Matières 9

Liste des abréviations 14

Introduction générale 17

Références bibliographiques 22

Chapitre 1 : Etat de l'art 25

I. Le tissu osseux 27

1. Anatomie 27
2. Composition 30
3. Organisation hiérarchique 31
4. Formation du tissu osseux 38

II. Le collagène : structure, synthèse et cristaux liquides 45

1. La molécule de collagène 46
2. Synthèse des fibrilles de collagène *in vivo* et *in vitro* 47
3. Organisation tridimensionnelle et propriétés lyotropes du collagène *in vitro* 49

III. Mise en forme 3D de matrices denses de collagène et méthodes de caractérisation multi-échelles **54**

1. Procédés de mise en forme de matrices denses de collagène 54
2. Caractérisations multi-échelles des matrices denses de collagène 59

IV. Lumière polarisée et défauts topologiques dans les cristaux liquides lyotropes **64**

1. Polarisation, biréfringence et microscopie optique à lumière polarisée 65
2. Cristaux liquides, cristaux liquides lyotropes et défauts topologiques 68
    1. Cas de la phase nématique 71
    2. Cas de la phase cholestérique 74

Références bibliographiques 77

Chapitre 2 : Contexte, objectif et construction acellulaire des modèles osseux biomimétiques : la problématique du confinement 93

I. Modèles biomimétiques osseux de matrices denses de collagène et collagène/apatite **95**

II. Hypothèse de travail et structures visées de l'os cortical et l'os trabéculaire **99**

III. Preuves de concept du confinement et étude de l'influence du flux sur l'orientation du collagène 107

1. Effet du confinement sur l'organisation tridimensionnelle du collagène 109
2. Effet du flux sur l'organisation tridimensionnelle du collagène 114

IV. Conclusion 119

Références bibliographiques 120

Chapitre 3 : Vers l'os cortical par une structuration microfluidique des ostéons 129

I. Construction du modèle microfluidique 135

II. Etude de facteurs physico-chimiques pouvant contrôler l'organisation cristal-liquide 143

1. Effet de confinement 144
2. Effet de la concentration en collagène 147
3. Effet de surface de la chambre microfluidique 150
4. Effet de la géométrie du réseau de plots 152
5. Effet de la force ionique en vue de la co-précipitation collagène/hydroxyapatite .. 155

III. Défauts topologiques des organisations cristal-liquides 161

IV. Conclusion 168

Références bibliographiques 171

Chapitre 4 : Mésophases de collagène à porosité contrôlée 179

I. Vers l'os trabéculaire par un procédé d'émulsion ou d'agents porogènes 186

1. Procédé « foaming » : Carbonates d'ammonium $(NH_4)_2CO_3$ 187
2. Réplique de matériaux macroporeux 189
3. Procédés d'émulsion collagène-huile ou ségrégation de phases 192
   1. Ségrégation de phases collagène/glycérol 192
   2. Emulsion collagène-coprah 193
4. Templating par utilisation d'agents porogènes 199

II. Conclusion 203

Références bibliographiques 205

Matériel et Méthodes 215

I. Liste des réactifs et des solutions 218
II. Préparation des solutions de collagène 219
1. Extraction et purification du collagène de type I 219
2. Dosage de l'hydroxyproline 222
III. Concentration des solutions de collagène et synthèse des apatites 226
1. Concentration du collagène par évaporation ($[coll_{finale}] \leq 40$ mg/mL) 226
2. Concentration du collagène par dialyse inverse couplée à l'injection continue ($[coll_{finale}] \geq 40$ mg/mL) 227
3. Synthèse des matrices hybrides collagène/apatite (co-précipitation du collagène avec l'apatite) : CollCHA 231
4. Synthèse de matrices denses de collagène à partir de microparticules de collagène 233
5. Synthèse des apatites biomimétiques par diffusion de vapeur 234
IV. Fabrication des chambres microfluidiques texturées 235
V. Formation de porosités au sein des matrices denses de collagène 240
1. Emulsion collagène/ huile de coprah 241
2. Huile de coprah et agents porogènes 242
VI. Techniques de caractérisations 245
1. Etude de la microstructure : préparation des échantillons et observations 245
2. Etude la phase organique et de la phase minérale 255
Références bibliographiques 260

Conclusion générale 263
Références bibliographiques 268

Annexes 271
I. Planches de suivi des chambres microfluidiques 273
II. Travaux annexes 280
1. Matériaux hybrides collagène-apatite 281
2. Matrices de collagène transparentes 284

Liste des abréviations

Liste des abréviations

AA	acide aminé
AAc	acide acétique
ATG	analyse thermogravimétrique
BMU	basal multicellular unit ou unités cellulaires fonctionnelles de remodelage
CHA	carbonated hydroxyapatite ou apatite biomimétique
CLs	cristaux liquides
Coll	collagène
Da	daltons
DRX	diffraction des rayons X
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique
FN	fibres de nylon
MEB	microscope électronique à balayage
MEC	matrice extracellulaire
MET	microscope électronique en transmission
MOLP	microscope optique à lumière polarisée
NCPs	non collagenous proteins ou protéines non collagéniques
PBS	phosphate buffer saline ou solution tampon phosphate
PEG	polyéthylène glycol
PGs	protéoglycanes
pH	potentiel hydrogène
PolScope	microscope optique à lumière polarisée à mesure polscope
RMN	résonnance magnétique nucléaire
r.p.m	rotations par minute
RX	rayons X
SAXS	small-angle X-ray scattering
TA	température ambiante

Introduction générale

L'os est un matériau hybride qui associe une trame organique dense et organisée de fibrilles de collagène (type I) et un réseau minéral d'hydroxyapatite. Il possède une architecture hiérarchique complexe, décrite dans la littérature de l'échelle de la molécule jusqu'à l'échelle de l'organe (Weiner et Wagner 1998 ; Reznikov *et al.* 2014 ; Reznikov *et al.* 2018). On distingue dans cette description deux différents tissus osseux que sont le tissu cortical et le tissu trabéculaire. Le point commun entre ces deux organisations est la présence d'une structure en contre-plaqué torsadé que l'on associe à une géométrie cristal-liquide cholestérique (Bouligand 1972 ; Giraud-Guille 1988). Sans cesse remodelé au cours du temps, le tissu osseux doit maintenir ses propriétés et sa structure pour pallier à la formation de défauts (Parfitt 1994 ; Manolagas 2000).

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes efforcés de reproduire *in vitro* l'organisation hiérarchique tridimensionnelle de ce matériau biologique à l'échelle de l'os cortical et trabéculaire afin de répondre à une question principale : **comment étudier la morphogénèse du tissu biologique d'un point de vue physico-chimique *in vitro* ?**

Il semble communément accepté que la morphogénèse du tissu osseux soit régie par l'activité cellulaire. En effet, la littérature propose de nombreux mécanismes pour expliquer la formation de cette architecture si complexe principalement basés sur une cascade d'activités cellulaires, notamment la rotation périodique et orientée des ostéoblastes (Yamamoto 2012).

Néanmoins, cela n'explique pas pourquoi les ostéoblastes qui forment un tapis cellulaire en 2D interrompent périodiquement de façon synergique leurs jonctions cellulaires pour effectuer une rotation sur eux-mêmes et comment un tel contrôle du sens de rotation se fait sur une si grande surface après chaque néosynthèse de collagène ? Cette question est d'autant plus pertinente que d'une part, le pas du contre-plaqué torsadé équivaut à une rotation de 360° autour de l'axe hélicoïdal du cholestérique, et d'autre part, l'épaisseur d'une lamelle osseuse est d'environ 5-8 µm (Wagermaier *et al.* 2006). Ce mécanisme paraît donc envisageable mais à l'échelle de quelques cellules et sur une faible épaisseur du matériau.

L'hypothèse de ce travail est donc que si localement l'activité cellulaire régit la formation du tissu osseux, l'organisation à l'échelle suprafibrillaire résulte de processus physico-chimiques dont il serait intéressant d'en identifier la nature.

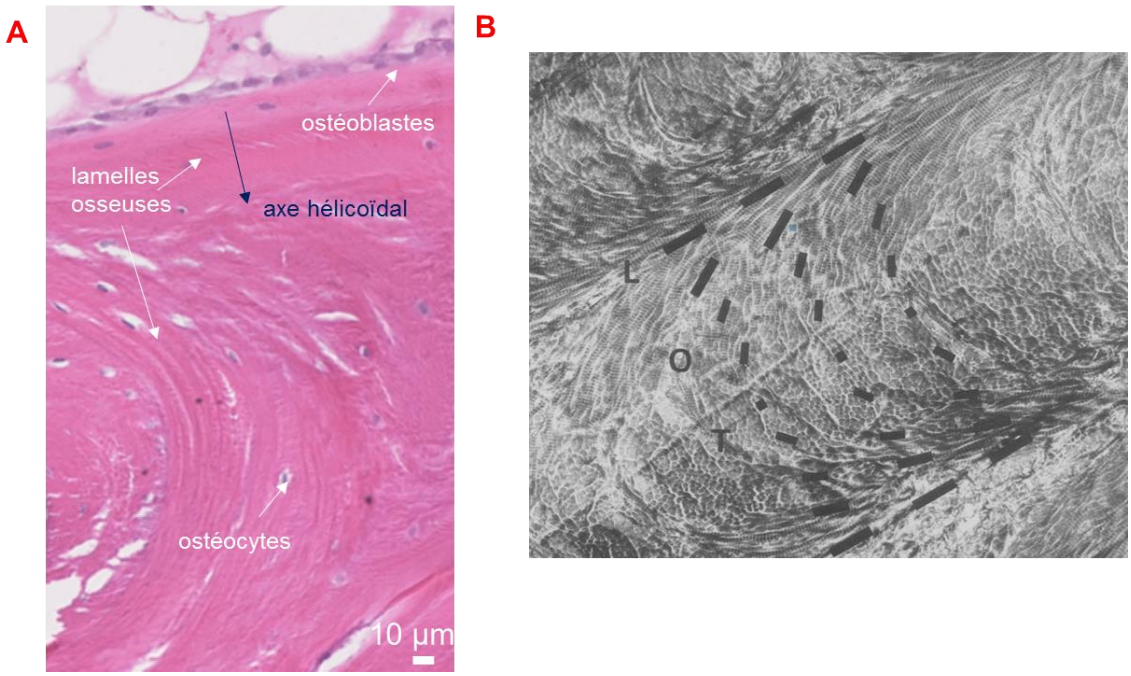


Figure 1 : (A) Coupe histologique d'un os de brebis (2 ans) colorée à l'hémalun, observée en lumière blanche (grandissement x10). On distingue les ostéocytes et ostéoblastes ainsi que les lamelles osseuses. L'épaisseur d'une lamelle est d'environ 5 µm. L'axe hélicoïdal du contre-plaqué est perpendiculaire au tapis cellulaire. (B) Cliché en MET d'une coupe oblique ultrafine d'une lamelle osseuse d'os compact humain dévoilant la structure en arceaux caractéristique du contre-plaqué torsadé. La direction des fibrilles est indiquée par les barres noires : (L) longitudinales, (O) obliques et (T) transverses au plan. Reproduit de Giraud-Guille et al. 1988.

De précédents travaux au laboratoire ont montré qu'il était possible d'élaborer des matrices denses de collagène acellulaires, minéralisées ou non, dont la densité et l'organisation tridimensionnelle en contre-plaqué torsadé sont similaires à celles du tissu osseux en utilisant les propriétés cristal-liquides du collagène *in vitro* (Wang *et al.* 2011 ; Wang *et al.* 2012). Ces résultats ont conforté l'hypothèse d'Yves Bouligand (Bouligand 1972, Bouligand *et al.* 1985) visant à montrer que les biopolymères des matrices extracellulaires (MECs) des tissus biologiques étaient des analogues cristal-liquides et que de tels mécanismes pourraient intervenir dans leur formation.

Néanmoins, les procédés utilisés reproduisent la microstructure locale du tissu osseux. En effet, les domaines s'apparentant à une géométrie cristal-liquide cholestérique sont distribués aléatoirement dans la matrice, qui présente également des domaines non-organisés (isotropes) et alignés. Ainsi, si la microstructure osseuse avait été reproduite localement, il fût important d'élaborer de nouveaux procédés originaux de préparation de matrices denses de collagène afin de contrôler d'une part la géométrie des domaines anisotropes et d'autre part, leur distribution spatiale pour reproduire l'os à l'échelle du tissu osseux cortical et trabéculaire.

En vue de l'élaboration d'un modèle « biomimétique » en termes de composition (collagène, eau, hydroxyapatite) et de structure, nous avons mis en place différents modèles mettant en jeu différents facteurs physico-chimiques (confinement, flux, concentration en collagène, géométrie) afin de mimer l'os cortical d'une part, et l'os trabéculaire d'autre part. Nous avons respectivement utilisé une structuration par la microfluidique et une structuration par émulsion/porogènes pour ces deux modèles tissulaires.

Dans ce travail de thèse, les microscopies optiques (à lumière polarisée et à mesures polscope) et la microscopie électronique (à balayage) se sont révélées être les techniques les plus adaptées pour étudier les propriétés lyotropes et l'arrangement tridimensionnel du collagène dans nos modèles. Nos matrices ont été également caractérisées par d'autres techniques telles que la résonance magnétique nucléaire à l'état solide et la diffraction/diffusion des rayons X aux petits angles. Nos caractérisations ont été comparées à celles d'échantillons osseux de référence de différentes espèces afin de pouvoir conclure quant aux phénomènes observés.

Ce manuscrit est organisé en **5 chapitres** qui détaillent le cheminement de l'étude visant à démontrer l'implication de paramètres physico-chimiques dans la morphogénèse de l'os.

Le **Chapitre 1** est un chapitre bibliographique qui démontre le caractère interdisciplinaire de ma thèse et pointe toute sa complexité. Il traite tout d'abord des notions générales sur le tissu osseux et de sa formation *in vivo*, puis sur le collagène et ses propriétés lyotropes *in vitro*. J'ai voulu également présenter dans ce chapitre quelques notions sur l'observation de cristaux liquides en lumière polarisée, qui est au cœur de cette thèse.

Le **Chapitre 2** est dédié quant à lui, à la mise en place de modèles acellulaires biomimétiques du tissu osseux permettant de comprendre l'effet du confinement sur l'organisation des domaines cristal-liquides du collagène.

Les **Chapitres 3** et **4** traitent respectivement des modèles établis et des résultats obtenus pour reproduire l'arrangement tridimensionnel de l'os cortical et trabéculaire. Ces deux chapitres présentent des notions bibliographiques plus spécifiques aux modèles existant déjà dans la littérature.

Le **Chapitre 5** regroupe l'ensemble des procédés de préparation et techniques expérimentales utilisées pendant cette thèse, sous le titre **Matériels et Méthodes**.

Enfin, j'ai ajouté des **Annexes** de planches illustrant les nombreuses observations effectuées en MOLP et en PolScope. J'y présente également les travaux qui ne sont pas directement liés à mon sujet de thèse mais dans lesquels je suis intervenue à savoir : 1) sur la caractérisation de matrices denses de collagène transparentes par tomographie de cohérence optique (OCT) (Salameh *et al.* 2020), et 2) sur l'étude du potentiel de matrices denses hybrides collagène/apatite à posséder des propriétés ostéoinductives (implantations chez le petit animal : rat) (article en cours de rédaction).

Références bibliographiques

Bouligand, Y. 1972. « Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases ». *Tissue and Cell* 4 (2): 189-217.

Bouligand, Y., J. P. Denefle, J. P. Lechaire, et M. Maillard. 1985. « Twisted architectures in cell-free assembled collagen gels: study of collagen substrates used for cultures ». *Biology of the Cell* 54 (2): 143-62.

Giraud-Guille, M. M. 1988. « Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons ». *Calcified Tissue International* 42 (3): 167-80.

Parfitt, A. M. 1994. « Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone ». *Journal of Cellular Biochemistry* 55 (3): 273-86.

Reznikov, N., M. Bilton, L. Lari, M. M. Stevens, et R. Kröger. 2018. « Fractal-like hierarchical organization of bone begins at the nanoscale ». *Science* 360 (6388).

Reznikov, N., R. Shahar, et S. Weiner. 2014. « Bone hierarchical structure in three dimensions ». *Acta Biomaterialia*, Biomineralization, 10 (9): 3815-26.

Salameh C., F. Salviat, E. Bessot, M., J.-M. Chassot, E. Moulongui, Y. Wang, et al. 2020. « Origin of transparency in scattering biomimetic collagen materials ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (22): 11947-53.

Wagermaier, W., H. S. Gupta, A. Gourrier, M. Burghammer, P. Roschger, et P. Fratzl. 2006. « Spiral twisting of fiber orientation inside bone lamellae ». *Biointerphases* 1 (1): 1-5.

Wang Y., T. Azaïs, M. Robin, A. Vallée, C. Catania, P. Legriel, G. Pehau-Arnaudet, F. Babonneau, M.-M. Giraud-Guille, et N. Nassif. 2012. « The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite ». *Nature Materials* 11 (8): 724-33.

Wang Y., J. Silvent, M. Robin, F. Babonneau, A. Meddahi-Pellé, N. Nassif, et M. M. Giraud Guille. 2011. « Controlled collagen assembly to build dense tissue-like materials for tissue engineering ». *Soft Matter* 7 (20): 9659-64.

Weiner, S., et H. D. Wagner. 1998. « The material bone: structure-mechanical function relations ». *Annual Review of Materials Science* 28 (1): 271-98.

Yamamoto, T., T. Hasegawa, M. Sasaki, H. Hongo, C. T., Z. Liu, M. Li, et N. Amizuka. 2012. « Structure and formation of the twisted plywood pattern of collagen fibrils in rat lamellar bone ». *Microscopy* 61 (2): 113-21.

Chapitre 1 : Etat de l’art

Tables des matières du Chapitre 1

Chapitre 1 : Etat de l'art 25

I. Le tissu osseux 27

1. Anatomie 27
2. Composition 30
3. Organisation hiérarchique 31
4. Formation du tissu osseux 38
    1. Ossification primaire 39
    2. Ossification secondaire 42

II. Le collagène : structure, synthèse et cristaux liquides 45

1. La molécule de collagène 46
2. Synthèse des fibrilles de collagène *in vivo* et *in vitro* 47
3. Organisation tridimensionnelle et propriétés lyotropes du collagène *in vitro* 49

III. Mise en forme 3D de matrices denses de collagène et méthodes de caractérisation multi-échelles 54

1. Procédés de mise en forme de matrices denses de collagène 54
2. Caractérisations multi-échelles des matrices denses de collagène 59

IV. Lumière polarisée et défauts topologiques dans les cristaux liquides lyotropes ... 64

1. Polarisation, biréfringence et microscopie optique à lumière polarisée 65
2. Cristaux liquides, cristaux liquides lyotropes et défauts topologiques 68
    1. Cas de la phase nématique 71
    2. Cas de la phase cholestérique 74

Références bibliographiques 77

I. Le tissu osseux

Le squelette des vertébrés constitue l'organe principal de soutien et de motilité de l'organisme. Il assure deux grandes fonctions : une fonction biomécanique qui soutient et protège les parties molles comme les organes internes et une fonction biologique en assurant la production de minéraux (Ca^{2+}, PO_4^{3-}, CO_3^{2-}) et de cellules sanguines nécessaires au fonctionnement de l'organisme. Il est essentiellement composé de deux tissus distincts qui sont le tissu cartilagineux et le tissu osseux. Les os constituent la charpente du corps humain.

L'os est un matériau hybride composé d'une phase organique, principalement des fibrilles de collagène de type I, et d'une phase minérale, des cristaux d'hydroxyapatite. Cette association complexe se traduit par une hiérarchie d'organisation particulière du tissu osseux, c'est-à-dire une organisation à différents niveaux, de l'échelle nanométrique jusqu'à l'échelle visuelle, mettant en jeu d'autres composants (cellules, protéines, minéraux) et qui varie au cours du temps et de la sollicitation. Ainsi, le tissu osseux est soumis à un ensemble de contraintes métaboliques et mécaniques au cours de son existence. Le tissu osseux est sans cesse renouvelé par les cellules osseuses (*i.e.* remodelage osseux) lui permettant de conserver sa densité, ses fonctions métaboliques et ses propriétés mécaniques.

1. Anatomie

Le squelette humain est composé de 206 pièces osseuses que l'on peut distinguer en trois catégories : (1) les os dits longs tels que le tibia ou le fémur, (2) les os dits courts tels que les carpes ou les tarses et enfin, (3) les os dits plats tels que les côtes ou le sternum (*Figure 1*).

Les os longs possèdent une partie centrale qu'on appelle diaphyse, des extrémités qu'on nomme épiphyses et des extrémités intermédiaires que l'on appelle métaphyses (*Figure 2A*). On distingue deux types de tissus osseux : le tissu cortical et le tissu trabéculaire (*Figure 2B*). La diaphyse est essentiellement constituée d'os cortical (compact) en périphérie et d'un canal médullaire central contenant de l'os trabéculaire et de la moelle osseuse. Les épiphyses quant à elles sont majoritairement constituées d'os trabéculaire et recouvertes d'une fine épaisseur d'os cortical. Les métaphyses sont les régions intermédiaires situées entre les diaphyses et les épiphyses. Les périostes et endostes sont respectivement, les interfaces externes (avec les tissus mous) et internes (avec la moelle) de l'os.

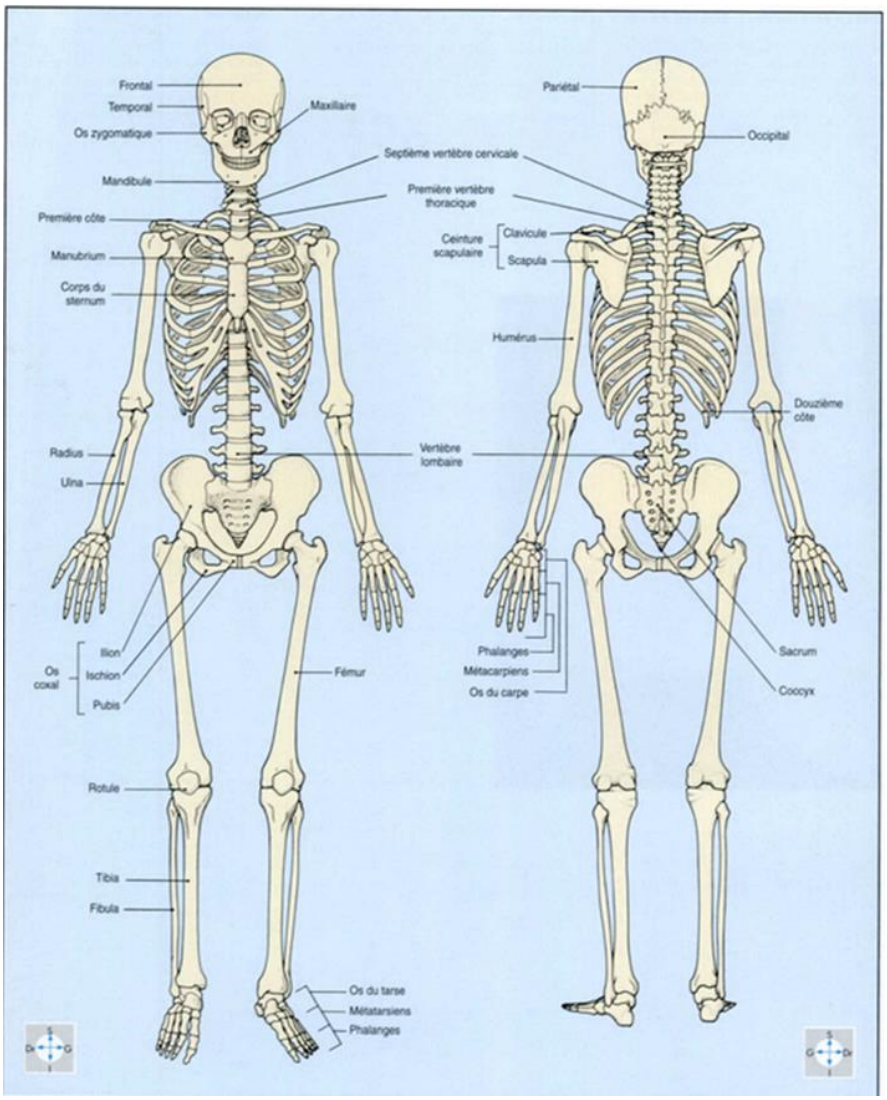


Figure 1 : Représentation schématique du squelette humain en vue antérieure et postérieure. Reproduit d'après Gosling et al. 2003.

L'os cortical est quant à lui décrit comme l'arrangement de lamelles osseuses continues s'organisant de façon concentrique afin de former des unités cylindriques qu'on appelle ostéons (ou systèmes haversiens). On retrouve au centre des ostéons les canaux de Havers qui permettent l'irrigation (vaisseaux sanguins) et l'innervation (nerfs) de l'os (*Figure 2B*). Les canaux de Havers sont reliés entre eux par des canaux transversaux qu'on appelle canaux de Volkmann. Les ostéocytes présents dans l'os cortical se situent quant à eux dans des lacunes ostéocytaires (*Figure 2C*).

L'os trabéculaire forme un réseau tridimensionnel de travées osseuses interconnectées délimitant des macropores, ce qui lui donne son aspect d'éponge (*Figure 2D*). Les macropores contiennent de la moelle osseuse rouge. Cet arrangement permet de renforcer la résistance mécanique selon des directions privilégiées et est en constant remodelage afin de palier à l'intensité des chocs subis par la structure osseuse.

L'os cortical représente 80% de la masse osseuse du squelette humain et est peu poreux (entre 5 et 15% de porosité) tandis que l'os trabéculaire est très poreux (entre 75 et 95% de porosité) (McCalden *et al.* 1993 ; Schaffler et Burr1988) (*Figure 3A et B*).

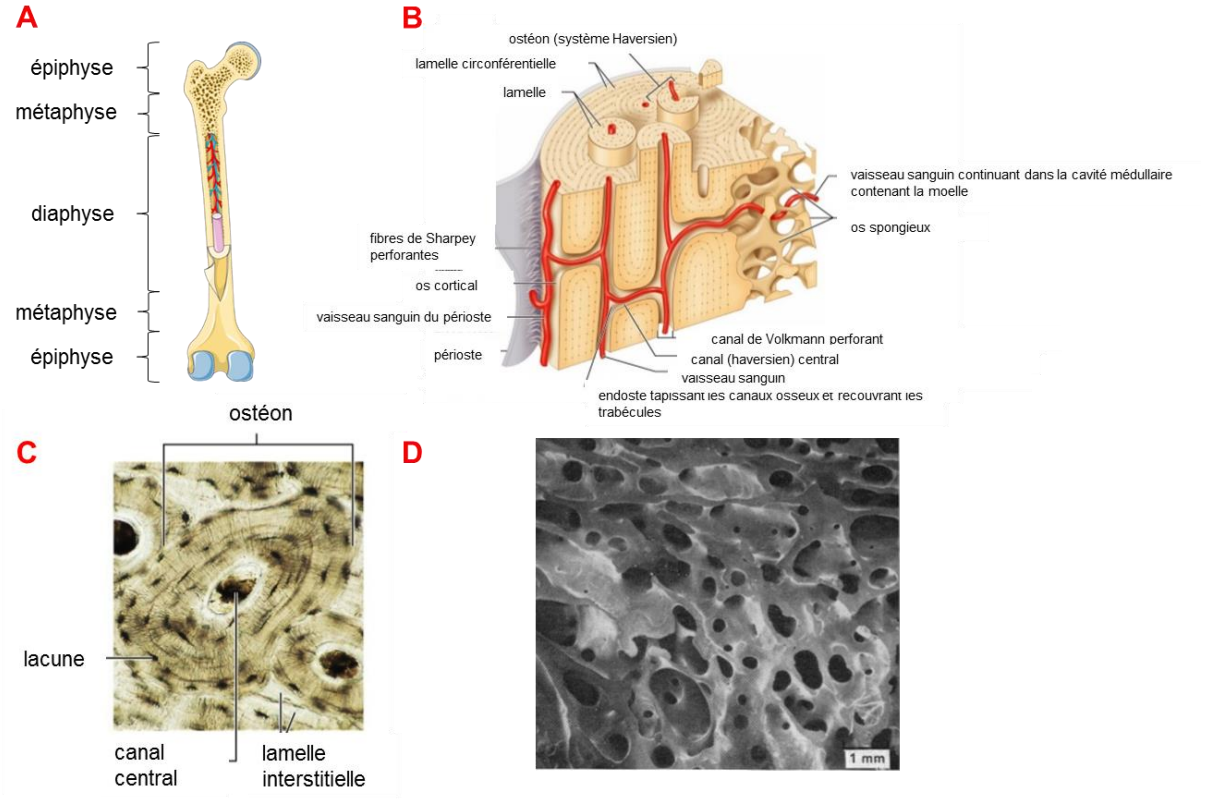


Figure 2 : (A) Schéma d'un os long en coupe sagittale. Reproduit d'après Servier Médical Art. (B) Schéma d'une coupe longitudinale d'un système de Havers laissant apparaitre la transition os compact-os spongieux ainsi que les vaisseaux sanguins qui pénètrent l'os compact et se ramifient dans l'os spongieux. Reproduit d'après Cummings, Pearson Education Inc. 2006. (C) Cliché en microscopie optique de l'organisation au sein de l'os compact constitué d'un canal central et de lacunes osseuses. Reproduit de Cummings, Pears on Education Inc. 2006 (D) Cliché MEB d'un os spongieux constitué de trabécules délimitant des macropores remplis de moelle osseuse rouge. Reproduit de Whitehouse et Dyson 1974.

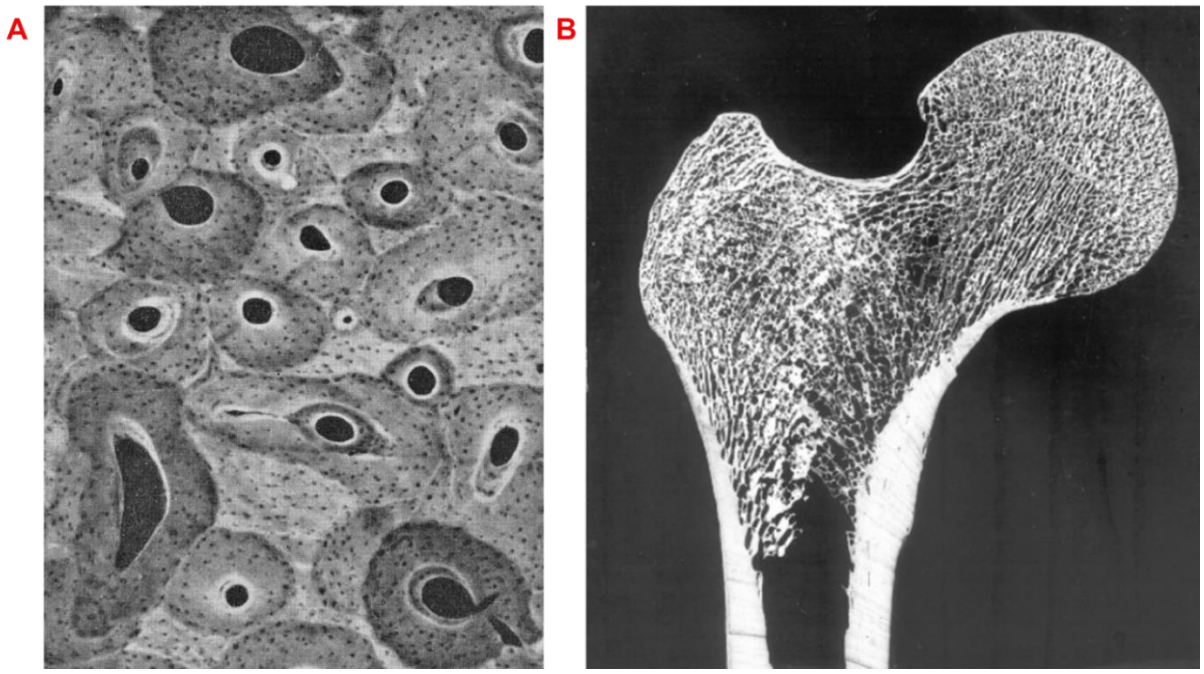


Figure 3 : (A) Coupe transverse d'un os cortical observé en MEB. Les unités haversiennes cylindriques sont visibles. (B)Coupe longitudinale de la diaphyse d'un fémur permettant de visualiser la répartition os compact-os spongieux : la tête fémorale (ou épiphyse) est constituée de trabécules osseuses tandis que l'os compact constitue la diaphyse. Reproduits de Glimcher 1959.

2. Composition

Comme indiqué précédemment, le tissu osseux est un matériau qui se remodèle sans cesse au cours de la vie de l'organisme. C'est un matériau hybride qui est composé d'une matrice extracellulaire (MEC) et de cellules osseuses (ostéoblastes, ostéoclastes, ostéocytes). Cette MEC est composée d'une trame organique minéralisée et hydratée. La phase organique est majoritairement constituée de fibrilles de collagène de type I et d'autres protéines non-collagéniques (NCPs). Quant à la phase minérale, elle est composée de nanocristaux d'hydroxyapatite carbonatée dont la dernière formule proposée dans la littérature est : $Ca_{7.5}(PO_4)_{2.8}(HPO_4)_{2.6}(CO_3)_{0.6}(OH)_{0.2}$ (Von Euw *et al.* 2019). La part d'hydratation de la MEC joue un rôle important dans l'organisation du tissu. Les molécules d'eau sont retrouvées dans l'ensemble du tissu, par exemple au niveau des espaces interfibrillaires et à la surface des nanoplaquettes d'hydroxyapatite (Bonar *et al.* 1985 ; Wang *et al.* 2012).

Sur la *Figure 4*, les proportions massiques des principaux composants de l'os sont données. Elles sont amenées à évoluer selon l'âge, le sexe, les contraintes environnementales et mécaniques qui s'exercent sur le tissu osseux. Les proportions volumiques des principaux composants de l'os ont également été étudiées dans la littérature (Gong *et al.* 1964) avec des fractions volumiques de 36% de matières organiques, 5% de minéraux et 25% d'eau. Le rapport organique/minéral varie donc suivant le référentiel choisi.

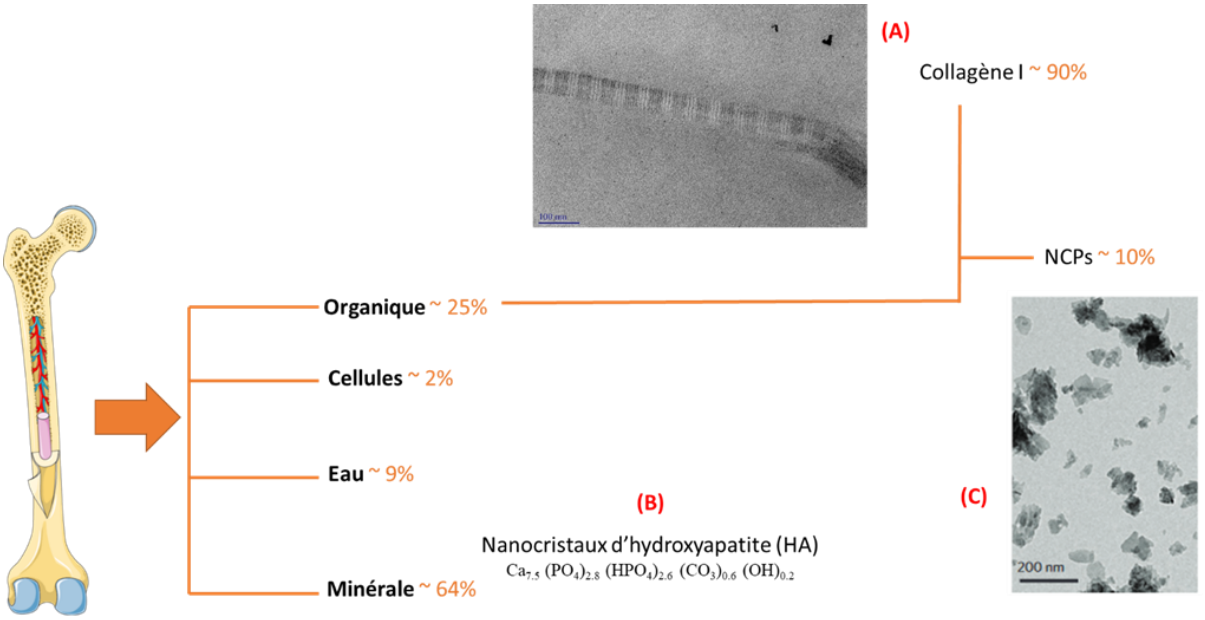
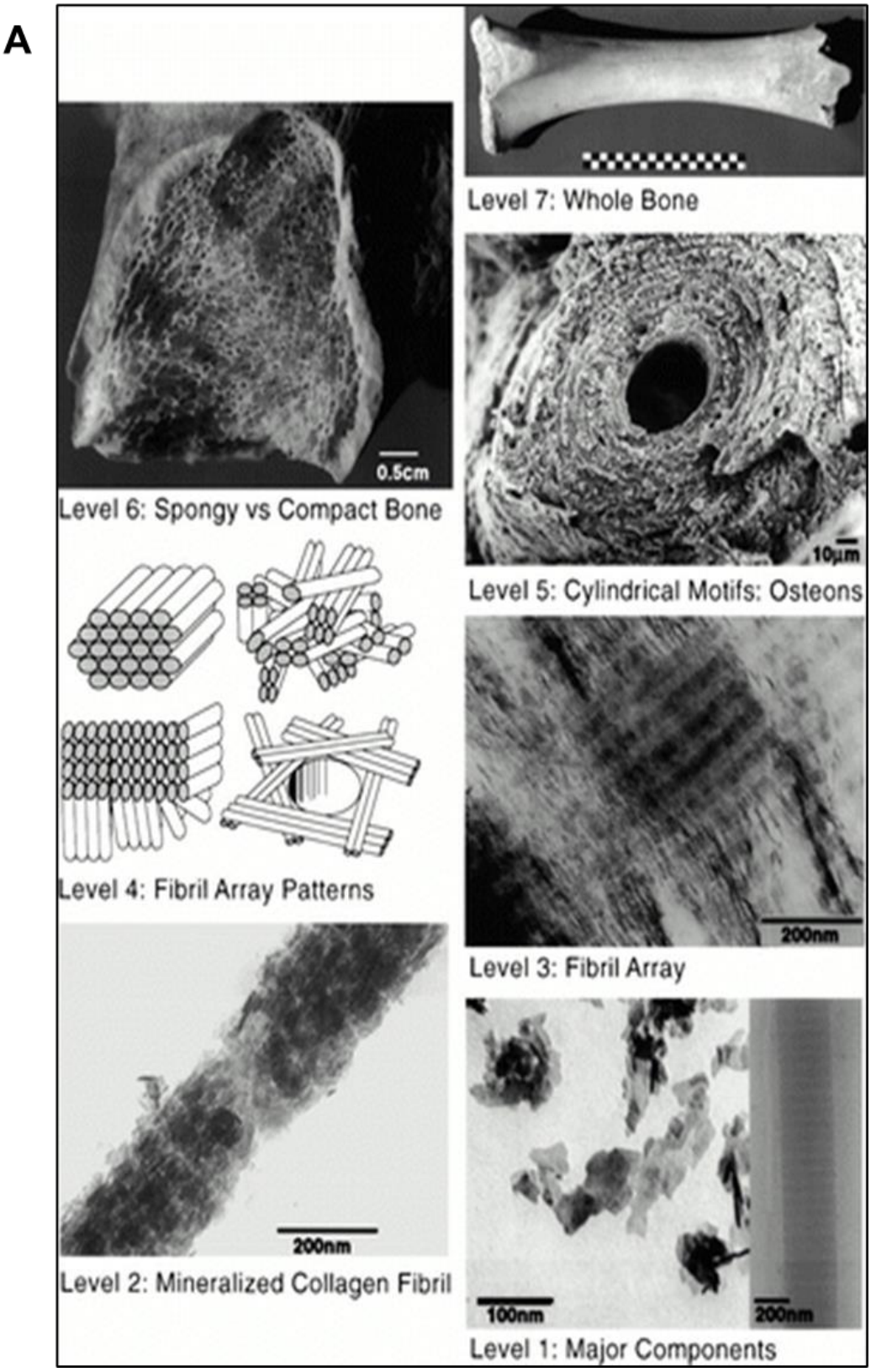
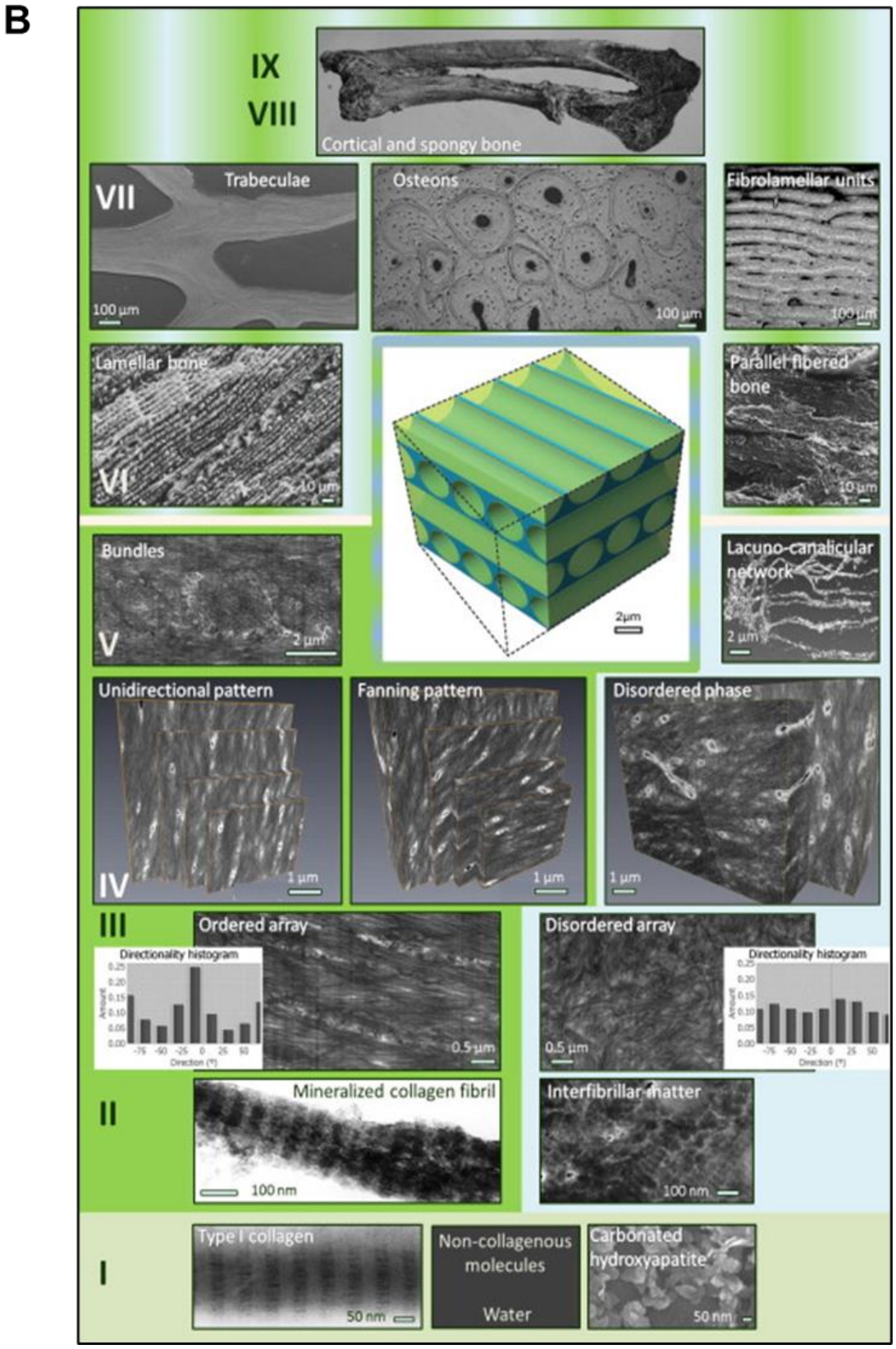


Figure 4 : Schéma des proportions massiques du tissu osseux humain. Reproduit d'après Marc Robin 2017. Proportions extraites d'après LeGeros 1981. (A) Cliché en MET d'une coupe ultrafine de fibrille de collagène. (B) Formule stœchiométrique de l'hydroxyapatite. Von Euw et al., Scientific Reports, 2019. (C) Cliché en MET de cristaux d'hydroxyapatite. Wang et al. 2012.

3. Organisation hiérarchique

Le tissu osseux est décrit selon différents niveaux d'organisation hiérarchique, de l'échelle subnanométrique (molécules, cristaux) jusqu'à l'échelle centimétrique (organe). Différentes descriptions de cette organisation hiérarchique ont été proposées dans la littérature ces dernières années à savoir en 7 niveaux par Weiner et Wagner (Weiner et Wagner 1998) (*Figure 5A*), puis respectivement en 9 (Reznikov *et al.* 2014) et en 12 niveaux de hiérarchisation (Reznikov *et al.* 2018) (*Figure 5B* et *Figure 5C*). Nous allons décrire plus précisément chaque niveau d'organisation selon la description la plus récente en 12 niveaux.


A
0.5cm
Level 6: Spongy vs Compact Bone
Level 4: Fibril Array Patterns
200nm
Level 2: Mineralized Collagen Fibril
Level 7: Whole Bone
10μm
Level 5: Cylindrical Motifs: Osteons
200nm
Level 3: Fibril Array
100nm
200nm
Level 1: Major Components


B
IX
VIII
Cortical and spongy bone
VII
Trabeculae
100 µm
Osteons
100 µm
Fibrolamellar units
100 µm
Lamellar bone
VI
10 µm
2µm
Parallel fibered bone
10 µm
Bundles
V
2 µm
Lacuno-canalicular network
2 µm
Unidirectional pattern
IV
1 µm
Fanning pattern
1 µm
Disordered phase
1 µm
III
Ordered array
Directionality histogram
0.5 µm
Disordered array
0.5 µm
Directionality histogram
II
Mineralized collagen fibril
100 nm
Interfibrillar matter
100 nm
I
Type I collagen
50 nm
Non-collagenous molecules
Water
Carbonated hydroxyapatite
50 nm

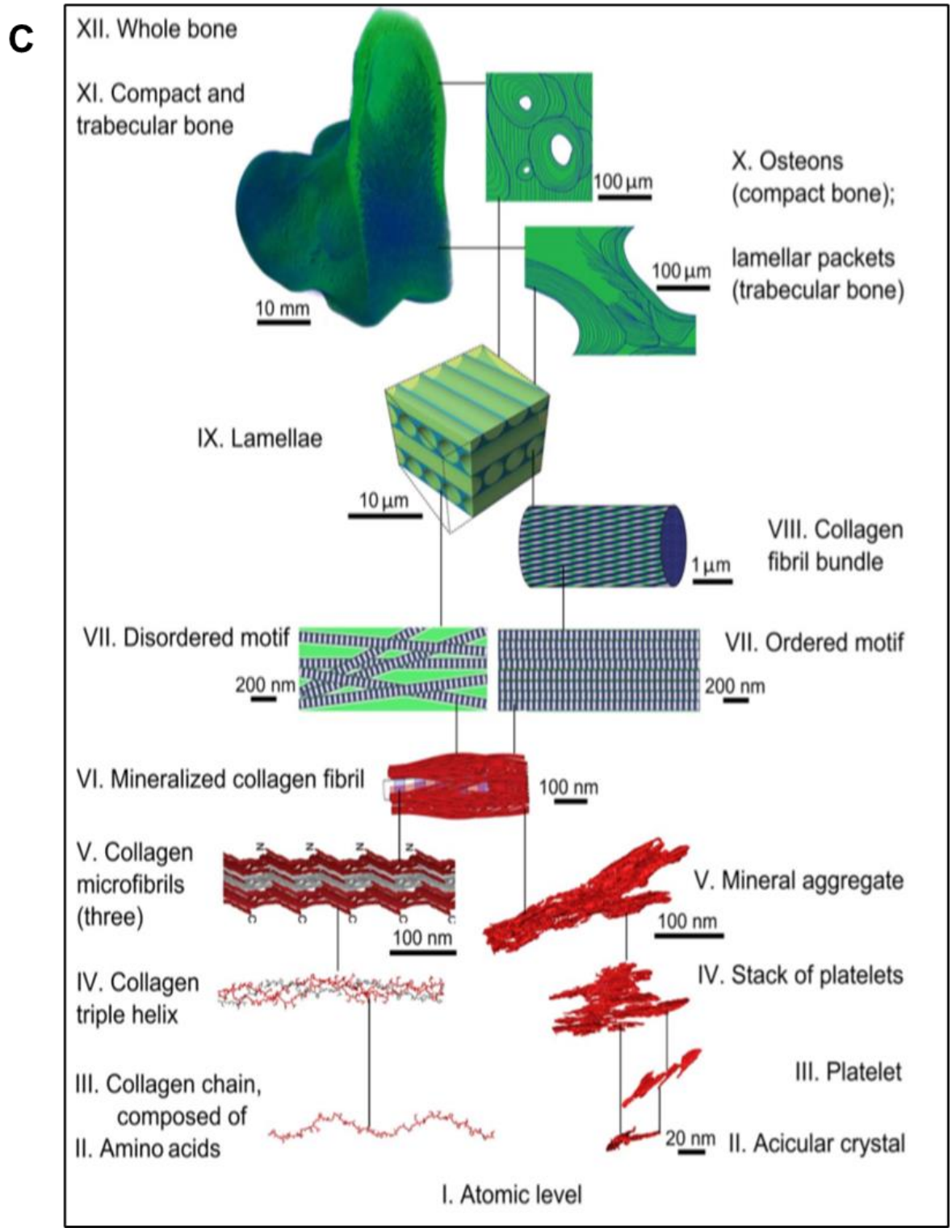


Figure 5 : Description des niveaux d'organisation hiérarchique du tissu osseux proposés dans la littérature selon (A) Reproduit d'après Weiner et Wagner 1998. (B) Reproduit d'après Reznikov et al.2014 (C) Reproduit d'après Reznikov and al. 2018.

Niveau I, II, III, IV et V : Les composants majeurs du tissu osseux

Les premiers niveaux de cette description sont formés par les principaux constituants de la MEC du tissu osseux. En effet, même s'ils ne sont pas présentés, les NCPs, telles que les protéoglycanes, l'ostéopontine ou encore l'ostéocalcine, et l'eau participent également à la formation du tissu osseux Les fibrilles de collagène sont composées de microfibrilles (V) qui elles-mêmes sont formées à partir de plusieurs molécules de collagène (IV) constituées de chaînes répétitives d'acides aminés (III et II). La phase minérale imbrique aussi différents motifs de complexité croissante : des cristaux sous forme d'aiguilles (aciculaires, II) s'organisent en plaquettes (III) sous forme de pile (IV) et qui finissent par former un agrégat minéral (V). A ces niveaux d'organisation, il n'y a pas de distinction entre les différents tissus osseux.

Niveau VI : La fibrille de collagène minéralisée

La fibrille minéralisé forme l'unité de base du tissu osseux. Les fibrilles présentent un décalage périodique de 67 nm, que l'on appelle période D, qui correspond à l'alternance de zones de gap et d'overlap. A ce niveau submicrométrique, la fibrille de collagène présente un diamètre compris entre 80 et 120 nm. Les plaquettes d'hydroxyapatite s'alignent selon leur axe cristallographique c le long de l'axe principal de la fibrille. Un débat dans la littérature porte sur la présence de cristaux au sein des espaces intrafibrillaires (Olszta *et al.* 2007 ; George et Veis 2008 ; Boonrungsiman *et al.* 2012 ; Jäger et Fratzl 2000). La fibrille de collagène sera présentée plus en détails plus loin dans ce chapitre.

Niveau VII : Réseaux d'organisation

Ce niveau d'organisation décrit les différents motifs d'agencement tridimensionnel de fibrilles minéralisées et permet de débuter la différenciation entre les différents types de tissus osseux grâce à la structure obtenue. L'os spongieux et lamellaire s'organisent de façon ordonnée ou désordonnée.

(i) Le prolongement du réseau de fibrilles minéralisées alignées dans un même axe à plus grande échelle constitue le motif d'agencement le plus simple. Cet alignement à grande distance permet l'anisotropie du tissu osseux. Ce motif unidirectionnel peut être retrouvé dans différents tissus osseux comme l'os lamellaire, les fibres de Sharpey (Sharpey 1846) ou encore dans les tendons minéralisés (Landis *et al.* 1986). Cette organisation est utilisée pour expliquer les premières étapes de la formation osseuse (Weiner et Wagner 1998).

(ii) Le second motif d'agencement consiste en la rotation progressive de l'orientation d'un plan de fibrilles minéralisées par rapport aux autres. Ce motif appelé « twisted plywood » ou motif en contreplaqué torsadé (Bouligand 1985), peut être observé respectivement dans l'os compact de façon concentrique dans les ostéons et dans l'os spongieux, au sein de travées osseuses.

(iii) Des motifs d'agencements dits « désordonnés » sont décrits localement au sein de réseaux anisotropes de fibrilles de collagène mais aussi sur de plus grands domaines. Les fibrilles sont alors isolées et ne permettent donc pas l'obtention d'un tissu dense (Reznikov *et al.* 2014).

Niveau VIII : Formation de faisceaux ou « bundles »

Les fibrilles s'auto-assemblent afin de former des fibres de collagène. Les fibres ont un diamètre d'environ 1-3 µm et possèdent le même décalage périodique de 67 nm. L'agencement des faisceaux permet d'obtenir une structure anisotrope et co-orientée. Ces fibres pourraient aussi expliquer l'association possible des fibres de collagène et des protéoglycanes par la présence de constituants non-collagéniques situés entre les fibres de collagène (Reznikov *et al.* 2014).

Niveau IX : Motifs des différents tissus osseux

A ce niveau d'organisation, l'agencement tridimensionnel du contreplaqué torsadé dans les tissus permet de distinguer les différents types d'os.

(i) L'os lamellaire est le tissu le plus commun qui constitue l'os. Il est composé de lamelles osseuses, de 3 à 7 microns d'épaisseur, contenant chacune des faisceaux de fibrilles minéralisées orientés différemment de manière unidirectionnelle ou en contreplaqué.

(ii) L'os fibrillaire est composé de fibrilles orientées dans la même direction qui sont séparées par de fines couches de tissus « désordonnés ». On retrouve notamment cette organisation dans les tendons et les fibres de Sharpey (Weiner et Wagner 1998).

(iii) L'os « tissé » ou *woven bone* est un motif de tissu osseux primaire que l'on retrouve lors du remodelage osseux. Il est composé de faisceaux de fibrilles de collagène minéralisées ne présentant pas d'orientation préférentielle. C'est un tissu produit par les cellules osseuses et qui sert de support transitoire à la formation d'os lamellaire, on dit alors que c'est un os « immature ».

Niveau X : Unités du tissu osseux

Dans l'os cortical, les lamelles osseuses s'organisent de façon concentrique afin de former les ostéons. On distingue les ostéons primaires et les ostéons secondaires qui possèdent le même agencement des lamelles osseuses. Les ostéons primaires sont formés sans *cement line*, la couche externe des ostéons secondaires ont quant à eux subis un remodelage osseux. La *cement line* est une structure décrite dans l'os qui correspond à la zone frontière entre os mature et le tissu ostéoïde non minéralisé (Ebner 1875 ; Schaffler *et al.* 1987). C'est un tissu constitué de fibrilles de collagène (Weidenreich 1930 ; Davies et Hosseini 2000) et minéralisé (Skedros *et al.* 2005). Les ostéons secondaires (ou systèmes haversiens) sont plus abondants dans les tissus osseux adultes et présentent un diamètre moyen de 100-200 microns et un canal au centre d'un diamètre compris entre 40 et 100 microns.

Dans l'os spongieux, les lamelles osseuses s'assemblent selon une direction donnée pour former les trabécules osseuses qui forment la macroporosité interconnectée. La taille des pores au sein de l'os spongieux peut aller de l'échelle de micromètre jusqu'à l'échelle du millimètre.

C'est cette échelle qui nous intéresse plus particulièrement dans cette thèse. En effet, la formation de ces agencements *in vitro* est la clé dans la compréhension des mécanismes physico-chimiques impliqués dans la morphogénèse du tissu osseux. Ces organisations seront plus étudiées en détail aux **Chapitres 3** et **4**.

Niveau XI : Tissus

Ce niveau d'organisation décrit les deux différents types de tissus osseux qu'on retrouve dans la structure des os : l'os cortical et l'os trabéculaire. Ils sont tous deux composées de lamelles osseuses dont l'agencement tridimensionnel diffère. Leur composition varie légèrement également, l'os trabéculaire présente des tailles de cristallites plus petites et un rapport molaire Ca/P plus faible que dans l'os cortical (Eastoe 1956 ; Bigi *et al.* 1997). L'association de la composition et de la structure de ces deux tissus leur confèrent des propriétés mécaniques différentes.

Niveau XII : Organe

Ce dernier niveau présente l'os dans son ensemble.

4. Formation du tissu osseux

Dans la littérature, la formation du tissu osseux est une thématique de recherche qui suscite un grand intérêt. L'ostéogénèse est principalement décrite comme une cascade d'actions cellulaires. Cependant, ce mécanisme est vivement remis en question. Dans notre étude, nous proposons que l'activité cellulaire ne régît pas seule la formation du tissu (**Chapitres 3** et **4**).

L'ostéogénèse est un processus de différenciation cellulaire au cours duquel le tissu conjonctif se différencie en tissu osseux. On peut distinguer deux types d'ossification : l'ossification primaire qui se déroule lors de l'embryogénèse et l'ossification secondaire qui correspond au passage de l'os primaire à l'os mature (*i.e.* remodelage osseux).

Différentes cellules osseuses interviennent lors de l'ostéogénèse parmi lesquelles on distingue deux grands types cellulaires : les cellules dites ostéoformatrices (ostéoblastes) (*Figure 6A*) et les cellules ostéorésorbantes (ostéoclastes) (*Figure 6B*). Il est à noter la présence de deux autres types cellulaires dérivant de la lignée ostéoblastique : les ostéocytes qui sont localisés au sein de la matrice minéralisée et les cellules bordantes qui sont des ostéoblastes aplatis le long de surfaces osseuses dites inactives (*Figure 6A*).

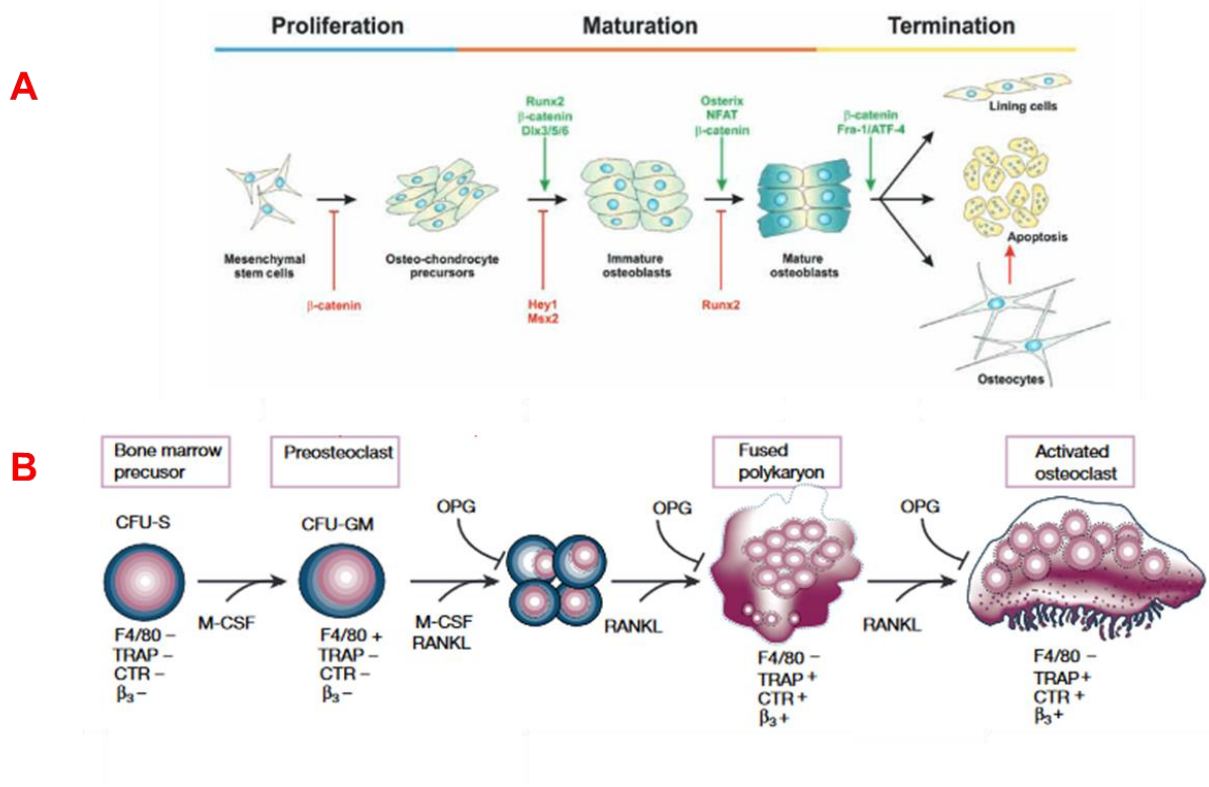


Figure 6 : (A) Schéma de la différenciation de cellules mésenchymateuses en ostéoblastes. La différenciation nécessite l'expression de facteurs de transcription spécifique. Les ostéoblastes matures peuvent se différencier en ostéocytes, des cellules bordantes ou mourir par apoptose. Reproduit de De Gorter et Dijke 2013. (B) Schéma de la différenciation de la lignée des macrophages en ostéoclastes. Reproduit de Boyle 2003.

1. Ossification primaire

L'ostéogénèse (ossification primaire) correspond au processus de formation du primo tissu osseux durant l'embryogénèse. L'apposition osseuse s'effectue soit sur un tissu conjonctif riche en collagène, on parle alors d'ossification membranaire ou périostique, soit sur du cartilage hyalin, on parle alors d'ossification endochondrale.

Le processus d'ossification membranaire (ou ossification fibreuse) se retrouve principalement dans les os plats comme les omoplates, la face et la voûte crânienne. Ce processus consiste en la différenciation de cellules mésenchymateuses en ostéoblastes au sein d'un tissu conjonctif primaire (*Figure 7A*). Ces ostéoblastes vont produire une matrice ostéoïde (*Figure 7B*) après maturation des cellules « piégées » dans la matrice ostéoïde en ostéocytes et enrichissement en minéraux par dépôt de phosphate de calcium. La minéralisation de cette matrice se poursuit pour donner de l'os lamellaire primaire (*Figure 7C* et *D*) (Ascenzi et Benedetti 1959 ; Karaplis 2002 ; Opperman 2000).

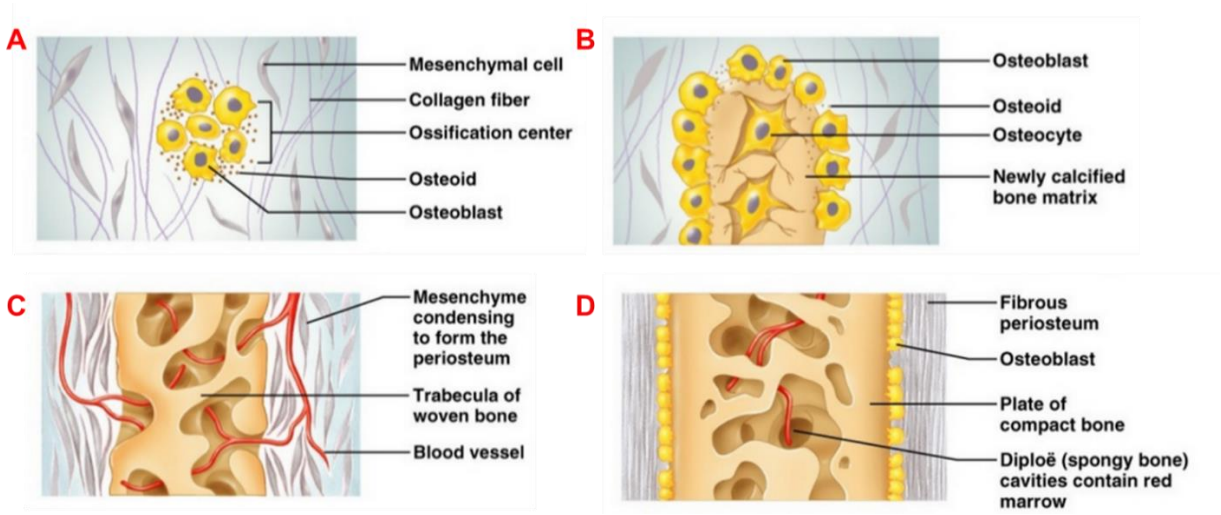


Figure 7 : Schéma des différentes étapes du processus d'ossification membranaire. A) Cluster d'ossification au sein d'un tissu conjonctif fibreux. Les cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes dans ce cluster. B) Une matrice ostéoïde est secrétée dans la membrane fibreuse par les ostéoblastes. Cette matrice se minéralise et les ostéoblastes piégés à l'intérieur deviennent des ostéocytes. C) L'os primaire et le périoste sont formés. Le tissu est vascularisé. D) Distinction entre os spongieux et os compact. Apparition de moelle osseuse rouge au sein des travées osseuses. Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Le processus d'ossification endochondrale (ou ossification cartilagineuse) se retrouve principalement dans les os longs et courts comme le tibia ou les tarses. Du cartilage hyalin est formé par la différenciation de cellules mésenchymateuses en chondrocytes qui sécrètent une MEC à base de collagène de type II et de protéoglycanes (Horton 1993) (*Figure 8A*). Les cellules mésenchymateuses environnantes continuent de sécréter du collagène de type I afin de former le périchondre (Caplan 1987) (*Figure 8B***)**. Ces cellules du périchondre influent sur la maturation des chondrocytes qui sont au centre du squelette cartilagineux. Elles stoppent leur prolifération et s'allongent, on parle alors de chondrocytes hypertrophiés. Ils vont sécréter une MEC riche en collagène de type X (Poole 1991) (*Figure 8C*). Les cellules périchondrales se différencient alors en ostéoblastes et accompagnent l'invasion de vaisseaux sanguins au sein du moule cartilagineux. Les ostéoblastes y sécrètent une MEC osseuse riche en collagène de type I au-dessus de la MEC secrétée par les chondrocytes hypertrophiés. On appelle cette région, la spongiosa primaire, qui composera la partie spongieuse de l'os mature (*Figure 8D* et *Figure 8E*). Les ostéoblastes en bordure forment de l'os cortical tandis que ceux au centre de la matrice cartilagineuse forment de l'os trabéculaire (*Figure 8F*). Les ostéoblastes et chondrocytes, disposés en colonnes, forment une structure dite avasculaire que l'on retrouve aux deux extrémités de l'os en formation. C'est le centre d'ossification secondaire (SOC) (*Figure 8G*) (Karsenty et Wagner 2002).

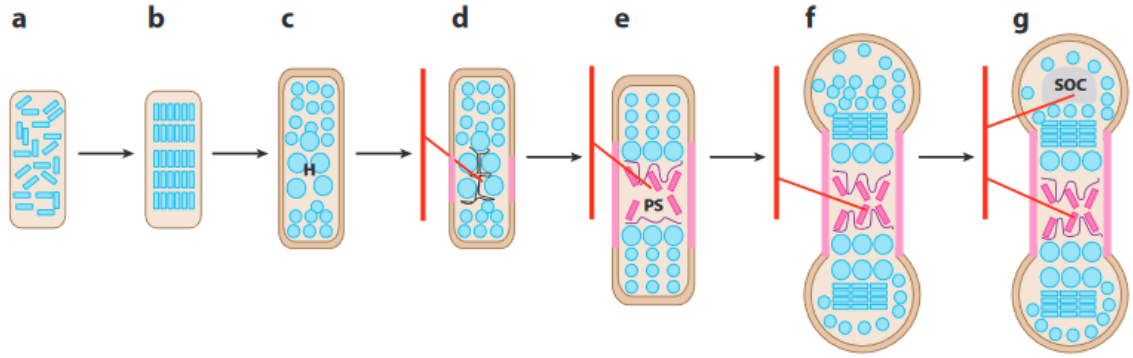


Figure 8 : Représentation schématique de l'ossification endochondrale. (A) les cellules mésenchymateuses se regroupent au point de formation du tissu osseux. (B) les cellules se différencient en chondrocytes et prolifèrent. (C) différenciation hypertrophique des chondrocytes, les chondrocytes s'allongent au niveau de H. (D) les cellules périchondriales se différencient en ostéoblastes (schématisés en rose) et l'apoptose des chondrocytes hypertrophiés favorise la minéralisation de la matrice et la vascularisation (schématisés en traits rouges). (E) les ostéoblastes accompagnent l'invasion vasculaire et forment le spongiosa primaire (PS). (F) les chondrocytes continuent de proliférer et mènent à l'allongement de l'os, les ostéoblastes du PS forment de l'os spongieux et les ostéoblastes du col forment de l'os cortical. (G) le centre d'ossification secondaire (SOC) se forme au travers de cycles hypertrophie chrondrocytaire/ invasion vasculaire/ activité ostéoblastique. Reproduit d'après Karsenty et al. 2009.

2. Ossification secondaire

L'ossification secondaire correspond à des étapes de remodelage du tissu osseux à l'échelle locale. Le remodelage osseux est un processus cellulaire dynamique dans lequel la matrice osseuse minéralisée subit l'alternance d'une phase de résorption et de formation osseuses. Le remodelage osseux permet d'assurer tout au long de la vie de l'organisme trois grandes fonctions majeures : l'adaptation du tissu osseux aux efforts mécaniques auxquels il est soumis, la réparation de micro-défauts intra-osseux ainsi que le maintien de l'homéostasie phosphocalcique auquel le tissu osseux sert de réservoir. On estime que chez l'homme adulte, 10% du tissu osseux est remodelé annuellement et qu'à l'échelle locale une même zone est renouvelée tous les 2-5 ans (Narducci *et al.* 2011 ; Parfitt 1994 ; Manolagas 2000).

Le remodelage osseux correspond à la résorption de l'os lamellaire « ancien » par les ostéoclastes et à l'apposition d'une nouvelle matrice qui sera minéralisée par la suite pour donner de l'os lamellaire « jeune » par les ostéoblastes. Lorsque le remodelage osseux est « normal », il n'y a pas de changement de densité et des propriétés mécaniques du tissu osseux. Par contre, certaines pathologies telles que l'ostéoporose ou l'ostéogénèse imparfaite peuvent induire une baisse de la densité du tissu osseux et des propriétés mécaniques résultantes (Misof *et al.* 1997 ; Fratzl 1996).

Différentes phases successives vont permettre le remodelage grâce à l'intervention d'unités cellulaires fonctionnelles de remodelage appelées BMU (Basal Multicellular Unit) qui associent et coordonnent étroitement les actions des ostéoclastes, ostéoblastes, ostéocytes et cellules bordantes (Frost 1964) (*Figure 9*).

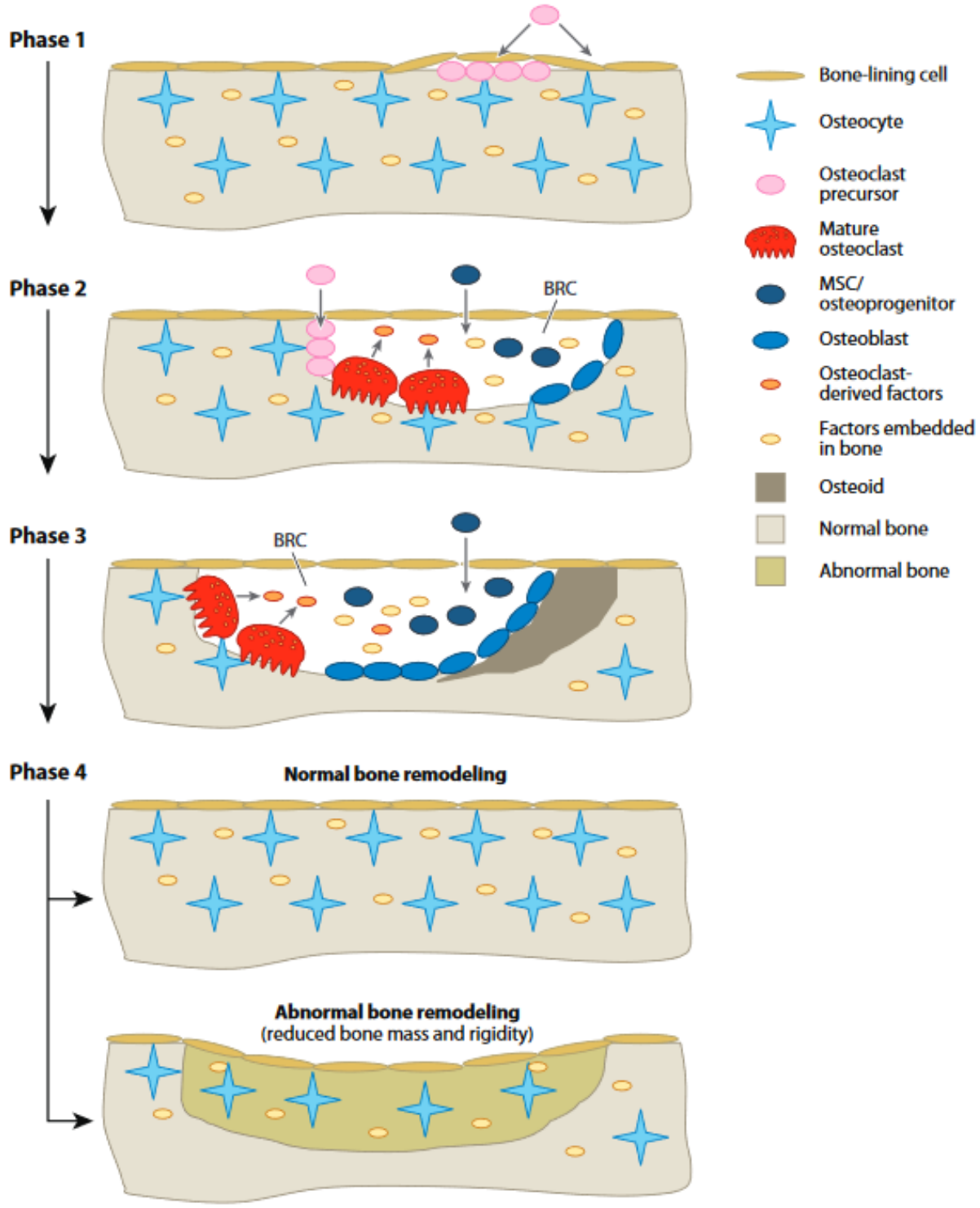


Figure 9 : Schéma du remodelage osseux. Les différentes phases correspondent respectivement à la quiescence/l'activation, la résorption/inversion, la formation puis au retour à la quiescence. Reproduit de Feng et Mcdonald 2011.

Les BMU mesurent entre 1-2 mm de long et 0,2-0,4 mm de large (Sims 2008). Elles progressent de façon différente dans l'os cortical et l'os trabéculaire. Dans l'os cortical, les BMU creusent des « tunnels ». Au passage des BMU, l'os est remodelé (Manolagas 2000). Dans l'os trabéculaire, les BMU forment de nouvelles travées. On estime qu'entre 1 et 2 millions de BMU sont actifs à chaque instant (Parfitt 2008). L'action de ces unités cellulaires souligne la coordination étroite des ostéoblastes et des ostéoclastes durant le remodelage (Sims et Martin 2014). Plus précisément, le processus de remodelage osseux implique 4 grandes étapes distinctes qui se chevauchent :

La première étape du remodelage osseux consiste en l'activation au sein d'un site spécifique du tissu osseux (*Figure 9, Phase 1*). L'hypothèse émise est lorsque les ostéocytes sont capables de détecter une déformation dans le tissu, ils transmettent un signal aux cellules bordantes présentes sur le site de résorption afin de « recruter » des précurseurs d'ostéoclastes (Parfitt 2002). Ces précurseurs sont en étroit contact avec les cellules bordantes, formant ainsi le BRC (bone-remodeling compartment), fortement vascularisé (Parfitt 2001 ; Andersen *et al.* 2009 ; Everts *et al.* 2002) s'étendant sur une zone de l'ordre de plusieurs centaines de microns (Andersen *et al.* 2009). Les précurseurs d'ostéoclastes s'attachent à la matrice osseuse et se différencient en ostéoclastes sous l'action des facteurs de transcription spécifique présents dans le BRC (RANKL et M-CSF, *Figure 7B*).

Cette différenciation des précurseurs en ostéoclastes mène à la deuxième phase (*Figure 9, Phase 2*). Le phénomène de résorption prédomine cette phase, les ostéoclastes résorbent la matrice osseuse « ancienne ». En parallèle, des cellules mésenchymateuses et/ou ostéoprogéniteurs sont recrutés de la moelle osseuse dans le BRC. Ces cellules vont alors se différencier en préostéoblastes, puis en ostéoblastes au cours de cette phase.

Le phénomène de remodelage prédomine lors de la troisième phase (*Figure 9, Phase 3*). Le phénomène qui permet aux ostéoblastes de former la matrice osseuse est très largement débattu dans la littérature. Il est néanmoins admis que les ostéoblastes secrètent une matrice non minéralisée appelé tissu ostéoïde (Virchow 1851 ; Raina 1972). Les fibrilles de collagène qui composent ce tissu ne sont pas minéralisées et présentent peu ou pas d'orientation tridimensionnelle préférentielle (Raine 1971 ; Juster *et al.* 1967).

La minéralisation du tissu ostéoïde conclut le processus de remodelage osseux (*Figure 9, Phase 4*). Il est décrit dans la littérature que le tissu ostéoïde servirait de point de nucléation à la phase minérale et donc à la minéralisation du tissu osseux. Le tissu ostéoïde se minéralise progressivement par le dépôt d'une phase organique de NCPs qui initient la nucléation des cristaux (Davies et Hosseini 2000). La zone de minéralisation qui détermine l'interface entre l'os non minéralisé et l'os mature est appelée front de minéralisation.

Les notions physico-chimiques du processus de remodelage osseux sont brièvement évoquées dans la littérature. Par exemple, le BRC pourrait jouer un rôle de confinement en forçant la présence des phénomènes de résorption et de remodelage dans un environnement étroitement contrôlé (Andersen *et al.* 2009). L'environnement chimique local pourrait aussi avoir un rôle sur l'organisation tridimensionnelle résultant de la matrice osseuse (Thèse de M. Robin 2017). **La formation du tissu osseux dans ma thèse est abordée uniquement d'un point de vue physico-chimique.**

II. Le collagène : structure, synthèse et cristaux liquides

Le collagène est la matière première utilisée dans ma thèse. Dans ce chapitre, je vais décrire ses propriétés d'auto-assemblage qui nous seront très importantes pour comprendre l'originalité des résultats obtenus.

Le collagène est la protéine la plus abondante des vertébrés. Elle représente 25 à 30% des protéines de l'organisme humaine. Elle est la composante organique principale des différentes MECs. On dénombre 28 types de protéines collagéniques : le collagène de type I est le plus abondant au sein des tissus conjonctifs humains tels que l'os, la cornée, le derme ou les tendons. Le collagène de type I fait partie des collagènes dits fibrillaires, capable de s'auto-assembler en fibrilles, tels que le type II et le type V qu'on retrouve respectivement dans le cartilage et dans la cornée. Le collagène est à la fois une protéine structurale qui façonne la charpente des tissus conjonctifs mais est aussi une protéine fonctionnelle qui peut intervenir dans différents processus biochimiques (croissances des tissus, différenciation cellulaire). Dans ce travail, nous parlerons essentiellement du collagène de type I qui représente 90% de la fraction organique de la MEC de l'os et constitue à lui seul 20% en masse et 30% en volume de l'organe.

1. La molécule de collagène

La molécule de collagène est composée d'une triple hélice droite de trois chaînes polypeptidiques, appelées chaines α en hélice gauche (*Figure 10A*). Une chaîne polypeptidique est composée d'un millier d'acides aminés (Woodhead-Galloway 1982) où les séquences d'acides aminés sont identiques avec le motif Gly-X-Y où la position X peut être occupée par la proline dans 22% des cas et Y par l'hydroxyproline dans 13% des cas selon le tissu (voir **Matériels et Méthodes**). La glycine, l'alanine et l'hydroxylysine sont les acides aminés les plus abondants rentrant dans la composition de la molécule de collagène (*Figure 10B*).

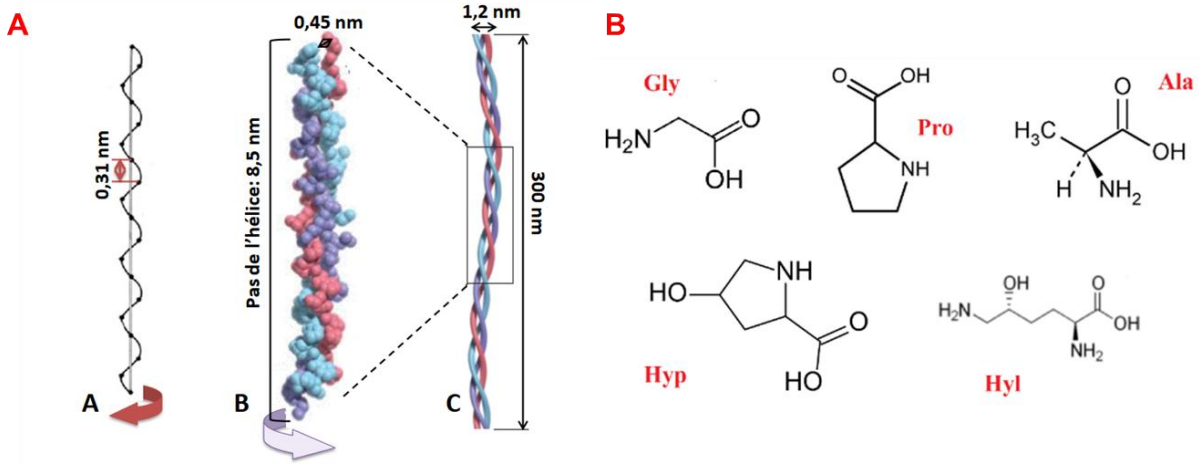


Figure 10 : (A) A) chaîne peptidique d'hélice gauche dont la distance longitudinale entre deux résidus adjacents est 0.31 nm. B) les chaînes polypeptidiques sont séparées entre elles d'une distance de 0,45 nm et le pas de l'hélice droite est de 8,5 nm ce qui correspond à environ 30 acides aminés. C) la molécule de collagène est longue d'environ 300 nm et a un diamètre de 1,2 nm. Reproduit et modifié d'après Wang 2016. (B) Formule chimiques des acides aminés les plus abondants de la molécule de collagène de type I : Gly) glycine, (Pro) proline, (Ala) alanine, (Hyp) hydroxyproline, (Hyl) hydroxylysine.

2. Synthèse des fibrilles de collagène *in vivo* et *in vitro*

In vivo, les chaînes polypeptidiques α sont synthétisées au sein des cellules, elles forment ce qu'on appelle le procollagène, un précurseur du collagène (*Figure 11*). Ces chaînes α vont subir des modifications au niveau de leur structure polypeptidique afin d'améliorer les propriétés de solubilité et de stabilité thermique de la molécule de collagène (Myllyharju *et al.* 2005) et vont s'assembler sous forme de triple hélice au niveau de l'appareil de Golgi puis être secrétées en dehors des cellules par l'intermédiaire de vésicules de sécrétion. Ces molécules de procollagène sont solubles à pH physiologique de par la présence de propeptides chargés négativement à chacune des extrémités.

Sous l'action enzymatique des procollagènes peptidases, les propeptides C- et N-terminaux vont être clivés pour former la molécule de collagène, laissant des extrémités non hélicoïdales que l'on appelle les télopeptides (Hulmes *et al.* 2002). Ce clivage enzymatique rend les molécules de collagène insolubles à pH physiologique (*Figure 11*). Les molécules vont alors s'auto-assembler. Sous l'action de la stabilisation de la lysyloxydase par des liaisons covalentes, les molécules de collagène vont précipiter sous forme de fibrilles. On appelle ce processus biologique, la fibrillogénèse.

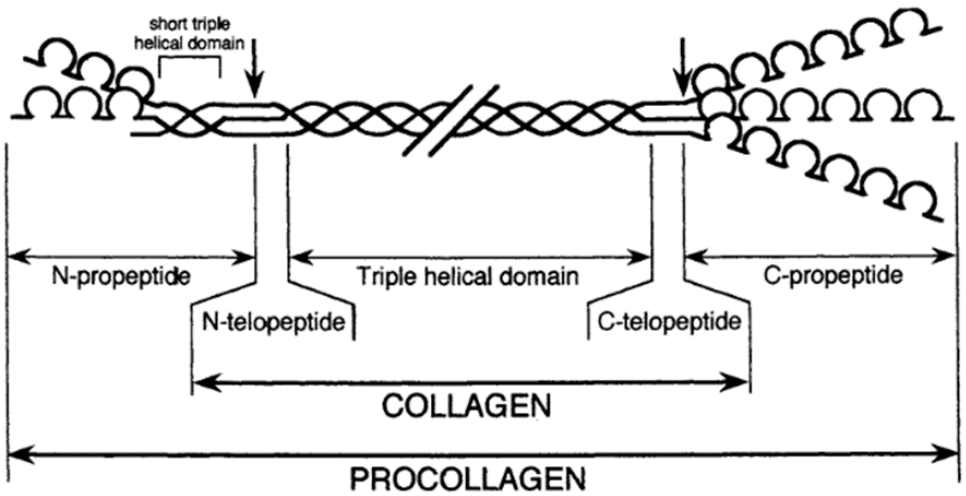


Figure 11 : Représentation schématique de la molécule de procollagène de type I. Reproduit d'après Rossert et de Crombrugghe 2002.

In vitro, les molécules de collagène peuvent être solubilisées à pH acide (Zachariades 1900). Les molécules de collagène sont extraites de tissus riches en collagène, tels que les tendons de queues de rats car moins coûteux que les solutions de collagène vendues commercialement. Ces molécules ne présentent donc pas de propeptides. Les tissus sont dissous à pH acide afin d'obtenir une solution acido-soluble de molécules de collagène, on utilise communément de l'acide acétique ou de l'acide chlorhydrique pour cette extraction. La solution est ensuite purifiée en différentes étapes permettant d'éliminer les cellules et autres protéines résiduelles afin d'obtenir une solution acido-soluble pure de molécules de collagène à environ 3 mg/ml. Ce protocole est détaillé dans **Matériels et Méthodes** (Partie II).

In vitro, il a été démontré dans la littérature que la précipitation des molécules de collagène en fibrilles pouvait être induite par une remontée du pH du milieu (Ermann et Gey 1956). On utilise typiquement l'ammoniaque pour induire la fibrillogénèse *in vitro*. D'autres paramètres peuvent également induire la fibrillogénèse tels que la force ionique ou la température (Gross 1958).

La fibrille de collagène a un diamètre variant entre 50 et 300 nm (Holmes *et al.* 2001 ; Landis 1986). *In vivo*, ce diamètre varie en fonction de la nature du tissu biologique tandis qu'*in vitro* il varie en fonction du pH, de la force ionique mais aussi de la température. L'étude de paramètres physico-chimiques impliqués dans la fibrillogénèse reste encore à être approfondie.

Au sein des fibrilles, les interactions moléculaires sont assurées à l'aide de liaisons hydrogène et des forces électrostatiques. Cet auto-assemblage s'effectue avec un décalage périodique de 67 nm, qu'on appelle période D, de l'agencement des molécules au sein de la fibrille. Cette période D est la combinaison d'une zone de gap de 40 nm, occupée par les télopeptides, et d'une zone d'overlap de 27 nm, où les molécules de collagène se chevauchent (Hodge et Petruska 1963). L'alternance de gaps et d'overlaps mène à l'observation de fibrilles striées (alternance de bandes noires et blanches) en microscopie électronique à balayage (MEB) ou en transmission (MET) en présence de contrastants (sels de métaux lourds) qui précipitent au niveau des zones de gaps. (*Figure 12*).

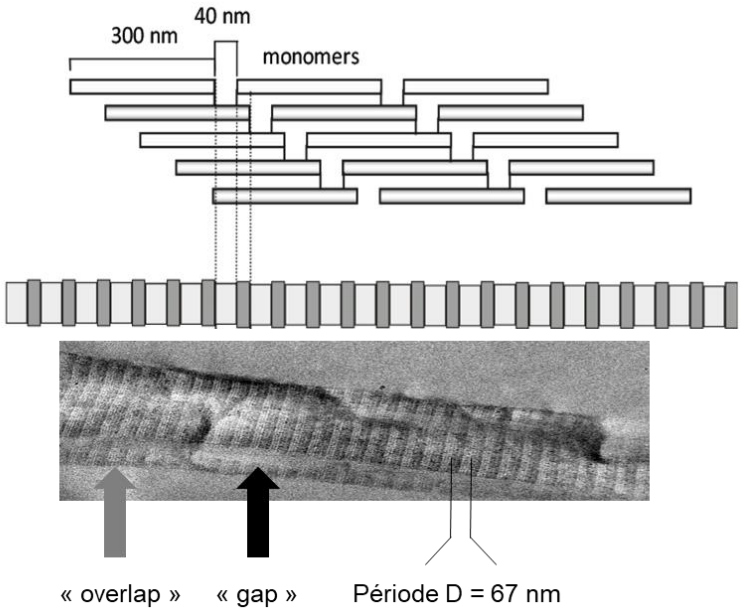


Figure 12 : Représentation schématique de l'organisation des molécules au sein de la fibrille de collagène et observation en MET de la fibrille striée et de la période D d'alternance entre zones de gaps et zones d'overlap. Reproduit et modifié de Gelse et al. 2003.

3. Organisation tridimensionnelle et propriétés lyotropes du collagène *in vitro*

L'organisation tridimensionnelle des tissus relève d'une cascade de processus biologiques liés aux activités cellulaires. Plus récemment, il a été proposé l'implication de processus physico-chimiques intrinsèques dans l'organisation tridimensionnelle des tissus dans les MECs. Ces études ont pour origine l'observation d'organisations similaires dans différents tissus biologiques bien que la nature des biomacromolécules organique y soit différente (*e.g.* collagène, chitine, cellulose, ADN).

Yves Bouligand a été le premier à mettre en évidence ces analogies entre les tissus et à proposer l'existence d'analogues biologiques des cristaux liquides (CL) (Bouligand 1972 ; Besseau et Bouligand 1998 ; Giraud-Guille 1998 ; Livolant et Bouligand 1986). En effet, l'observation de coupe ultrafines de ces différents tissus présente la même structure en arceaux rappelant les organisations cholestériques des cristaux liquides. Les travaux de Bouligand ont permis de démontrer que cette structure en arceaux n'est pas due à des structures fibrillaires continues mais à la coupe oblique d'une rotation continue des fibrilles le long d'un axe cholestérique, c'est le modèle du contreplaqué torsadé (*Figure 13, schéma central*).

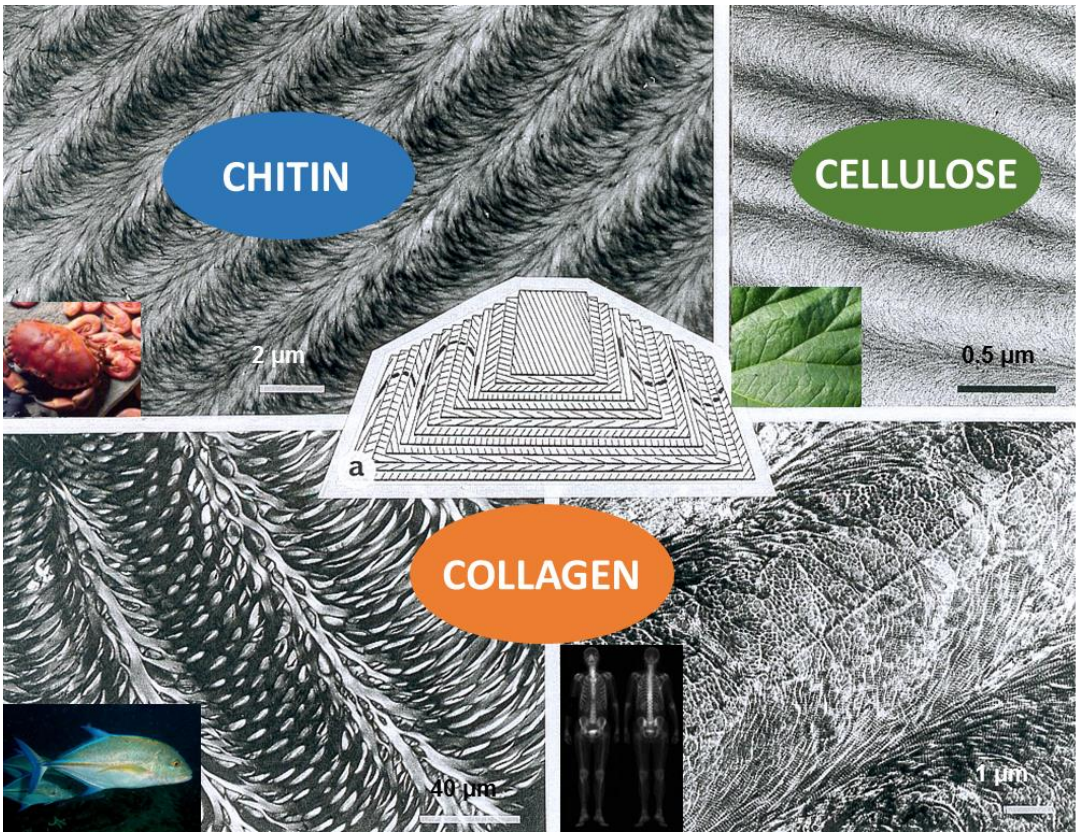


Figure 13 : Structures en arceaux observées au MET dans différents tissus biologiques composés de biopolymères différents. (a) Schéma représentant le contreplaqué torsadé. Chaque trait représente une fibrille. Les coupes obliques révèlent la structure en arceaux. Reproduit de Nassif 2013, conférence CDF et Giraud-Guille 1998.

Comme évoqué précédemment, les molécules de collagène de type I sont solubles à pH acide *in vitro* (pH~2.5-3) . Les travaux de Giraud-Guille ont permis de démontrer par microscopie à lumière polarisée (MOLP) qu'à partir d'une certaine concentration en collagène (≥ 40 mg/ml), les molécules de collagène s'auto-assemblent spontanément et peuvent former différentes phases cristal-liquides (Giraud-Guille *et al.* 2003 ; Besseau et Giraud-Guille 1995 ; Giraud-Guille 1989). Elle a ainsi permis de démontrer que le collagène se comporte comme un cristal liquide lyotrope *in vitro*.

Un diagramme de phase en fonction de la concentration en collagène a été proposé à partir des observations faites sur les solutions acides de collagène *in vitro* (*Figure 14*) (Giraud-Guille et Besseau 1998). La transition isotrope-anisotrope d'une goutte de la solution acide de collagène s'observe sous lumière polarisée. Au départ, la solution est isotrope, c'est-à-dire qu'elle ne peut altérer le trajet de la lumière. Lors de l'évaporation des solvants, la solution se concentre, les molécules s'auto-assemblent, l'anisotropie de la solution augmente et permet l'observation de différentes textures de biréfringence sous polariseurs croisés.

Au-delà de 40 mg/ml, on peut observer de larges domaines d'alignements qui s'apparent à une géométrie cristal-liquide de type nématique. Des alternances de bandes claires et sombres sous forme d'ondulations sont observables à mesure que la concentration augmente vers 70 mg/ml qu'on associe à une texture précholesterique en bandes. Vers 80 mg/ml, des motifs s'apparentant à des empreintes digitales sont observés, motifs caractéristiques d'une organisation cholestérique. Ces organisations géométriques type cristal-liquide peuvent être mises en analogie avec certaines organisations fibrillaires de tissus vivants (*Figure 15*).

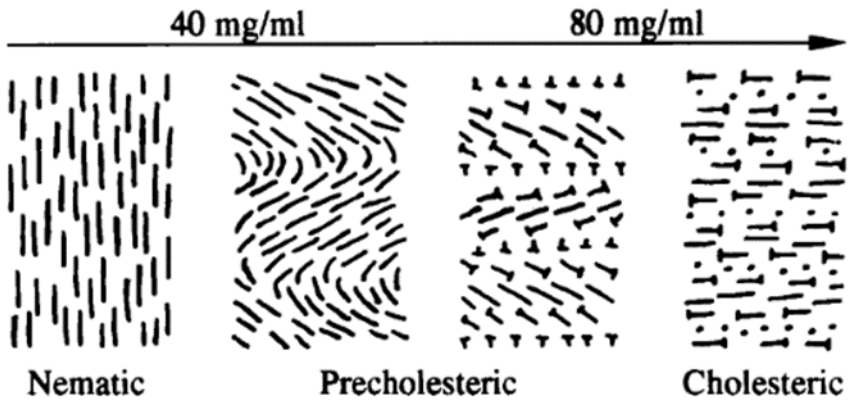


Figure 14 : Représentation schématique du diagramme de phase des différentes phases cristal-liquide des molécules de collagène en fonction de la concentration. Les molécules représentées par un bâton sont dans le plan, celles représentés par un clou sont obliques au plan et celles représentées par un point sont perpendiculaires au plan. Reproduit d'après Giraud-Guille et Besseau 1998.

Plus récemment, nous avons démontré la présence d'une nouvelle phase cholestérique, notée P*, présente un motif dit à facettes visible sous polariseurs croisés à ~ 45 mg/ml (Salameh *et al.* 2020). Cette phase mène à l'observation d'un gap de transparence au sein de matrices de collagène fibrillaire dans une plage étroite de concentration de ce diagramme de phase. Nous reviendrons sur la définition générale des cristaux liquides et de leurs défauts topologiques dans la partie **IV** de ce chapitre.

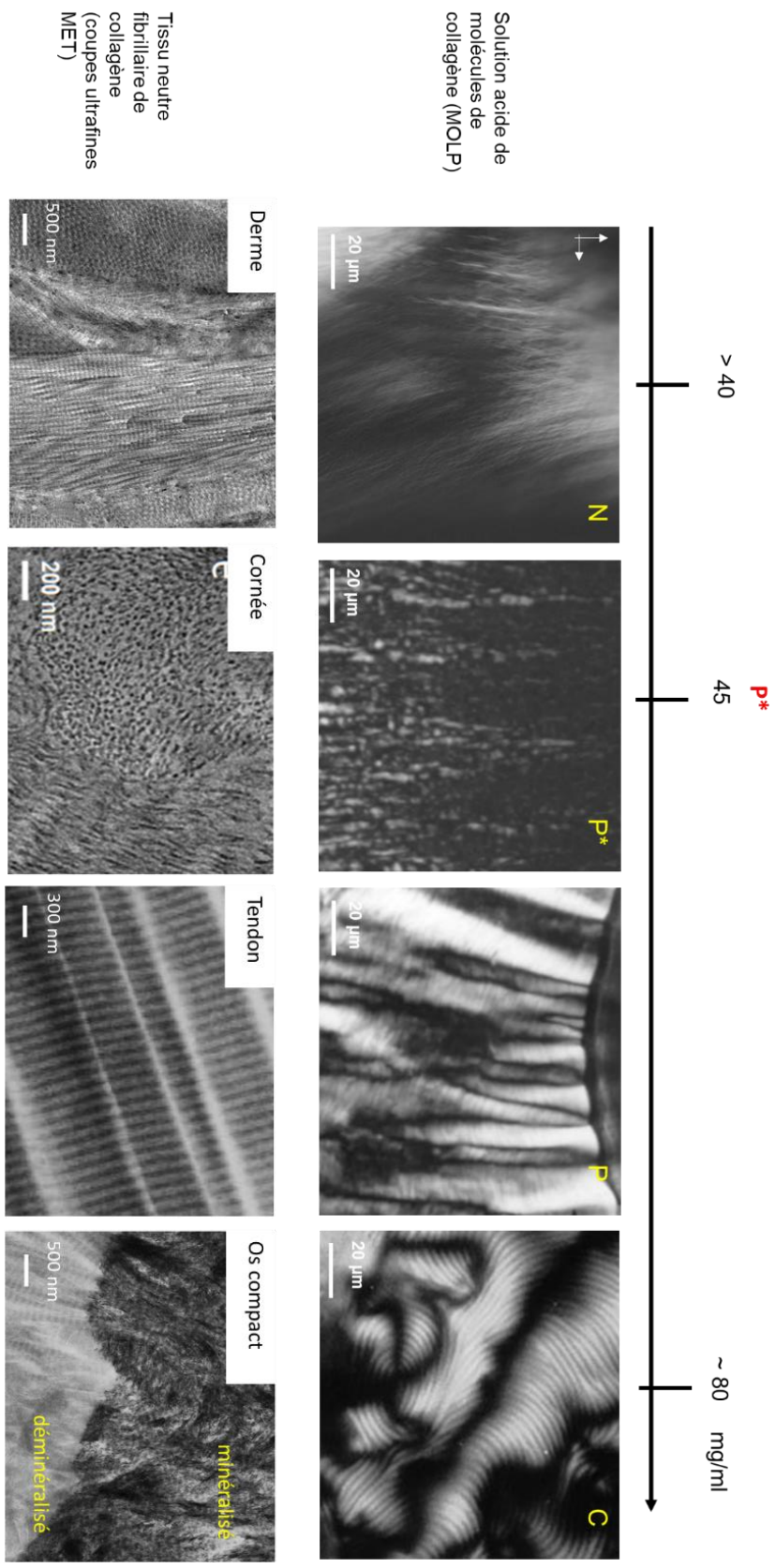


Figure 15 : Textures de biréfringence de solution acide de molécules de collagène en fonction de la concentration associées à des organisations tissulaires neutres de collagène. Reproduit et modifié d'après Salameh et al. 2020.

Cette analogie a été d'autant plus mise en évidence lorsque les travaux de Giraud-Guille ont permis de reproduire *in vitro* l'organisation en contre-plaqué torsadé de l'os compact. Après avoir atteint la concentration visée en collagène (*i.e.* 80 mg/ml), elle a démontré qu'il était possible de stabiliser l'organisation 3D des géométries CL lors de l'étape de précipitation des molécules de collagène en fibrilles (*Figure 16A*). Cette étape permet une discrétisation des molécules en fibrilles. Le procédé de précipitation des molécules de collagène en fibrilles n'est pas nouveau (Gross 1956 ; Fauré-Fremiet et Garrault 1937 ; Nageotte 1927 ; Wood et Keech 1960), ici elle a montré qu'il était possible de conserver l'organisation moléculaire à l'échelle fibrillaire. On parle alors de transition sol-gel (molécules en solution → gel fibrillaire). Lorsque l'on observe une coupe ultrafine oblique de la matrice en MET (*Figure 16B*), une structure fibrillaire en arceaux (*i.e.* contreplaqué torsadé), mimétique de celle observée sur les coupes de tissus osseux (*Figure 13* et *Figure 16C*), témoigne d'un probable passage par une phase cholestérique.

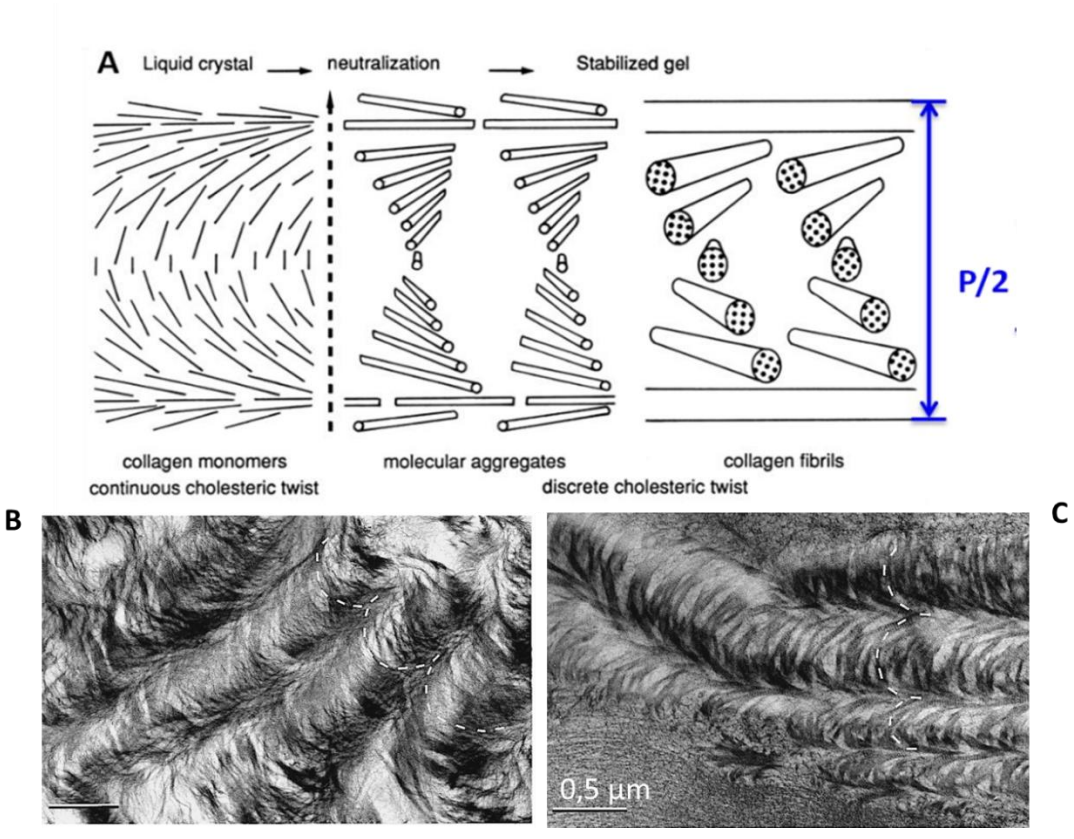


Figure 16 : (A) Représentation schématique de la stabilisation de l'organisation et de la transition sol-gel des phases cristal-liquides du collagène in vitro. La distance P/2 correspond à la moitié de la valeur du pas cholestérique. Reproduit de Giraud-Guille et Besseau 1995. (B) et (C) Observations au MET de coupes obliques ultrafines d'un os compact (B) et d'une matrice de collagène (C) Les fibrilles s'organisent en contreplaqué torsadé révélant un probable passage par une organisation cholestérique. Reproduit d'après Giraud-Guille 1995.

Il n'a pas été démontré pour le moment que le collagène passe par un état cristal-liquide dans l'organisation des tissus biologiques *in vivo*. Ces structures observées *in vitro*, sur des gouttes à l'échelle de la lame-lamelle, ont pu être reproduites et un champ disciplinaire tourné vers la chimie des matériaux a pu permettre d'en faire des matériaux grâce à différents procédés (Ghanzanfari *et al.* 2016).

III. Mise en forme 3D de matrices denses de collagène et méthodes de caractérisation multi-échelles

Différents procédés proposés dans la littérature ont permis de mettre en forme ces solutions acides de collagène afin d'obtenir des matériaux (*i.e.* matrices de collagène) à plus grande échelle, les travaux de N. Nassif se sont notamment insérés dans une volonté d'un passage du 2D vers le 3D (Nassif *et al.* 2010). Dans cette thèse, plusieurs de ces procédés seront utilisés pour mettre en évidence l'implication de paramètres physico-chimiques dans la morphogénèse des tissus osseux.

1. Procédés de mise en forme de matrices denses de collagène

Afin d'obtenir des matrices denses de collagène *in vitro*, différents dispositifs ont été proposés dans la littérature. Nous allons décrire ici plus précisément ces différents procédés et quels peuvent être leurs avantages et inconvénients pour ce que nous souhaitions faire, c'est-à-dire obtenir des matrices denses de collagène, homogènes en taille de fibrilles et présentant une organisation similaire aux structures observées dans le tissu osseux. La liste des exemples que nous allons présenter ici n'est pas exhaustive, des ajustements de ces procédés (compression, aspiration/injection) mais ne sont pas présentées dans cette partie (Griffanti et Nazhat 2020).

La méthode de **dialyse inverse** (*Figure 17A*) met en contact une solution acido-soluble de collagène faiblement concentrée (contenue dans une membrane de dialyse scellée) et une solution concentrée d'un polymère (généralement du PEG dissous dans le même solvant). La concentration en PEG permet de déterminer la concentration finale de la matrice de collagène. Ce processus est suffisamment lent pour promouvoir l'auto-assemblage des molécules de collagène. Il est à noter qu'en atteignant des concentrations très élevées (250 mg/mL), il faut un volume conséquent de départ, le collagène va donc se concentrer localement à différents endroits de la membrane de dialyse. Ainsi, pour former la matrice de collagène, qui à cette concentration forme un gel physique, il est difficile de la retirer de la membrane de dialyse sans altérer l'organisation tridimensionnelle de l'échantillon (cisaillement induit) (*Figure 18*). Ce procédé n'a donc pas été utilisé dans notre étude.

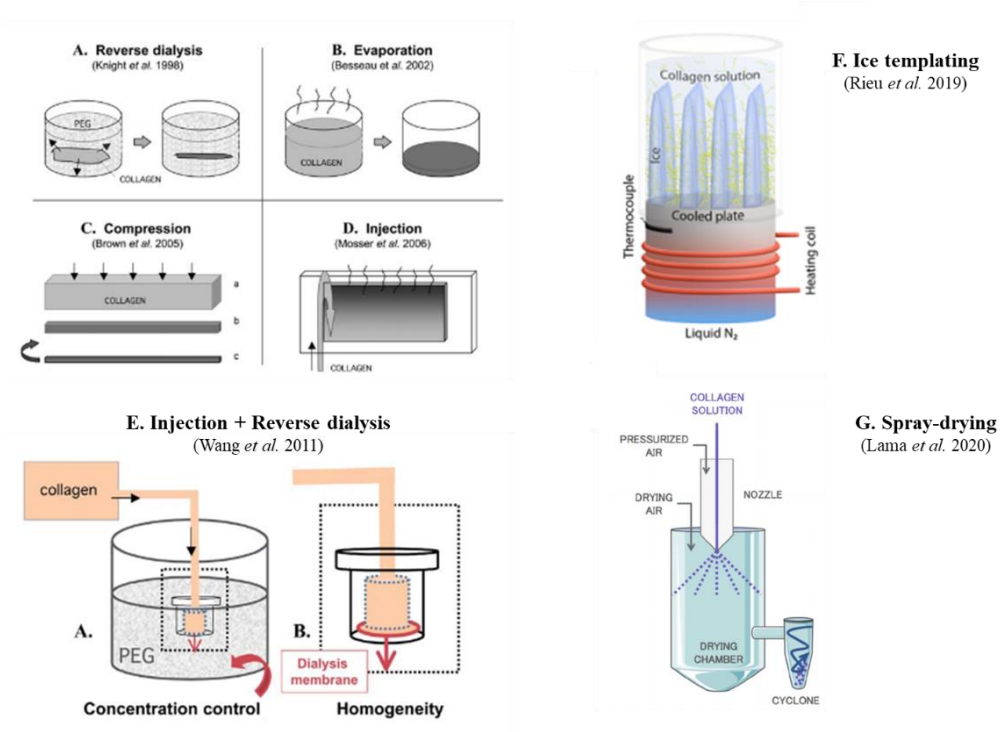


Figure 17 : Représentations schématiques des différents procédés de concentration de solutions acido-solubles de collagène dans la littérature. (A) Dialyse inverse : la solution de polyéthylène glycol (PEG) permet de déterminer la concentration finale de la matrice de collagène. (B) Evaporation : une solution peu concentrée de collagène est placée dans un bécher sous hotte à flux laminaire ou poste de sécurité microbiologique (PSM), l'eau et l'acide s'évaporent au fur et à mesure permettant à la solution de se concentrer. (C) Compression : une solution ou un gel est soumis à une charge qui élimine l'eau de l'échantillon. (D) Injection : une solution faiblement concentrée est injectée entre lame et lamelle et se concentre par évaporation au contact de l'air. (E) Injection + dialyse inverse : une solution faiblement concentrée est injectée dans un moule au contact d'une solution de PEG. (F) Ice templating : une solution de collagène concentrée est placée dans une chambre thermostatée jusqu'à congélation puis est lyophilisée. (G) Spray-drying : une solution de collagène faiblement concentrée passe au travers d'un aérosol, permettant la formation de microparticules de collagène sèches. (A), (B), (C), (D), (E) reproduits Wang et al. 2011 ; (F) reproduit de Rieu et al. 2019 et (G) reproduit de Lama et al. 2020.

Le procédé d'**évaporation** (*Figure 17B*) est usuellement utilisé pour obtenir des matrices de collagène en 3D pour les milieux de cultures cellulaires (*e.g.* fibroblastes ou ostéoblastes) (Helary *et al.* 2005 ; Helary *et al.* 2010 ; Robin *et al.* 2016). On utilise alors un grand volume de solution acido-soluble de collagène faiblement concentrée (2-5 mg/ml). Cela permet de concentrer les molécules par évaporation des solvants (*i.e.* eau et acide). Cependant, la solution doit être régulièrement agitée, sinon un gradient de concentration se forme au contact de l'air. Or, la solution est de plus en plus visqueuse lors de l'évaporation des solvants, un film sec peut apparaître en surface. Ce procédé n'est donc pas adapté pour atteindre des concentrations en collagène au-dessus de 40 mg/ml. Il sera utilisé pour le **Chapitre 4** pour mettre en évidence la formation de domaines anisotropes associés à des géométries CL cholestériques (> 80 mg/mL) en présence de porosité.

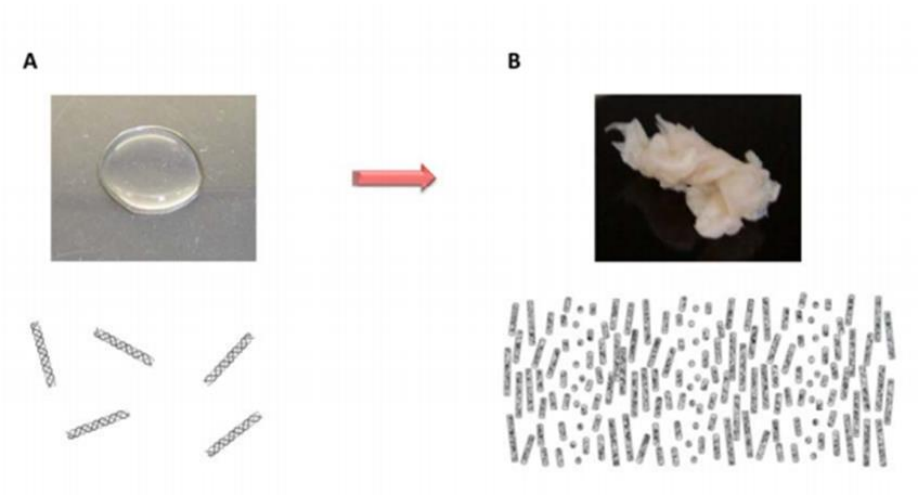


Figure 18 : Illustration des propriétés physico-chimiques du collagène en fonction de sa concentration et représentations schématiques respectives de l'organisation spatiale des molécules de collagène. (A) solution diluée à ~2mg/ml et (B) solution concentrée par dialyse inverse à ~250 mg/ml. Reproduit de Wang et al. 2012.

Le procédé de **compression** proposé par Brown *et al.* (*Figure 17C*), consiste à utiliser une matrice de collagène fibrillaire (*i.e.* la fibrillogénèse *in vitro* préalablement induite) et à appliquer une compression plastique sur la matrice qui permet d'éliminer le solvant, ce qui permet d'atteindre des concentrations élevées en collagène de l'ordre de 150 mg/ml. Les matrices obtenues ne sont pas biomimétiques en termes de structure et de composition puisque (1) l'on obtient un gel fibrillaire dense mais non-organisé, l'organisation tridimensionnelle de la matrice est isotrope ; (2) la quantité d'eau résiduelle ne permet pas de satisfaire des propriétés mécaniques comparables avec le tissu *in vivo*.

Mosser *et al.* (*Figure 17D*) ont proposé un procédé qui combine **l'évaporation et l'injection continue** : une solution acido-soluble de collagène faiblement concentrée (< 5 mg/ml) est injectée en continue à un faible débit dans une microchambre en verre (système lame/lamelle), le solvant s'évaporant à l'interface air/solution. Ce procédé permet d'atteindre des concentrations très élevées en collagène (1000 mg/ml) mais présente le désavantage pour les conditions que nous recherchons ici, de mener à un gradient de concentration très important (de 5 à 1000 mg/ml). En effet, il ne permet pas de contrôler la concentration finale en collagène. Par ailleurs, la morphologie des matrices n'est pas modulable en 3D. Ce procédé a donc été écarté car nous souhaitons pouvoir contrôler précisément la concentration finale en collagène et élaborer un matériau en 3D.

Le **freeze casting**, ou **ice-templating** (*Figure 17F*), est un procédé usuellement utilisé dans l'élaboration de matériaux céramiques. Dans le cas de matrices denses de collagène (Semyari *et al.* 2018), les solutions acido-solubles de collagène (< 40 mg/ml) sont placées dans des moules cylindriques et traitées par congélation à l'azote liquide, la température de la chambre étant contrôlée par un thermocouple. Des cristaux de glace se forment au sein de la solution permettant la concentration du collagène et la texturation de la matrice. Puis, la sublimation de ces cristaux permet de figer cette structure. Après fibrillogénèse, les matrices sont lyophilisées. Ce procédé permet d'obtenir des matériaux avec un gradient de porosité. L'absence d'eau dans les matériaux formés et la présence de domaines mono-orientés (alignements) ne permettent pas d'obtenir des matrices biomimétiques du tissu osseux. Cette méthode a donc été écartée.

Dans le but d'obtenir des matrices denses de collagène homogènes en concentration (au moins supérieur à 80 mg/ml) et en taille de fibrilles et de passer à un matériau en 3D sans cisaillement, un procédé combinant **la dialyse inverse à l'injection continue** (*Figure 17E*) a été développé au laboratoire par Wang *et al.* (Brevet WO2011151587A3). Pour cela, une solution acido-soluble de collagène faiblement concentrée (1 à 3 mg/ml) est injectée à l'aide d'un pousse-seringue au sein d'un moule scellé par une membrane de dialyse, plongé dans une solution concentrée de PEG. Ce procédé présente l'avantage de pouvoir contrôler la morphologie 3D (celle du moule utilisé) et concentration finale du matériau. Ce procédé a permis la synthèse de matrices caractérisées par des organisations cholestériques à l'échelle du millimètre (*versus* micromètre pour d'autres procédés) et donc d'atteindre le niveau IX d'organisation du tissu osseux (*Figure 5C*). La distribution spatiale en 3D de ces domaines organisés reste aléatoire au sein du matériau. Dans cette étude, nous allons devoir mettre en place un dispositif permettant de contrôler de la distribution 3D de ces domaines dans l'espace au sein du matériau. Ce procédé sera donc utilisé dans le **Chapitre 2** comme preuve de concept de ce nouveau dispositif

Un autre travail du laboratoire a mis en lumière la possibilité d'utiliser des **microparticules** denses de collagène afin de pouvoir **injecter des solutions** de collagène concentrées. En effet, la viscosité du collagène augmente avec sa concentration, il est notamment impossible d'injecter une solution à une concentration supérieure à 10 mg/mL. Il était donc nécessaire d'établir un procédé palliant cette propriété. Le procédé de **spray-drying** ou **aérosol** (*Figure 17G*) a été décrit par Lama *et al.* (Brevet WO 2016146954A1). Il consiste à injecter un volume (250-300 ml) de solution acido-soluble de collagène faiblement concentrée (entre 1 et 5 mg/ml) au sein d'un aérosol. Deux flux d'air différents permettent alors respectivement de cisailler d'abord la solution sous forme de fines gouttelettes, puis de les sécher. Une poudre blanche de microparticules de collagène est récupérée dans le cyclone lorsque toute la solution a été injectée. Ce procédé permet de préparer des solutions de collagène à des concentrations voulues, par simple pesée de la poudre et du volume de solvant fixés. Ce procédé sera utilisé dans les **Chapitres 3** et **4** afin d'avoir des solutions de collagène à des concentrations précises.

Ainsi, dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé les procédés d'évaporation, de dialyse inverse/injection continue et de spray-dring. En conclusion de cette partie, il est intéressant de noter que peu de des procédés, que nous avons cité, permettent d'obtenir des matrices de collagène 3D denses, organisées et homogènes en termes de taille de fibrilles, donc caractéristiques des tissus biologiques.

2. Caractérisations multi-échelles des matrices denses de collagène

Afin de caractériser les matrices denses de collagène à différentes échelles, nous avons utilisé des techniques de caractérisation classiques comme le microscope optique à lumière polarisée (MOLP), le microscope électronique à balayage (MEB), le microscope électronique à transmission (MET), la diffraction des rayons X (DRX) et la diffusion des rayons X aux grands (WAXS) et petits angles (SAXS). Nous avons également utilisé des techniques de caractérisation moins courantes comme la microscopie optique à lumière polarisée à mesure polscope (PolScope) et la résonance magnétique nucléaire à l'état solide (ssRMN) que nous allons présenter plus en détails dans cette partie (*Figure 19*). Les protocoles de préparation des échantillons suivant la technique de caractérisation utilisée sont détaillés dans le chapitre **Matériels et Méthodes** (Partie VI).

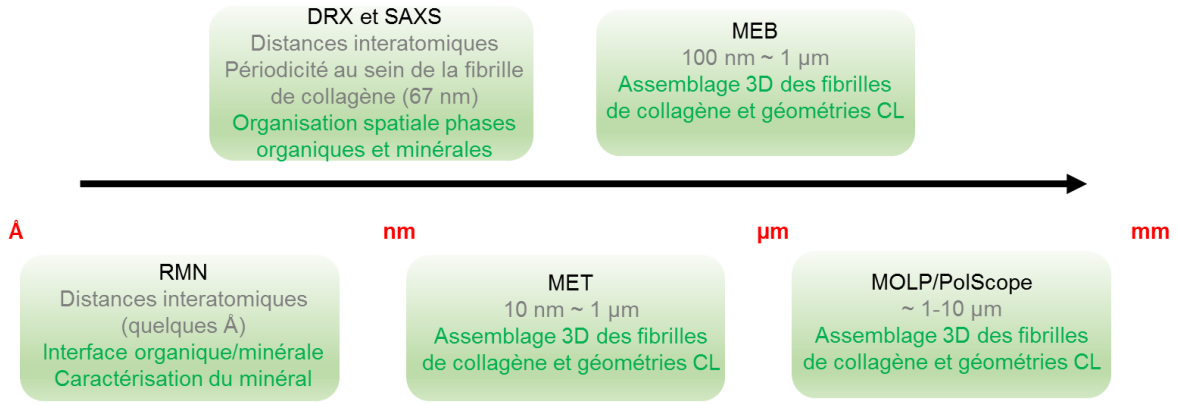


Figure 19 : Techniques de caractérisation utilisées, distances caractéristiques et nature des informations structurales recueillies.

Comme montré précédemment (*Figure 15*), la microscopie optique à lumière polarisée est utilisée couramment pour étudier l'anisotropie des matrices de collagène à l'échelle du micron. La technique PolScope nous permet de déterminer avec précision l'orientation tridimensionnelle des molécules au sein de notre système. Cette technique a déjà été utilisée dans la littérature par exemple dans l'étude des altérations organisationnelles du collagène et des propriétés mécaniques du tissu après une greffe de peau (Rosin *et al.* 2005) (*Figure 20A*) démontrant une isotropie globale du tissu biologique par la présence d'unidirectionnalités des fibres de collagène ; et dans l'observation de la biréfringence du collagène comme indicateur de l'organisation résultante des tissus dans l'étude de la réparation fibrotique après un infarctus du myocarde (Nong *et al.* 2011) (*Figure 20B*) montrant ainsi que les fibrilles de collagène ne sont pas organisées dans le tissu fibrotique.

Dans cette thèse, les observations au PolScope ont été faites à l'Institut de Physique de Rennes (IPR) dans le cadre d'une collaboration avec Dr. Franck Artzner et Arnaud Bardouil. Les différences entre un microscope optique à lumière polarisée standard et un PolScope seront expliquées plus loin dans ce manuscrit.

La microscopie électronique à balayage est une technique de caractérisation basée sur les interactions électrons-matière. Le faisceau d'électrons balaye la surface de l'échantillon, le détecteur d'électrons secondaires transcrit le flux en signal lumineux sur un écran. Dans le cas de nos matériaux, le collagène n'étant pas conducteur, ils sont donc métallisés (ici à l'or) sur une épaisseur fixée de 10 nm. A l'échelle de la centaine de microns, elle permet d'étudier les assemblages 3D des fibrilles de collagène sur nos matériaux et nos échantillons de référence d'os déminéralisé comme le montre le cliché en *Figure 21*.

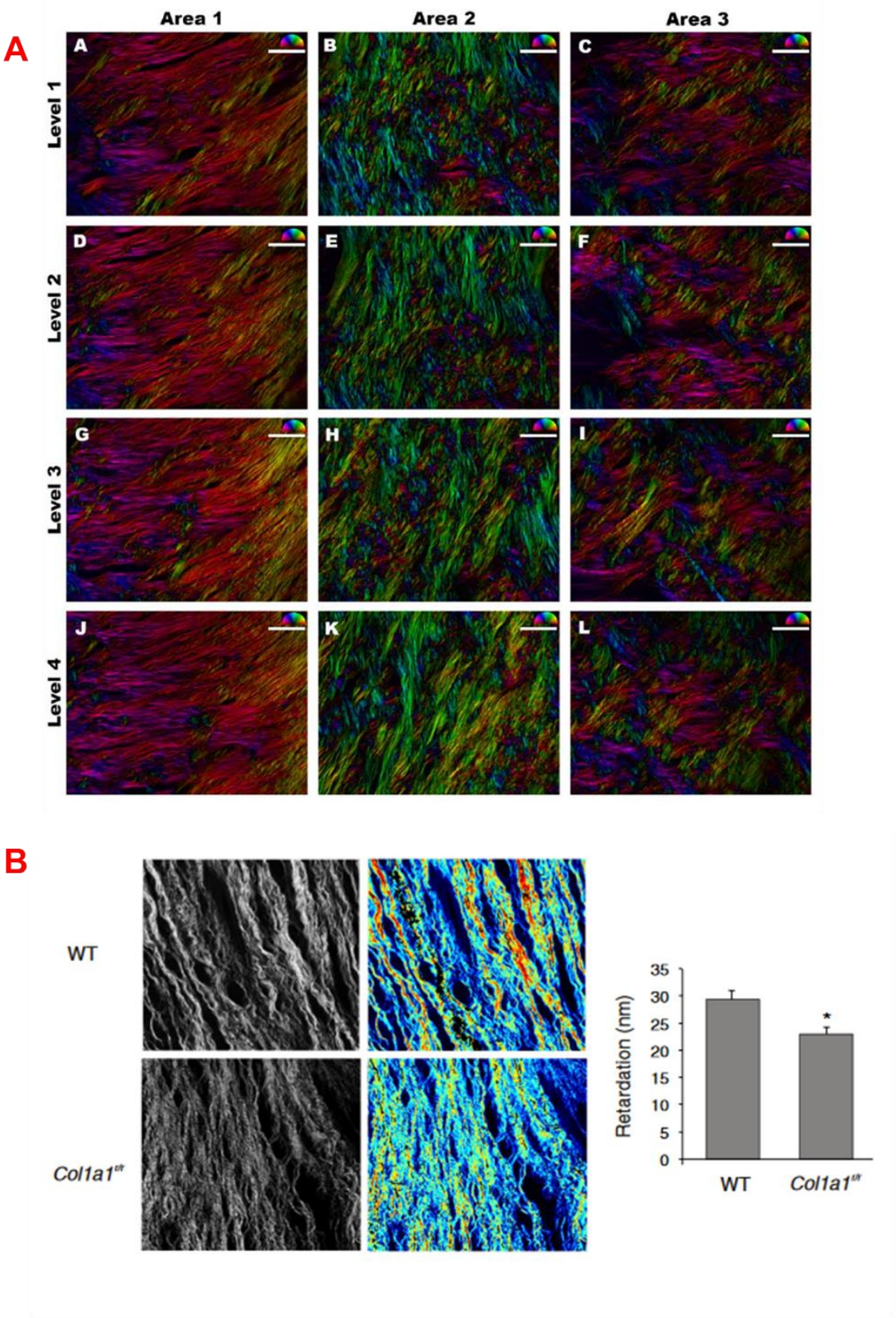


Figure 20 : (A) Micrographies PolScope de la surface du derme étudiant les orientations du après 8 semaines de greffe de peau à différentes surfaces et profondeur dans le derme. (Barre d'échelle=200 µm). Reproduit de Rosin et al. 2015. (B) Micrographies PolScope circulaires et de retardance des orientations des fibrilles de collagène du myocarde de la souris. Reproduit de Nong et al. 2011.

La microscopie électronique en transmission est une technique de microscopie reposant également sur les interactions électrons-matière. Le faisceau est ici transmis à travers l'échantillon, il est donc nécessaire que l'échantillon observé soit très fin. Dans le cas de nos matériaux et nos références, des coupes ultrafines (≤ 80 nm) ont été préparées (fixées, déshydratées et mises en résine) et contrastées pour l'observation. Elle permet d'obtenir des informations plus locales sur la taille et l'organisation des fibrilles comme cela est illustré pour le contre-plaqué torsadé observé dans l'os compact déminéralisé dans la *Figure 22*.

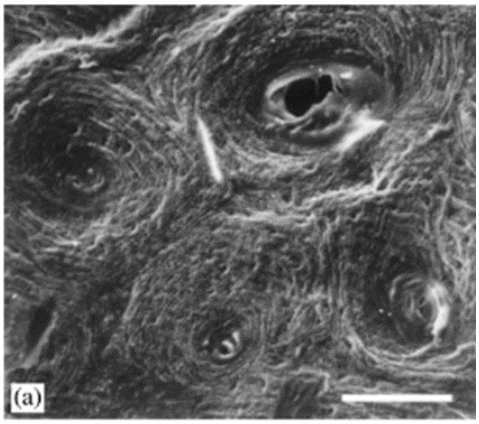


Figure 21 : Cliché en MEB d'une coupe transverse d'un os compact humain déminéralisé. Les ostéons apparaissent sous la forme de lamelles osseuses concentriques (barre d'échelle=100µm). Reproduit de Giraud-Guille 2003.

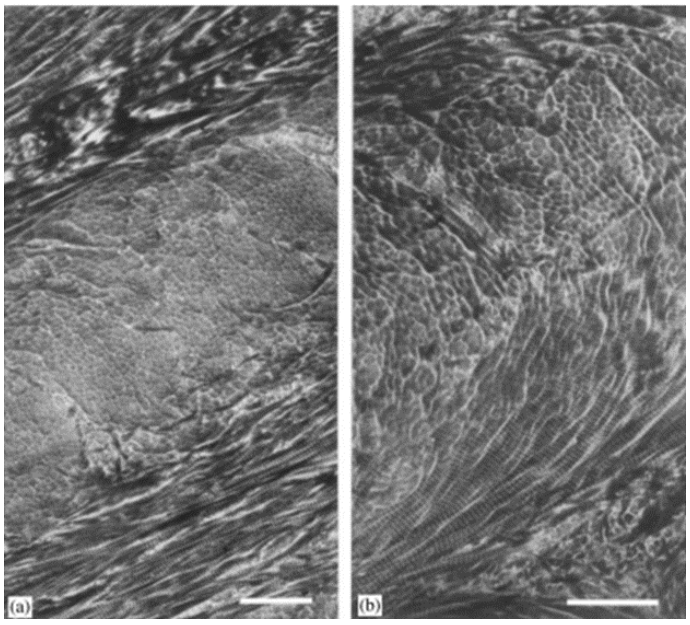


Figure 22 : Clichés MET de coupes ultrafines d'os compacts décalcifiés. (a) Deux orientations des fibrilles de collagène sont observées : l'une où les fibrilles sont alignées et l'autre où les fibrilles sont orthogonales au plan.

(b) les fibrilles de collagène décrivent un motif en arceaux (barre d'échelle=0.1µm). Reproduit de Giraud-Guille 2003.

La diffusion des rayons X est une technique de caractérisation basée sur les interactions rayons X-matière. Cette technique permet de déterminer la nature cristalline ou amorphe de nos composés et d'en identifier les phases cristallines. Elle permet également d'étudier l'organisation des fibrilles de collagène entre elles. Dans le cas de nos échantillons, la diffusion des rayons X aux grands angles (WAXS) a été utilisée.

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à l'état solide est une technique de caractérisation moins courante. Elle est basée sur les propriétés de certains noyaux atomiques à posséder un spin nucléaire non-nul lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique. Les atomes absorbent l'énergie du rayonnement électromagnétique (ou rayonnement radiofréquence) auxquels ils sont soumis, puis relâchent cette énergie, c'est ce qu'on appelle la relaxation. Chaque isotope possède sa propre fréquence de résonnance, appelée fréquence de Larmor, qui dépend à la fois du champ magnétique appliqué à l'atome mais aussi de son rapport gyromagnétique (*i.e.* rapport entre le moment magnétique et le moment cinétique du noyau). Dans cette thèse, cette technique nous permet de déterminer la phase minérale de phosphate de calcium (*Figure 23*). Ces caractérisations se porteront sur deux noyaux différents : l'hydrogène ^{1}H et le phosphore ^{31}P. Les différentes séquences utilisées dans cette étude sont détaillées dans le chapitre **Matériels et Méthodes** (Partie VI-2.3).

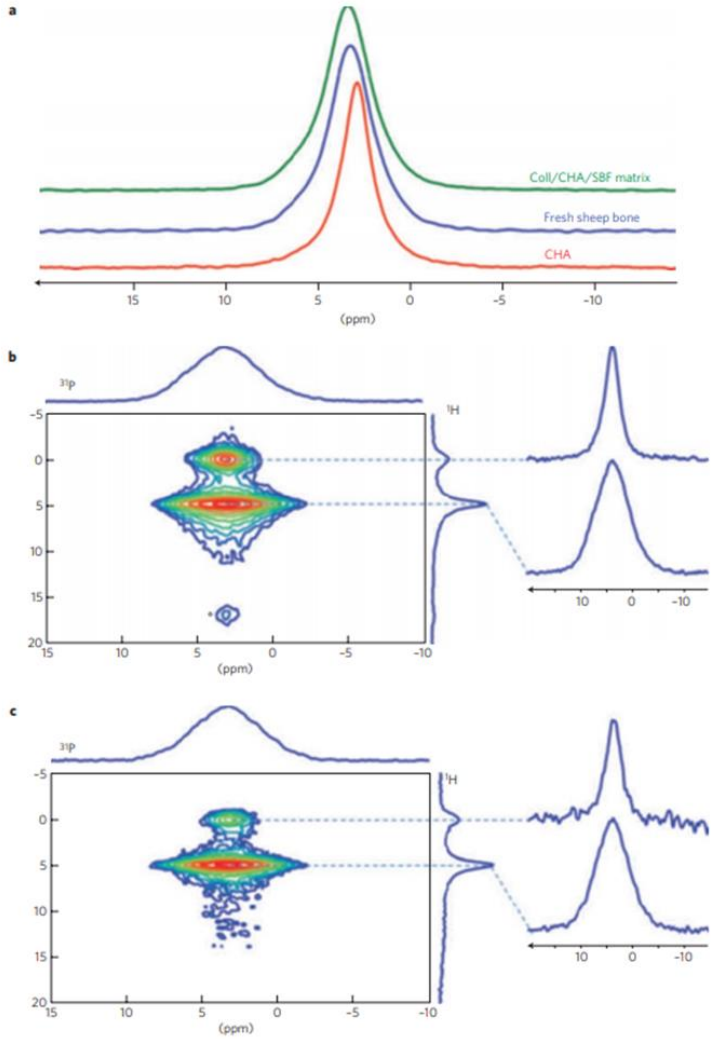


Figure 23 : Investigation structurale de la phase minérale d'une poudre de synthèse (CHA), dans un os de brebis fraîchement extrait (fresh sheep bone) et dans une matrice de synthèse de collagène/apatite (Coll/CHA/SBF matrix). (a) Analyse quantitative du ^{31}P dans les trois échantillons (b) spectre 2D ^{1}H-^{31}P de la matrice Coll/CHA/SBF (c) spectre 2D ^{1}H-^{31}P sur l'os de brebis frais. La similarité des deux derniers spectres RMN montre que l'environnement chimique des phosphates est similaire. Reproduit de Wang et al. 2012.

IV. Lumière polarisée et défauts topologiques dans les cristaux liquides lyotropes

Dans cette partie, nous allons rappeler les principes de base de la polarisation de la lumière ainsi qu'une définition générale sur les cristaux liquides lyotropes et les défauts associés à leurs organisations. Cette notion de défauts a été essentielle dans la compréhension des phénomènes que nous avons observé dans cette thèse.

1. Polarisation, biréfringence et microscopie optique à lumière polarisée

La microscopie optique à lumière polarisée est une technique de caractérisation qui étudie l'anisotropie locale des propriétés optiques d'un matériau. L'anisotropie optique d'un matériau (*e.g.* tissu) relève de son organisation à l'échelle micrométrique de telle sorte que les propriétés optiques résultantes (absorption, réflexion, transmission) dépendent de l'agencement de l'ordre moléculaire.

Le principe de la microscopie optique à lumière polarisée est fondée sur les propriétés de la polarisation de la lumière et de la capacité d'un matériau anisotrope à dévier la lumière (*Figure 24A*). En effet, la transition isotrope/anisotrope lors de la concentration d'une solution de collagène par évaporation de solvant s'observe sous lumière polarisée : la solution isotrope ne va pas modifier le trajet de la lumière tandis que la solution concentrée, va spontanément s'organiser à l'échelle moléculaire et s'agencer pour former des domaines anisotropes qui vont dévier le trajet de la lumière et empêcheront l'extinction de la lumière entre polariseurs croisés. On parle alors de propriétés de biréfringence.

La lumière est une onde électromagnétique, elle correspond à la propagation simultanée d'un champ électrique et d'un champ magnétique dont les oscillations respectives sont perpendiculaires entre elles et à la direction de propagation de la lumière. Rappelons que l'onde lumineuse ne se propage pas à la même vitesse selon le milieu qu'elle traverse mais à une vitesse *v* telle que :

$$v = \frac{c}{n}$$

Où *c* est la constante de célérité de la lumière et *n* l'indice de réfraction propre à la matière traversée.

La polarisation de la lumière est induite par la direction des oscillations du champ électrique dans le plan perpendiculaire à la propagation de la lumière, c'est-à-dire que si cette direction n'est plus aléatoire mais privilégiée alors la lumière est polarisée. Cette polarisation dépend de l'amplitude et de la direction du champ électrique qui déterminent le caractère elliptique de l'onde lumineuse (onde polarisée linéairement, circulairement ou elliptiquement) (*Figure 24B*). Elle peut être ainsi décomposée en deux composantes *x* et *y* dont l'amplitude est déphasée d'un angle φ :

$$E_x = E_{0x}\cos(\omega t) \text{ et } E_y = E_{0y}\cos(\omega t + \varphi)$$

Dans le cadre de cette thèse, les études faites par microscopie optique à lumière polarisée et microscopie optique à lumière polarisée à mesures PolScope sont respectivement faites par une polarisation linéaire et circulaire de l'onde lumineuse.

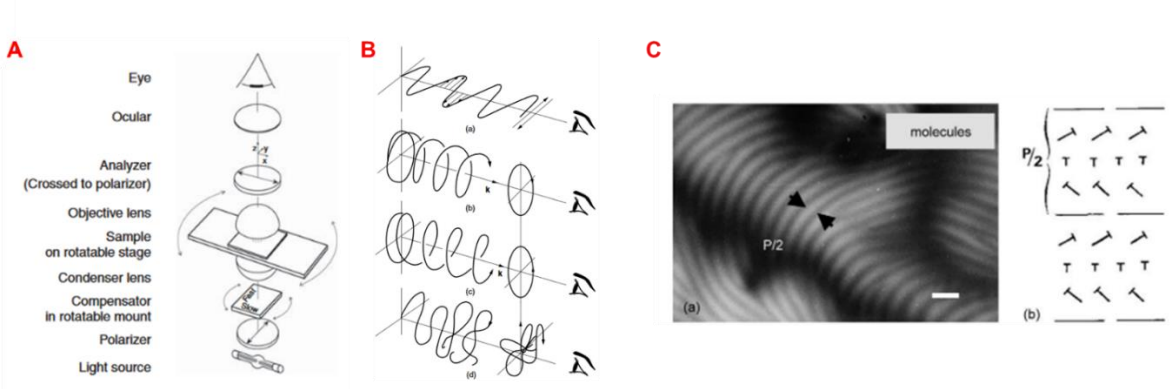


Figure 24 : (A) Représentation schématique des différents composants du microscope optique à lumière polarisée traditionnel. Dans notre cas, il est également équipé d'une caméra CCD. Reproduit de Oldenbourg 2013. (B) Représentation schématique des états de polarisation de la lumière : a) linéaire b) circulaire gauche c) circulaire droite d) dépolarisation. Reproduit de Iizuka 2002. (C) a) Cliché sous lumière polarisée linéaire d'une goutte de solution de collagène entre lame et lamelle b) Représentation schématique de l'orientation des molécules suivant les extinctions. Reproduit de Giraud-Guille 2005.

La biréfringence d'un matériau anisotrope relève de sa capacité à avoir un indice de réfraction *n* différent de celui de la direction de la polarisation de la lumière, lié à l'organisation intrinsèque du matériau. Les deux indices de réfractions n_x et n_y agissent ainsi sur les composantes *x* et *y* du champ électrique de l'onde électromagnétique. Cette variation de vitesse des composantes du champ électrique agit directement sur l'amplitude de l'angle φ, on appelle cette variation le phénomène de retardance Γ, exprimé en radians par la formule suivante :

$$\Gamma = \frac{2\pi \Delta_N L}{\lambda_0}$$

où Δ_n est la biréfringence, L l'épaisseur de l'échantillon observé et λ_0 la longueur d'onde de la lumière dans le vide.

Deux méthodes utilisées dans ce travail nous ont permis d'observer la biréfringence des échantillons. Dans le cas d'un microscope à lumière polarisée « classique » (*i.e.* polarisation linéaire *Figure 24A*) deux filtres sont placés à 90° l'un de l'autre. Le premier filtre polarise la lumière à la sortie du condenseur (polariseur) et le deuxième placé derrière la lentille objective permet d'analyser la polarisation de la lumière qui a traversé l'échantillon (analyseur). Seules les zones optiquement anisotropes sont alors observées, les domaines isotropes apparaissent sombres (*Figure 24C*). En effectuant une rotation de 45° du polariseur et de l'analyseur, il est alors possible de récupérer les orientations des domaines anisotropes à 90°. Néanmoins, cette méthode ne nous donne pas accès à l'orientation des molécules à 360°.

Dans le cas du PolScope (*i.e.* polarisation circulaire *Figure 25A*), les modifications apportées à l'appareillage sont la polarisation circulaire de l'onde lumineuse générée à l'aide d'un polariseur linéaire et d'une lame quart-d'onde, et l'ajout d'un compensateur cristal-liquide universel permettant ainsi de déterminer avec précision l'orientation des domaines anisotropes. Les retardateurs variables dans l'appareillage sont mis en œuvre en tant que dispositifs électroniques et permettent de régler uniformément la retardance en fonction du voltage appliqué afin de prendre différents clichés de l'échantillon à différentes retardances. Ces clichés, dont l'intensité lumineuse varie, vont être compilés à l'aide d'un logiciel de traitement d'images. Deux mesures sont alors visibles sur le cliché : la retardance par l'intensité de la couleur observée (*Figure 25B*) et l'azimuth (*i.e.* orientation) par la couleur observée (*Figure 25C*), déterminée par un cercle chromatique d'ordre 2 (pas de discrimination possible à 180°). Néanmoins, cette méthode ne nous permet pas d'observer la retardance et l'azimuth sur une ligne continue, à cause de la trop grande retardance sur certains domaines. La résolution à plus fort grandissement est donc plus faible qu'en lumière polarisée classique.

L'intérêt de combiner ces deux méthodes nous permettra donc d'étudier et de suivre précisément l'évolution des domaines anisotropes en lumière polarisée et d'en déterminer leurs orientations exactes. Ces outils vont être importants dans la compréhension de l'apparition de défauts dans nos systèmes de cristaux-liquides lyotropes.

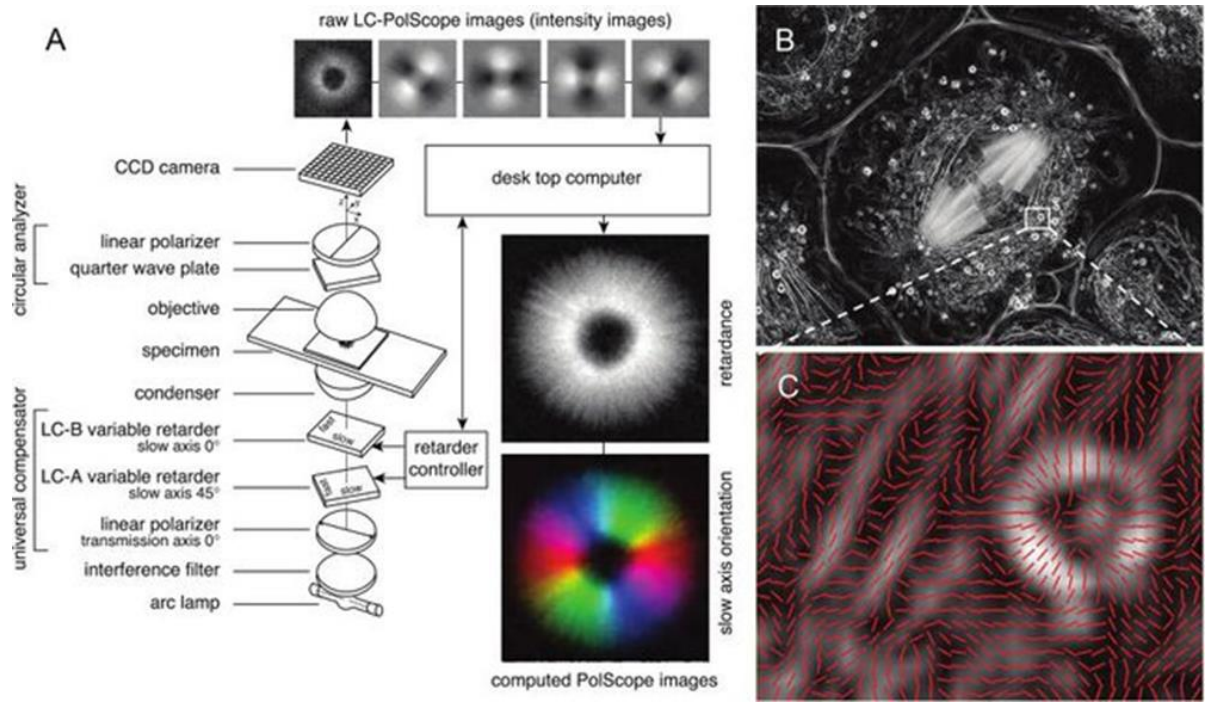


Figure 25 : (A) Représentation schématique du design optique du LC-PolScope (B) Cliché LC-PolScope d'un spermatocyte d'une mouche grue Nephrotoma suturalis. La luminosité observée est proportionnelle à la biréfringence de l'échantillon indépendamment de l'orientation de la structure (C) Région cytoplasmique de (B) agrandie. Les lignes rouges indiquent la direction de chaque pixel, la direction des molécules correspondantes est perpendiculaire à ces lignes. Reproduit de Tani et al. 2016.

2. Cristaux liquides, cristaux liquides lyotropes et défauts topologiques

Les cristaux-liquides sont un état de la matière qui possède à la fois des propriétés propres aux liquides conventionnels et des propriétés propres à celles des solides, il peut donc s'écouler comme un liquide mais présente un ordre à grande distance. Cet état de la matière est une mésophase, c'est-à-dire un état de transition entre deux autres états de la matière. Différentes phases de cristaux-liquides existent et différent de par les textures de biréfringence observées en lumière polarisée et des caractéristiques physico-chimiques des matériaux.

Historiquement, les premières traces de travaux sur les cristaux-liquides dans la littérature datent du XVII^{ème} et du milieu du XVIII^{ème} siècle (Buffon 1749 ; Virchow 1854) mais on considère une véritable avancée dans ce domaine par les travaux de Reinitzer en 1888 (Reinitzer 1888) sur les cristaux de benzoate de cholestérol. Il découvrit en étudiant les propriétés physico-chimiques que ce composé possédait deux points de fusion différents. En effet, à 145,5°C, les cristaux fondent sous forme de liquide laiteux et à 178,5°C, le liquide devient plus clair et laisse apparaître certaines couleurs et textures. Il constate également que ce phénomène est réversible. Avec l'aide du physicien Lehmann, ils vont étudier ce phénomène sous lumière polarisée et le nom de cristaux-liquides sera donné en 1900. C'est d'ailleurs cette étude qui donnera le nom de la phase cholestérique en rapport avec le benzoate de cholestérol.

De nombreux travaux ont par la suite été menés sur les cristaux-liquides, notamment :

- P.G. de Gennes obtient le Nobel de physique en 1991 pour ses travaux sur les phénomènes d'ordre dans des systèmes simples appliqués aux systèmes complexes (De Gennes 1974, 1993 et 1995).

Cette thématique de recherche est très vaste et applicable à de nombreux domaines d'études. Cette liste n'est donc pas exhaustive. Dans le champ disciplinaire qui nous intéresse ici, nous pouvons citer :

- Y. Bouligand qui a mené ses travaux à une interface plus biologique sur l'analogie des géométries cristal-liquides avec les organisations observées dans les tissus biologiques comme décrits dans ce chapitre (Bouligand 1965, 1969, 1972, 1978, 1985 et 2010).

- M. Mitov qui a poursuivi ses travaux dans la même optique de compréhension sur ces analogies biologiques des cristaux-liquides cholestériques notamment chez les coléoptères (Mitov 2000, 2010 et 2017).

- F. Livolant qui a travaillé sur les phases cristal-liquides hexagonales obtenues avec des polymères hélicoïdaux comme l'ADN (Livolant 1986, 1989, 1991). Notons que l'ADN est une seule molécule double brin qui ne présente pas la propriété de former des unités auto-assemblées à d'autres échelles telles que les fibrilles pour le collagène, les whiskers pour la cellulose et les cristallites pour la chitine.

- Comme citée précédemment dans ce chapitre, M.-M. Giraud-Guille a mené ses travaux sur les analogies biologiques des cristaux liquides cholestériques sur la chitine (dans les cuticules de crabe) et le collagène (dans l'os, voir **Chapitre 2**).

- F. Gaill a, quant à elle, travaillé sur les contre-plaqués orthogonaux observés dans les cuticules d'annélides. Elle a montré que dans ces cuticules, le collagène s'organisait en double contreplaqués hélicoïdaux. Elle a notamment démontré la présence de phases bleues pour cette molécule. (Gaill 1991 et 1993).

On distingue trois types de cristaux-liquides (CLs) : les thermotropes, les lyotropes et les métallotropes. Les cristaux-liquides thermotropes et lyotropes sont majoritairement retrouvés avec des molécules organiques tandis que les métallotropes sont composés à la fois de molécules organiques et inorganiques. Les CLs thermotropes s'organisent en fonction de la température, il existe donc une température critique à laquelle on peut observer la transition de phase isotrope-anisotrope du milieu. Pour les CLs lyotropes, cette transition est une fonction de la concentration du soluté. Néanmoins, il est à noter que les paramètres de **température** et de **pression** seront à prendre en compte dans notre étude. En effet, nos observations n'ont pas toutes été réalisées dans des conditions contrôlées (pièce climatisée), l'évaporation des solvants a donc pu être plus rapide selon ces paramètres. Pour les CLs métallotropes, cette transition dépend de tous les paramètres énoncés précédemment mais également du rapport organique/inorganique du matériau.

Les différentes phases cristal-liquides (*Figure 26*) ne seront pas toutes décrites en détail dans cette partie, nous allons nous intéresser essentiellement à la phase nématique allongée et à la phase nématique chirale (cholestérique) et aux notions de défauts et d'ancrage dans ces organisations que nous avons été menés à observer dans cette thèse.

Dans notre étude, des solutions à différentes concentrations en collagène ont été utilisées. Nous serons donc amenés à pouvoir observer la transition isotrope-anisotrope lorsque la concentration critique en collagène sera franchie. De plus, le système que nous avons mis en place dans ce travail nous permettra d'étudier les défauts inhérents à l'organisation du collagène *in vitro*.

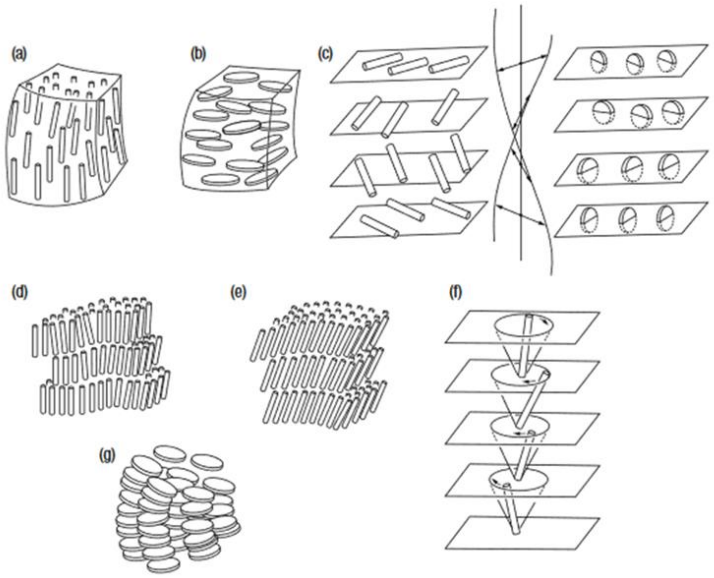


Figure 26 : Représentations schématiques des principales phases cristal-liquides (a) nématique (molécules allongées) (b) nématique (molécules discoïdes) (c) nématique chirale ou cholestérique (d) smectique A (e) smectique C (f) smectique chirale C (g) hexagonale. Reproduit de Bouligand 2010.

1. Cas de la phase nématique

La structure nématique est l'organisation la plus commune chez les CLs et la première mésophase à se former lors de la transition isotrope-anisotrope. L'orientation des molécules dans cette structure est unique, c'est-à-dire que les molécules vont s'orienter dans une seule direction à grande distance, on parle alors d'alignements selon un axe préférentiel (*Figure 27*). Comme nous le verrons dans le **Chapitre 3**, selon le diagramme de phase des transitions du collagène (*Figure 14*), la phase nématique apparaît au-dessus de 40 mg/ml (Giraud-Guille 1988).

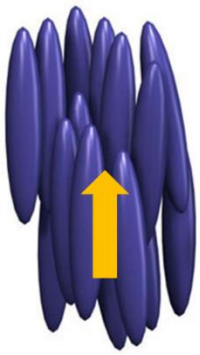


Figure 27 : Représentation schématique de la phase nématique dont l'ordre orientationnel des molécules est fait selon une direction privilégiée. Reproduit et modifié de Barrett et al. 2012.

On distingue deux types de défauts dans les structures cristal-liquides qu'on appelle communément dislocations : les dislocations de translation, qui correspondent à un déplacement linéaire des molécules au sein de la structure, et les dislocations de rotation ou disinclinaisons qui correspondent à des rotations d'un angle θ autour d'un point de défaut en 2D.

La notion d'ancrage d'un nématique relève de la fixation de l'orientation du cristal-liquide en fonction de la surface d'observation. En absence de surface et forces imposées (frottements, rugosité, *etc*.), on considère le champ directeur du nématique uniforme et sans orientation privilégiée.

On distingue alors trois différents types d'ancrage : l'ancrage homéotrope (perpendiculaire à la surface) où les molécules s'organisent spontanément sur une surface lisse, l'ancrage planaire (parallèle à la surface) où les molécules s'organisent selon le sens du frottement et l'ancrage oblique (oblique à la surface) où les molécules s'organisent selon différents axes de symétrie de la surface.

Dans le cas de la phase nématique, l'observation en lumière polarisée est sous forme de filaments entre polariseurs croisés sur une lame de verre traitée par ancrage homéotrope, ce phénomène a été étudié par Friedel (Friedel 1922) (*Figure 28*). Entre deux lames de verre non traitées, l'organisation des molécules dans la structure nématique est développée selon un ancrage planaire et on observe une nouvelle texture sous lumière polarisée en « plage à noyaux » : les filaments sont alors des extinctions du nématique et les molécules sont tangentes ou parallèles à ces extinctions. Selon les champs directeurs obtenus par le processus de Volterra-De Gennes-Friedel (Volterra 1907), différentes disinclinaisons peuvent être obtenues (*Figure 29*).

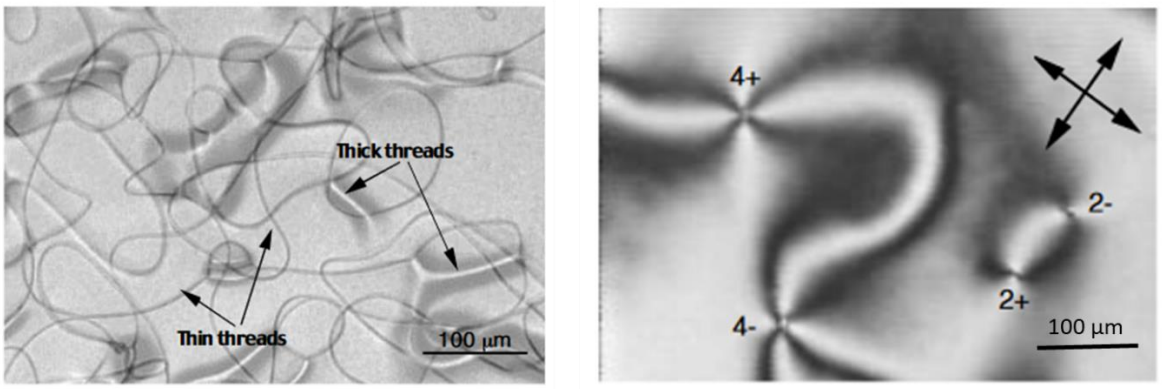


Figure 28 : (Gauche) Texture à fils d'un cristal liquide nématique en ancrage homéotrope. Les défauts n'entrent pas en contact les uns avec les autres. Distinction entre fils fins et fils épais qui constituent deux disinclinaisons différentes. (Droite) Plages à noyaux d'un cristal liquide nématique en ancrage planaire. Les noyaux représentent le cœur des défauts, à 2 ou 4 branches. Reproduit de Oswald et Pieranski 2000.

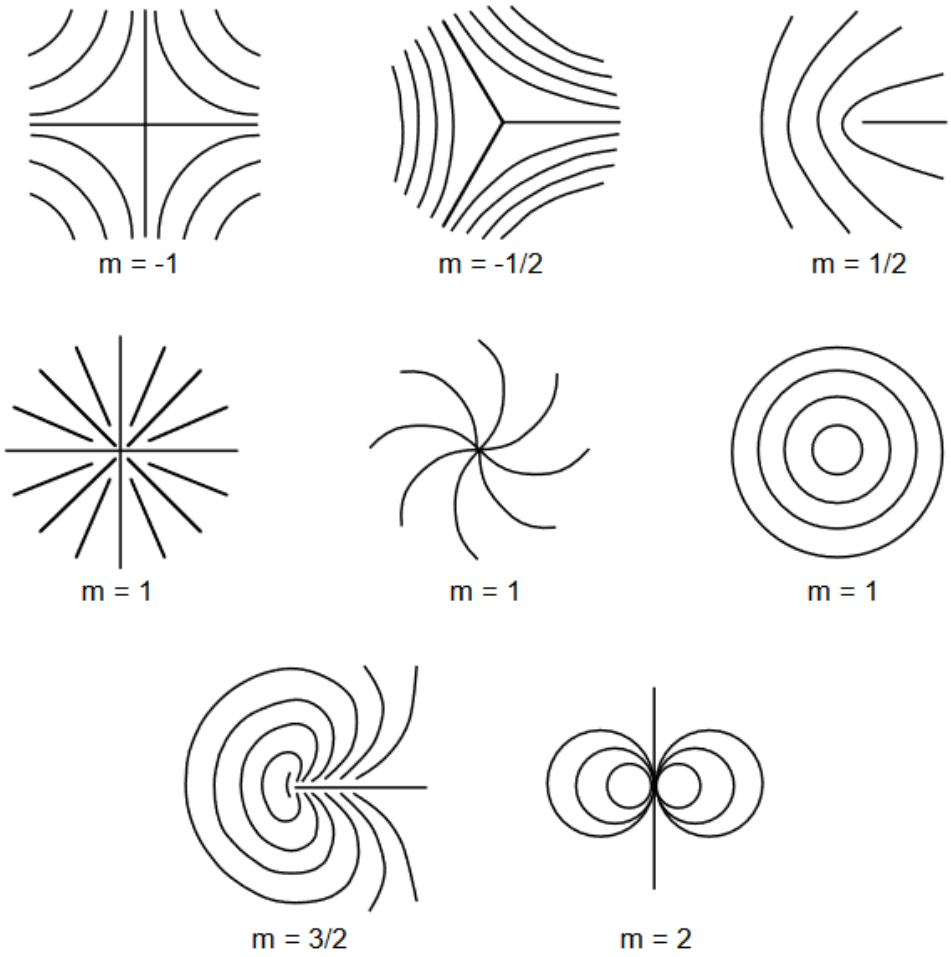


Figure 29 : Représentation schématique des disinclinaisons dièdre planaires associées à leur rang topologique m. Reproduit de Oswald et Pieranski 2000.

2. Cas de la phase cholestérique

La structure cholestérique ou nématique chirale correspond à une phase nématique au sein de laquelle a été introduite une torsion (*i.e.* une chiralité de structure). Cette torsion des molécules les unes par rapport aux autres induit une orientation préférentielle de chaque plan moléculaire, où chaque plan est « décalé » d'une rotation par rapport au précédent selon l'axe cholestérique ou hélicoïdal. Une rotation de 360° correspond donc à un pas cholestérique P (*Figure 30*). La valeur de ce pas cholestérique est de l'ordre du micron au sein des différentes molécules. Comme on le verra dans le **Chapitre 3**, selon le diagramme de phase des transitions du collagène (*Figure 14*), la phase cholestérique apparaît vers 80 mg/ml (Giraud-Guille 1988).

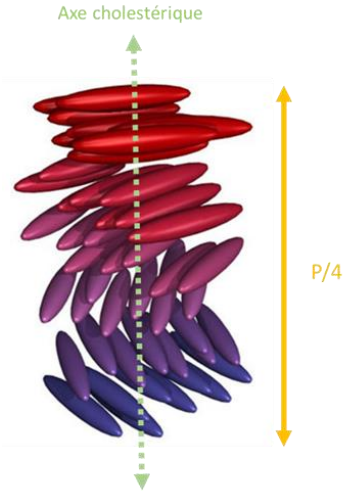


Figure 30 : Représentation schématique de la phase cholestérique où les plans moléculaires virtuels parallèles successifs effectuent une rotation par rapport au plan précédent. 360° correspond à un pas cholestérique, ici seulement un quart de ce pas est représenté. Reproduit et modifié de Barrett et al. 2012.

Dans le cas de la phase cholestérique, suivant le type d'ancrage des molécules, la texture observée sous lumière polarisée sera différente. Sur une surface à ancrage planaire, l'hélice cholestérique est orientée uniformément et parallèlement au plan d'observation. Le pas cholestérique est visible entre polariseurs croisés dans les bandes observées (*Figure 31A*). Sur une surface à ancrage homéotrope, l'hélice cholestérique est orientée perpendiculairement au plan d'observation. Les molécules sont orientées (molécules dans le plan, molécules perpendiculaires et molécules obliques) et sous lumière polarisée on observe une différence d'intensité lumineuse due à l'orientation des plans moléculaires qui engendre une alternance de bandes sombres et claires, ce motif est dit en empreintes digitales ou en plages à éventails (*Figure 31B*).

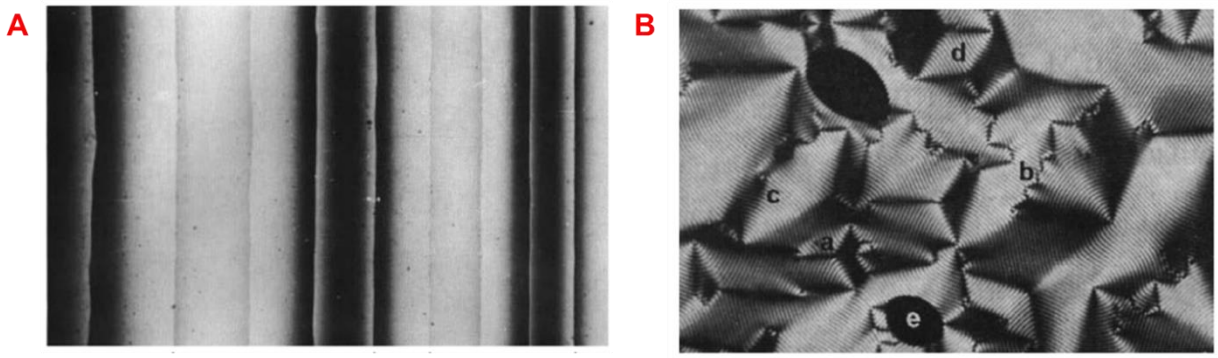


Figure 31 : (A) Texture cholestérique en ancrage planaire dite dans un « coin de Cano » observée sous polariseurs croisés. Dans chaque bande correspond un nombre n de demi-pas hélicoïdaux. Thèse de Brunet-Germain 1972. (B) Texture cholestérique en plage à éventails ou en empreintes digitale. Les strates cholestériques sont perpendiculaires à la lame de verre. Différents motifs sont visibles : (a) pincement élémentaire qui ne perturbe pas les différentes strates à grande distance, (b) zigzag qui correspond au contact de deux strates à l'orientation définie différente, (c) dislocation coin qui correspond à un coin de Cano et (d) losange qui correspond à l'opposition de deux orientations parallèles au plan cholestérique. Bouligand 1973. Reproduit de Oswald et Pieranski 2000.

Selon la texture cholestérique, différentes disinclinaisons sont également observables : les disinclinaisons de la phase nématique auxquelles s'ajoutent des disinclinaisons qui correspondent à des rotations autour de l'axe cholestérique.

Dans le cas des biopolymères, les molécules sont orientées dans différentes directions de l'espace ce qui mène à l'observation de textures cholestériques en empreintes digitales (Belamie *et al.* 2006 ; Giraud-Guille 2003) (*Figure 32A et Figure 32B*). Différentes disinclinaisons peuvent être observées sur un même échantillon.

Bien que le phénomène de défauts intrinsèques n'ait pas été spécifiquement étudié sur la morphogénèse des tissus, il a été néanmoins montré que les défauts jouent un rôle sur les propriétés mécaniques des tissus biologiques (Mo et Raney 2020).

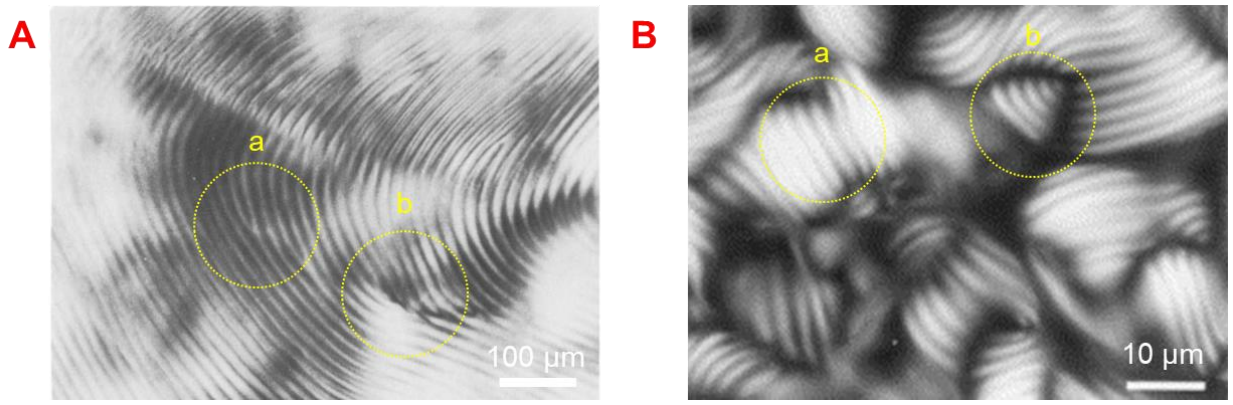


Figure 32 : Clichés en lumière polarisée de texture cholestérique en empreintes digitales. (A) Suspension colloïdale de cristallites de chitine soniquée. a) dislocation coin, b) dislocation coin. Reproduit de Revol et Marchessault 1993. (B) Solution acido-soluble de collagène concentrée à 80 mg/mL. a) dislocation coin, b) pincement élémentaire. Reproduit de Giraud-Guille 2003.

Dans le contexte de cette thèse et des preuves de concept que nous avons mis en évidence (**Chapitre 2**), nous serons amenés à étudier l'association des disinclinaisons de la phase nématique dans notre système (**Chapitre 3**).

Références bibliographiques

Algaba, H. 2016. « Etude de la formation de structures complexes auto-organisés par séchage confiné de solutions dans des milieux poreux microtexturés en 2D. Adaptation et Système auto-organisés ». Université Rennes 1. Français. Tel -01496480.

Andersen, T. L., Sondergaard T.E., Skorzynska K.E., Dagnaes-Hansen F., Plesner T.L., Hauge E.M., Plesner T., et Delaisse J-M. 2009. « A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone ». *The American Journal of Pathology* 174 (1): 239-47.

Ascenzi A., et Benedetti E.L. 1959. « An electron microscopic study of the foetal membranous ossification ». *Cells Tissues Organs* 37 (4) : 370-85.

Baron R. 2001. « L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse ». *Médecine/sciences* 17 (12): 1260-69.

Belamie, E., G. Mosser, F. Gobeaux, et M. M. Giraud-Guille. 2006. « Possible transient liquid crystal phase during the laying out of connective tissues: α-chitin and collagen as models ». *Journal of Physics: Condensed Matter* 18 (13): S115–S129.

Besseau, L., et Bouligand Y. 1998. « The twisted collagen network of the box-fish scutes ». *Tissue and Cell* 30 (2): 251-60.

Besseau L., et Giraud-Guille M-M. 1995. « Stabilization of fluid cholesteric phases of collagen to ordered gelated matrices ». *Journal of Molecular Biology* 251 (2): 197-202.

Besseau L., Coulomb B., Lebreton-Decoster C, et Giraud-Guille M-M. 2002. « Production of Ordered Collagen Matrices for Three-Dimensional Cell Culture ». *Biomaterials* 23 (1): 27-36.

Bigi, A., G. Cojazzi, S. Panzavolta, A. Ripamonti, N. Roveri, M. Romanello, K. Noris Suarez, et L. Moro. 1997. « Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone ». *Journal of Inorganic Biochemistry* 68 (1): 45-51.

Blumstein A. 1978. *Liquid Crystalline Order in Polymers*. Édité par Academic Press.

Bonar L., Laurence C., Lees S., et Mook H. A. 1985. « Neutron diffraction studies of collagen in fully mineralized bone ». *Journal of Molecular Biology* 181 (2): 265-70.

Boonrungsiman, S., E. Gentleman, R. Carzaniga, N. D. Evans, D. W. McComb, A. E. Porter, and M. M. Stevens. 2012. « The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, no. 35 (2012): 14170-4175.

Bouligand Y. 1965a. « Sur une architecture torsadée répandue dans de nombreuses cuticules d'arthropodes ». *Comptes rendus hebdomadaires de séances de l'académie des Sciences* : 261 (18) : 3665.

Bouligand Y. 1965b. « Sur une disposition fibrillaire torsadée commune à plusieurs structures biologiques ». *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'académie des Sciences* : 261 (22) : 4864.

Bouligand Y. 1969. « Sur l'existence de "pseudomorphoses cholestériques" chez divers organismes vivants ». *Le Journal de Physique Colloques* 30 (C4) : C4-90

Bouligand, Y. 1972. « Twisted Fibrous Arrangements in Biological Materials and Cholesteric Mesophases ». *Tissue and Cell* 4 (2): 189-217.

Bouligand, Y. 1973a. « Recherches sur les textures des états mésomorphes. 3. Les plages à éventails dans les cholestériques ». *Journal de Physique* 34 (7) : 603-14.

Bouligand, Y. 1973b. « Recherches sur les textures des états mésomorphes 4. La texture à plans et la morphogenèse des principales textures dans les cholestériques ». *Journal de Physique* 34 (11-12) : 1011-20.

Bouligand Y. 1978. « Liquid crystals and their analogs in biological systems ». *Solid state physics, supplement* 14.

Bouligand, Y. 1978. « Cholesteric order in biopolymers ». In *Mesomorphic Order in Polymers*, 74:237-47. ACS Symposium Series 74. American Chemical Society.

Bouligand, Y., J. P. Denefle, J. P. Lechaire, et M. Maillard. 1985. « Twisted architectures in cell-free assembled collagen gels: study of collagen substrates used for cultures ». *Biology of the Cell* 54 (2): 143-62.

Bouligand, Y., et Giraud-Guille M-M. 1985. « Spatial organization of collagen fibrils in skeletal tissues: analogies with liquid crystals ». In *Biology of Invertebrate and Lower Vertebrate Collagens*, édité par A. Bairati et R. Garrone, 115-34. NATO ASI Series. Boston, MA: Springer US.

Bouligand Y. 2010. Liquid crystals and morphogenesis. Dans: *Morphogenesis: origins of patterns and shapes*. Springer Science & Business Media.

Bourne, Geoffrey H. 2014. The Biochemistry and Physiology of Bone. Elsevier.

Boyde, Alan. 2019. « Scanning electron microscopy of bone ». In *Bone Research Protocols*, édité par Aymen I. Idris, 1914:571-616. New York, NY: Springer New York.

Boyde A., et Jones S.J. 1996. « Scanning electron microscopy of bone: instrument, specimen, and issues ». *Microscopy Research and Technique* 33 (2): 92-120.

Boyle W.J., Simonet W.S., et Lacey D.L. 2003. « Osteoclast differentiation and activation ». *Nature* 423 (6937): 337-42.

Brown, R. A., M. Wiseman, C.-B. Chuo, U. Cheema, et S. N. Nazhat. 2005. « Ultrarapid engineering of biomimetic materials and tissues: fabrication of nano- and microstructures by plastic compression ». *Advanced Functional Materials* 15 (11): 1762-70.

Buffon G. 1749. « Histoire naturelle, T. 1 ».

Caplan A. I. 1987. « Bone development and repair ». *BioEssays* 6 (4): 171-75.

Coe F.L, et Favus M.J. 1992. *Disorders of Bone and Mineral Metabolism*. Edité par Raven Press.

Davies J.E., et Hosseini M.M. 2000. « Histodynamics of endosseous wound healing ». *Bone engineering* 1: 1-14

De Gennes, P. G., et D. Rainer. 1974. « Alignment of anisotropic superfluids by flow ». *Physics Letters A* 46 (7): 429-30.

De Gennes, P. G. de, et J. Prost. 1993. *The Physics of Liquid Crystals*. Clarendon Press.

De Gorter D. et ten Dijke P. 2018. « Signal transduction cascades controlling osteoblast differenciation » in *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, édité par Clifford J. Rosen, 15-24. *American Society for Bone and Mineral Research.*

Eastoe, J. E. 1956. « The organic matrix of bone ». In *The Biochemistry and Physiology of Bone*, édité par Geoffrey H. Bourne, 81-105. Academic Press.

Von Ebner, V. 1875. « Ueber den feineren Bau der Knochensubstanz ».

Ehrmann, R. L., et G. O. Gey. 1956. « The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen ». *Journal of the National Cancer Institute* 16 (6): 1375-1403.

Everts, V., J. M. Delaissé, W. Korper, D. C. Jansen, W. Tigchelaar-Gutter, P. Saftig, et W. Beertsen. 2002. « The bone lining cell: its role in cleaning howship's lacunae and initiating bone formation ». *Journal of Bone and Mineral Research* 17 (1): 77-90.

Faure-Fremiet, E., and Garrault, A. 1937. « Le tissu conjonctif aciculaire de la vessie natatoire ». *Archives d'Anatomie Microscopique* 33 (81).

F. Xu, et Jay M. McDonald. 2011. « Disorders of bone remodeling ». *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6 (1): 121-45

Fratzl, P. 2012. « A composite matter of alignment ». *Science* 335 (6065): 177-78.

Fratzl, P., éd. 2008. *Collagen: Structure and Mechanics*. New York, NY: Springer.

Fratzl, P., O. Paris, K. Klaushofer, et W. J. Landis. 1996. « Bone mineralization in an osteogenesis imperfecta mouse model studied by small-angle x-ray scattering ». *The Journal of Clinical Investigation* 97 (2): 396-402.

Fratzl, P., S. Schreiber, et K. Klaushofer. 1996. « Bone mineralization as studied by small-angle x-ray scattering ». *Connective Tissue Research* 34 (4): 247-54.

Friedel, G. 1922. « Les états mésomorphes de la matière ». *Annales de Physique* 9 (18): 273-474.

Frost, H.M. 1964. « Dynamics of bone remodeling ». Bone biodynamics315.

Gaill, F. 1990. « Geometry of biological interfaces: the collagen networks ». *Le Journal de Physique Colloques* 51 (C7) : C7-169-C7-182.

Gaill F., Wiedemann, Karlheinz Mann H., Kühn K., Timpl R., et Engel J.. 1991. « Molecular characterization of cuticle and interstitial collagens from worms collected at deep sea hydrothermal vents ». *Journal of Molecular Biology* 221 (1): 209-23.

Gelse, K., E. Pöschl, et T. Aigner. 2003. « Collagens—structure, function, and biosynthesis ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Collagen in drug delivery and tissue engineering, 55 (12): 1531-46.

George A., et Veis A. 2008. « Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition ». *Chemical Reviews* 108 (11): 4670-93.

Ghazanfari, S., A. Khademhosseini, et T. H. Smit. 2016. « Mechanisms of lamellar collagen formation in connective tissues ». *Biomaterials* 97 (août): 74-84.

Giraud-Guille M.M. 1984. « Les matrices extracellulaires analogues de cristaux liquides : structure et biominéralisation ». Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie.

Giraud-Guille M.M. 1987. « Cholesteric twist of collagen in vivo and in vitro ». *Molecular Crystals and Liquid Crystals Incorporating Nonlinear Optics* 153 (1): 15-30

Giraud-Guille, M. M. 1988. « Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons ». *Calcified Tissue International* 42 (3): 167-80.

Giraud-Guille, M-M. 1989. « Liquid crystalline phases of sonicated type in collagen ». *Biology of the Cell* 67 (1): 97-101.

Giraud-Guille M-M. 1998. « Plywood structures in nature ». *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 3 (3): 221-27.

Giraud-Guille M-M., et Besseau L. 1998. « Banded patterns in liquid crystalline phases of type I collagen: relationship with crimp morphology in connective tissue architecture ». *Connective Tissue Research* 37 (3-4): 183-93.

Giraud-Guille M-M., Besseau L., et Martin R. 2003. « Liquid crystalline assemblies of collagen in bone and in vitro systems ». *Journal of Biomechanics*, Bone Cell and Tissue Mechanics, 36 (10): 1571-79.

Giraud Guille M.M., Mosser G., Helary C., et Eglin D. 2005. «Bone matrix like assemblies of collagen: From liquid crystals to gels and biomimetic materials». *Micron* 36: 602-8.

Glimcher M. J. 1959. « Molecular biology of mineralized tissues with particular reference to bone ». *Reviews of Modern Physics* 31 (2): 359-93.

Glimcher M. J. 1998. « The nature of the mineral phase in bone: biological and clinical implications ». In *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders (Third Edition)*, édité par Louis V. Avioli et Stephen M. Krane, 23-52e. San Diego: Academic Press.

Glimcher M. J. 2006. « Bone: nature of the calcium phosphate crystals and cellular, structural, and physical chemical mechanisms in their formation ». *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 64 (1): 223-82.

Gobeaux, F., E. Belamie, G. Mosser, P. Davidson, P. Panine, et M.-M. Giraud-Guille. 2007. « Cooperative ordering of collagen triple helices in the dense state ». *Langmuir* 23 (11): 6411-17.

Gong, J. K., J. S. Arnold, et S. H. Cohn. 1964. « Composition of trabecular and cortical bone ». *The Anatomical Record* 149 (3): 325-31.

Gourrier A., et Reiche I. 2005. « Chapitre 3 L'os : morphologie, structure et composition chimique » Dans *Message d'os, Archéométrie du squelette animal et humain*, Ed. Des Archives Contemporaines (EAC), coll. "Sciences Archéologiques", pp 23-37, 2015, hal-01131757f.

Griffanti, G., et S. N. Nazhat. 2020. « Dense fibrillar collagen-based hydrogels as functional osteoid-mimicking scaffolds ». *International Materials Reviews* 65 (8): 502-21.

Gross, J. 1956. « The behavior of collagen units as a model in morphogenesis ». *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 2 (4): 261-74.

Gross J. et Kirk D. 1958. « The heat precipitation of collagen from neutral salt solutions: some rate-regulating factors ». *Journal of Molecular Biology* 223(2) : 355-60.

Hall B. K., et Newman S.A. 1991. *Cartilage Molecular Aspects*. CRC Press.

Hari Reddi, A. 1995. « Cartilage morphogenesis: role of bone and cartilage morphogenetic proteins, homeobox genes and extracellular matrix ». *Matrix Biology* 14 (8): 599-606.

Helary, C., I. Bataille, A. Abed, C. Illoul, A. Anglo, L. Louedec, D. Letourneur, A. Meddahi-Pellé, et M. M. Giraud-Guille. 2010. « Concentrated collagen hydrogels as dermal substitutes ». *Biomaterials* 31 (3): 481-90.

Helary, C., Al.e Foucault-Bertaud, G. Godeau, B. Coulomb, et M. M. Giraud Guille. 2005. « Fibroblast populated dense collagen matrices: cell migration, cell density and metalloproteinases expression ». *Biomaterials* 26 (13): 1533-43.

Hodge A.J., et Petruska J.A. 1963. « Recent studies with the electron microscope on ordered aggregates of the tropocollagen molecule ». *Aspects of protein structure*, 289-300.

Holmes D. F., C. J. Gilpin, C. Baldock, U. Ziese, A. J. Koster, et K. E. Kadler. 2001. « Corneal collagen fibril structure in three dimensions: structural insights into fibril assembly, mechanical properties, and tissue organization ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (13): 7307-12.

Horton W.A. 1993. « Morphology of connective tissue: cartilage ». In Connective Tissue and its Heritable Disorders. Molecular, Genetic, and Medical Aspects, 73-84, Wiley - Liss, Inc.

Hukins D. W. L., et J. Woodhead-Galloway. 1978. « Liquid-crystal model for the organization of molecules in collagen fibrils ». *Biochemical Society Transactions* 6 (1): 238-39.

Hulmes, David J. S. 2002. « Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures ». *Journal of Structural Biology* 137 (1): 2-10.

Hulmes, D.J.S. 2008. « Collagen diversity, synthesis and assembly ». In *Collagen: Structure and Mechanics*, édité par Peter Fratzl, 15-47. Boston, MA: Springer US.

Jäger, I. et P. Fratzl. 2000. « Mineralized collagen fibrils: a mechanical model with a staggered arrangement of mineral particles ». *Biophysical Journal* 79 (4) : 1737-46.

Juster, M., Oligo, N. et Laval-Jeantet M. 1967 « Liseré préosseux et tissu ostéoïde ». In L'Ostéomalacie. Edité par D. J. Hioco. Masson & Cie. Paris.

Karaplis A. C. 2002. « Chapter 3 - Embryonic development of bone and the molecular regulation of intramembranous and endochondral bone formation ». In *Principles of Bone Biology (Second Edition)*, édité par John P. Bilezikian, Lawrence G. Raisz, et Gideon A. Rodan, 33-IV. San Diego: Academic Press.

Karsenty G., H. M. Kronenberg, et C. Settembre. 2009. « Genetic control of bone formation ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25 (1): 629-48.

Karsenty G., et E. F. Wagner. 2002. « Reaching a Genetic and Molecular Understanding of Skeletal Development ». *Developmental Cell* 2 (4): 389-406.

Knight, D. P., L. Nash, X. W. Hu, J. Haffegee, et M.-W. Ho. 1998. « In vitro formation by reverse dialysis of collagen gels containing highly oriented arrays of fibrils ». *Journal of Biomedical Materials Research* 41 (2): 185-91.

Koike-Tani M, T. Tani, S. B. Mehta, A. Verma, et R. Oldenbourg. 2015. « Polarized light microscopy in reproductive and developmental biology ». *Molecular Reproduction and Development* 82 (7-8): 548-62.

Lama M., F. M. Fernandes, A. Marcellan, J. Peltzer, M. Trouillas, S. Banzet, M. Grosbot, et al. 2020. « Self-assembled collagen microparticles by aerosol as a versatile platform for injectable anisotropic materials ». *Small* 16 (4): 1902224.

Landis, William J. 1986. « A study of calcification in the leg tendons from the domestic turkey ». *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research* 94 (3): 217-38.

Legros, R., N. Balmain, et G. Bonel. 1987. « Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone ». *Calcified Tissue International* 41 (3) : 137-44.

Lehmann, O. 1909. « Les cristaux liquides ». *Journal de Physique Théorique et Appliquée* 8 (1) : 713-35.

Livolant F., et Bouligand Y. 1978. «New observations on the twisted arrangement of Dinoflagellate chromosomes». Chromosoma68 (1): 21-44.

Livolant, F. 1986. « cholesteric liquid crystalline phases given by three helical biological polymers: dna, pblg and xanthan. a comparative analysis of their textures ». *Journal de Physique* 47 (9): 1605-16.

Livolant, F., et Y. Bouligand. 1986. « Liquid crystalline phases given by helical biological polymers (DNA, PBLG and xanthan). columnar textures ». *Journal de Physique* 47 (10): 1813-27.

Livolant, F., et Y. Bouligand. 1989. « Freeze-fractures in cholesteric mesophases of polymers ». *Molecular Crystals and Liquid Crystals Incorporating Nonlinear Optics* 166 (1): 91-100.

Livolant, F., A. M. Levelut, J. Doucet, et J. P. Benoit. 1989. « The highly concentrated liquid-crystalline phase of DNA is columnar hexagonal ». *Nature* 339 (6227): 724-26.

Mackie, E. J., Y. A. Ahmed, L. Tatarczuch, K. -S. Chen, et M. Mirams. 2008. « Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (1): 46-62.

Manolagas S. C. 2000. « Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis ». *Endocrine Reviews* 21 (2) : 115-37.

Marie P. 2001. « Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste ». *Médecine/sciences* 17 (12): 1252-59.

McCalden, R. W., J. A. McGeough, M. B. Barker, et C. M. Court-Brown. 1993. « Age-related changes in the tensile properties of cortical bone. the relative importance of changes in porosity, mineralization, and microstructure ». *Journal of Bone and Joint Surgery* 75 (8): 1193–1205.

Mehta S. B., M. Shribak, et R. Oldenbourg. 2013. « Polarized light imaging of birefringence and diattenuation at high resolution and high sensitivity ». *Journal of Optics* 15 (9): 094007.

Misof, K., W. J. Landis, K. Klaushofer, et P. Fratzl. 1997. « Collagen from the osteogenesis imperfecta mouse model (Oim) shows reduced resistance against tensile stress ». The Journal of Clinical Investigation 100(1):40-45.

Mitov M. 1998. « Les cristaux liquides, Collection Que sais-je ? » Que sais-je, n°1296

Mitov M. 2010. Matière sensible. Mousses, gels, cristaux liquides et autres miracles. Edition du Seuil.

Mitov M. 2017. « Cholesteric liquid crystals in living matter ». *Soft Matter* 13 (23): 4176-4209.

Mo, C., et J. R. Raney. 2020. « Spatial programming of defect distributions to enhance material failure characteristics ». *Extreme Mechanics Letters* 34 (janvier): 100598.

Moreira C. A., D. W. Dempster, et R. Baron. 2000. « Anatomy and ultrastructure of bone – histogenesis, growth and remodeling ». In *Endotext*, édité par K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. W. de Herder, K. Dungan, A. Grossman, *et al.* South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.

Mosser G., A. Anglo, C. Helary, Y. Bouligand, et M.-M. Giraud-Guille. 2006. « Dense tissue-like collagen matrices formed in cell-free conditions ». *Matrix Biology* 25 (1): 3-13.

Myllyharju J. 2005. « Intracellular post-translational modifications of collagens ». In *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly*, édité par J. Brinckmann, H. Notbohm, et P. K. Müller, 115-47. Topics in Current Chemistry. Berlin, Heidelberg: Springer.

Nageotte, J. 1927. « Fibrillous coagulation in vitro of Collagen dissolved in dilute acid ». *Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Paris*. 184 (115).

Narducci P., R. Bareggi, et Va. Nicolin. 2011. « Receptor activator for nuclear factor kappa b ligand (rankl) as an osteoimmune key regulator in bone physiology and pathology ». *Acta Histochemica* 113 (2): 73-81.

Nassif, N., F. Gobeaux, J. Seto, E. Belamie, P. Davidson, P. Panine, G. Mosser, P. Fratzl, et M.-M. Giraud Guille. 2010. « Self-assembled collagen−apatite matrix with bone-like hierarchy ». *Chemistry of Materials* 22 (11): 3307-9.

Nong Z., C. O'Neil, M. Lei, R. Gros, A. Watson, A. Rizkalla, K. Mequanint, *et al.* 2011. « Type I collagen cleavage is essential for effective fibrotic repair after myocardial infarction ». *The American Journal of Pathology* 179 (5): 2189-98.

Oldenbourg R. 2013. « Polarized light microscopy: principles and practice ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2013 (11): 078600.

Opperman L. A. 2000. « Cranial sutures as intramembranous bone growth sites ». *Developmental Dynamics* 219 (4): 472-85.

Olszta, M. J., X. Cheng, S. S. Jee, R. Kumar, Y.-Y. Kim, M. J. Kaufman, E. P. Douglas, et L. B. Gower. 2007. « Bone structure and formation: a new perspective ». *Materials Science and Engineering Reports* 58 (3): 77-116.

Oswald, P., et Pieranski P. 2000. « Les cristaux liquides : concepts et propriétés physiques illustrés des expériences, Tome 1 ». *Gordon and Breach Science Publishers*.

Parfitt A.M. 1990. « Bone-forming cells in clinical conditions ». *Bone* 1: 351-429.

Parfitt A.M. 1993. « Morphometry of bone resorption: introduction and overview ». *Bone* 14 (3): 435-41.

Parfitt, A. M. 1994. « Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone ». *Journal of Cellular Biochemistry* 55 (3): 273-86.

Parfitt, A. M. 2001. « Chapter 15 - Skeletal heterogeneity and the purposes of bone remodeling: implications for the understanding of osteoporosis ». In *Osteoporosis (Second Edition)*, édité par R. Marcus, D. Feldman, et J. Kelsey, 433-47. San Diego: Academic Press.

Parfitt, A. M. 2002. « Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression ». *Bone* 30 (1): 5-7.

Parfitt A. M. 2008. « Skeletal heterogeneity and the purposes of bone remodeling: implications for the understanding of osteoporosis ». In *Osteoporosis*, ed. R Marcus, D Feldman, DA Nelson, CJ Rosen, pp. 71–92. San Diego: Elsevier

Provot S., et E. Schipani. 2005. « Molecular mechanisms of endochondral bone development ». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vertebrate Skeletal Biology, 328 (3): 658-65.

Poole A. R. 1991. « The growth plate: cellular physiology, cartilage assembly and mineralization ». In *Cartilage: Molecular Aspects*, ed. BK Hall, SA Newman, pp. 179–211. Boca Raton, FL: CRC

Reinitzer F. 1888. « Beiträge zur kenntniss des cholesterins ». *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly* 9 (1): 421-41.

Raina V. 1972. « Normal Osteoid Tissue ». *Journal of Clinical Pathology* 25 (3): 229-32.

Revol, J. -F., et R. H. Marchessault. 1993. « In vitro chiral nematic ordering of chitin crystallites ». *International Journal of Biological Macromolecules* 15 (6): 329-35.

Reznikov N., M. Bilton, L. Lari, M. M. Stevens, et R. Kröger. 2018. « Fractal-like hierarchical organization of bone begins at the nanoscale ». *Science* 360 (6388).

Reznikov N., R. Shahar, et S. Weiner. 2014. « Bone hierarchical structure in three dimensions ». *Acta Biomaterialia*, Biomineralization, 10 (9): 3815-26.

Reznikov, N., R. Shahar, et S. Weiner. 2014. « Three-dimensional structure of human lamellar bone: the presence of two different materials and new insights into the hierarchical organization ». *Bone*, 59 (février): 93-104.

Rieu C., N. Rose, A. Taleb, G. Mosser, B. Haye, T. Coradin, F. Le Grand, et L. Trichet. 2020. « Differential myoblast and tenoblast affinity to collagen, fibrin and mixed threads in the prospect of muscle-tendon junction modelisation ». *Bioengineering.*

Riggs, B. L., et A. M. Parfitt. 2005. « Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling ». *Journal of Bone and Mineral Research* 20 (2): 177-84.

Robin, M. 2016. « Etude du front de minéralisation du tissu osseux et des modèles biomimétiques associés ». Chimie thérapeutique. Université Pierre et Marie Curie – Paris VI. Français. NNT : 2016PA066635. Tel-01907278v2.

Robin, M., C. Almeida, T. Azaïs, B. Haye, C. Illoul, J. Lesieur, M.-M. Giraud-Guille, N. Nassif, et C. Hélary. 2016. « Involvement of 3D osteoblast migration and bone apatite during in vitro early osteocytogenesis ». *Bone* 88 (juillet): 146-56.

Rosin Nicole L., N. Agabalyan, K. Olsen, G. Martufi, V. Gabriel, J. Biernaskie, et E. S. Di Martino. 2016. « Collagen structural alterations contribute to stiffening of tissue after split-thickness skin grafting ». *Wound Repair and Regeneration* 24 (2): 263-74.

Rossert J., et B. de Crombrugghe. 2002. « Chapter 12 - Type I collagen: structure, synthesis, and regulation ». In *Principles of Bone Biology (Second Edition)*, édité par J. P. Bilezikian, Lawrence G. Raisz, et Gideon A. Rodan, 189-XVIII. San Diego: Academic Press.

Salameh C., F. Salviat, E. Bessot, M., J.-M. Chassot, E. Moulongui, Y. Wang, et al. 2020. « Origin of transparency in scattering biomimetic collagen materials ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (22): 11947-53.

Schaffler, M. B., D. B. Burr, et R. G. Frederickson. 1987. « Morphology of the osteonal cement line in human bone ». *The Anatomical Record* 217 (3): 223-28.

Schaffler M. B., et D. B. Burr. 1988. « Stiffness of compact bone : effects of porosity and density ». *Journal of Biomechanics* 21 (1): 13-16.

Semyari, H., M. Salehi, F. Taleghani, A. Ehterami, F. Bastami, T. Jalayer, H. Semyari, M. H. Nabavi, et H. Semyari. 2018. « Fabrication and characterization of collagen–hydroxyapatite-based composite scaffolds containing doxycycline via freeze-casting method for bone tissue engineering ». *Journal of Biomaterials Applications* 33 (4): 501-13.

Shribak M., et R. Oldenbourg. 2003. « Techniques for fast and sensitive measurements of two-dimensional birefringence distributions ». *Applied Optics* 42 (16): 3009.

Sims N. A., et J.H. Gooi. 2008. « Bone remodeling: multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Bone Remodelling, 19 (5): 444-51.

Sims N. A, et T. J. Martin. 2014. « Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit ». *Bone Key Reports* 3.

Skedros J.G., Holmes J.L., Vajda E.G., et Bloebaum R.D. 2005. « Cement lines of secondary osteons inhuman bone are not mineral-deficient: new data in a historical perspective ». *The Anatomical Record Part A Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology* 286 (1): 781‑803.

Tani T., M. Shribak, et R. Oldenbourg. 2016. « Living cells and dynamic molecules observed with the polarized light microscope: the legacy of shinya inoué ». *The Biological Bulletin* 231 (1) : 85-95.

Vernejoul, Mc, et P Marie. 1993. « Cellules osseuses et remodelage osseux. » *Médecine/sciences* 9 (11) : 1192.

Virchow R. 1851. « Die Identität von Knochen-, Knorpel-und Bindegewebs-körperchen, sowie über Schleimgewebe ». *Verh. physik. -med. Ges. Würzburg2*, 150-62.

Virchow R. 1854. « Uber das ausgebreitete Vorkommen einer dem Nervenmark analogen Substanz in den thierischen Geweben ». *Virchows Archiv* 6 (4): 562-72.

Volterra V. 1907. « Sur l'équilibre des corps élastiques multiplement connexes ». *Annales scientifiques de l'École normale supérieure* 24 : 401-517.

Von Euw S., Wang Y., Laurent G., Drouet C., Babonneau F., Nassif N., et Azaïs T. 2019. « Bone mineral: new insights into its chemical composition ». *Scientific Reports* 9 (1): 1-11.

Wang Y. 2012. « Elaboration de modèles collagène/apatite pour l'étude de la biominéralisation du tissu osseux ». Matériaux. Université Pierre et Marie Curie – Paris VI. Français. NNT : 2012PAO66484. Tel-00839469.

Wang Y., T. Azaïs, M. Robin, A. Vallée, C. Catania, P. Legriel, G. Pehau-Arnaudet, F. Babonneau, M.-M. Giraud-Guille, et N. Nassif. 2012. « The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite ». *Nature Materials* 11 (8): 724-33.

Wang Y., J. Silvent, M. Robin, F. Babonneau, A. Meddahi-Pellé, N. Nassif, et M. M. Giraud Guille. 2011. « Controlled collagen assembly to build dense tissue-like materials for tissue engineering ». *Soft Matter* 7 (20): 9659-64.

Weidenreich F. 1930. Das Knochengewebe. Dans : Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Berlin: Springer.

Weiner, S., et H. D. Wagner. 1998. « The material bone: structure-mechanical function relations ». *Annual Review of Materials Science* 28 (1): 271-98.

Weinkamer R., C. Eberl, et Peter Fratzl. 2019. « Mechanoregulation of bone remodeling and healing as inspiration for self-repair in materials ». *Biomimetics* 4 (3): 46.

Whitehouse, W J, et E D Dyson. 1974. « Scanning electron microscope studies of trabecular bone in the proximal end of the human femur. » *Journal of Anatomy* 118 (Pt 3) : 417-44.

Wood, G. C., et M. K. Keech. 1960. « The formation of fibrils from collagen solutions 1. the effect of experimental conditions: kinetic and electron-microscope studies ». *Biochemical Journal* 75 (3): 588-98.

Woodhead-Galloway J. 1982. « Collagen: the anatomy of a protein ». *The Institute of Biology's Studies in Biology* 117: 64.

Zachariades P.A. 1900. « Recherches sur la structure du tissue conjonctif, sensibilité du tendon aux acides ». *Inst. Biol. Stud. Biol.* 117: 64.

Zou Z., T. Tang, E. Macías-Sánchez, S. Sviben, W. J. Landis, L. Bertinetti, et P. Fratzl. 2020. « Three-dimensional structural interrelations between cells, extracellular matrix, and mineral in normally mineralizing avian leg tendon ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (25): 14102-9.

Chapitre 2 : Contexte, objectif et construction acellulaire des modèles osseux biomimétiques : la problématique du confinement

Tables des matières du Chapitre 2

Chapitre 2 : Contexte, objectif et construction acellulaire des modèles osseux biomimétiques : la problématique du confinement 93

I. Modèles biomimétiques osseux de matrices denses de collagène et collagène/apatite 95

II. Hypothèse de travail et structures visées de l'os cortical et l'os trabéculaire 99

III. Preuves de concept du confinement et étude de l'influence du flux sur l'orientation du collagène 107

1. Effet du confinement sur l'organisation tridimensionnelle du collagène 109
2. Effet du flux sur l'organisation tridimensionnelle du collagène 114

IV. Conclusion 119

Références bibliographiques **120**

L'objectif est ici de comprendre le concept d'un probable effet de confinement sur l'état cristal-liquide du collagène dans la formation des architectures osseuses *in vitro* et de pouvoir faire des analogies avec de possibles mécanismes « opérant » *in vivo*. Par confinement, on entend ici de reproduire les forces de cisaillement qui s'appliquent *in vivo* dans le tissu osseux en reproduisant les ordres de grandeur caractéristiques des différentes unités du tissu biologique. Si ce concept de confinement paraît simple, nous le verrons, il est complexe de maîtriser les différents paramètres expérimentaux pour « monter » des modèles pertinents. Ainsi, ce chapitre me permet également de montrer quels sont les autres paramètres sur lesquels je me suis appuyée pour construire ces matériaux plus sophistiqués.

I. Modèles biomimétiques osseux de matrices denses de collagène et collagène/apatite

Comme nous l'avons expliqué dans le **Chapitre 1**, les méthodes de synthèse des matrices de collagène denses de la littérature ne permettaient pas la mise en place de matériaux 3D homogènes en taille de fibrilles et en concentration finale de collagène.

Avant de présenter les résultats proprement dit des matériaux obtenus comme modèles, il m'a semblé important de présenter les résultats qui avaient été obtenus lorsque j'ai intégré le laboratoire (Wang *et al.* 2011 ; Wang *et al.* 2012) et le contexte dans lequel ce travail a été proposé et construit.

Par le biais du procédé de dialyse inverse/injection continue, des matrices denses de collagène (250 mg/mL) ont été préparées à partir d'une solution acido-soluble de collagène faiblement concentrée (1 mg/mL). Les observations en lumière polarisée permettent de mettre en évidence la formation de larges domaines anisotropes de l'organisation 3D des fibrilles de collagène au sein de la matrice, caractéristiques d'un ordre à grande distance (*Figure 1A*). L'observation par MEB d'une matrice fracturée obliquement met en évidence une organisation cholestérique sur une centaine de micromètres (*Figure 1B, C et D*) au-delà des échelles obtenues jusqu'ici dans la littérature. Les observations au MET montrent une distribution homogène de la taille des fibrilles sur l'ensemble de la matrice (*Figure 1E*) comparable à celle décrite dans le tissu osseux.

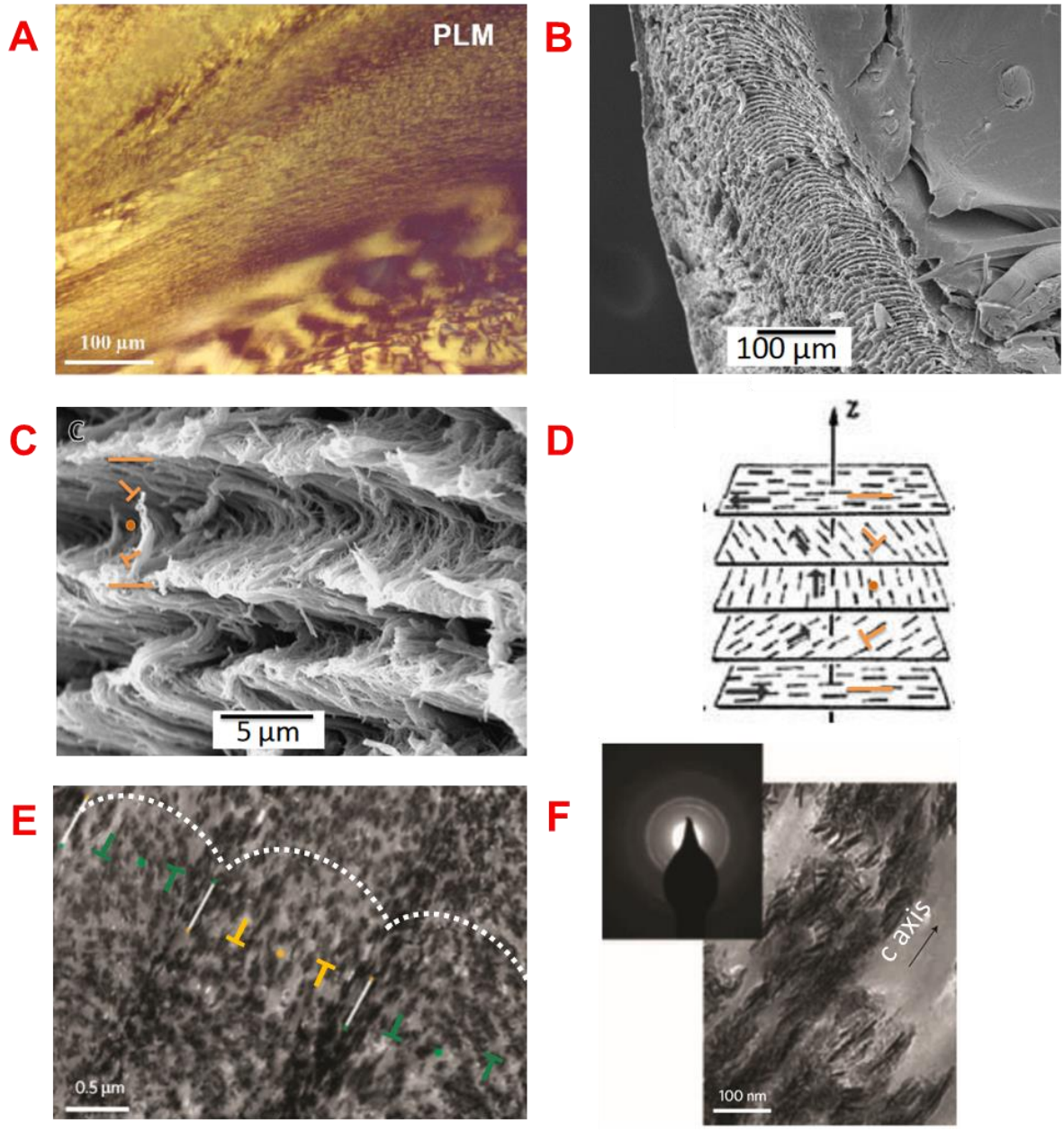


Figure 1 : (A) Cliché en MOLP d'une matrice à 250 mg/ml synthétisée par injection continue/dialyse inverse où sont observées des textures de biréfringence révélant des organisations fibrillaires différentes. (B) Clichés en MEB de la section de la matrice révélant l'organisation cholestérique et (C) à plus fort grandissement, une homogénéité dans le diamètre des fibrilles. (D) Représentation schématique de l'arrangement des fibrilles de collagène dans l'organisation cholestérique. (E) Cliché en MET d'une coupe ultrafine non contrastée d'une matrice de collagène minéralisée révélant la structure en arceaux. Le contraste est donné par le minéral. (F) Cliché en MET mettant en évidence l'alignement des plaquettes d'hydroxyapatite le long de l'axe c des fibrilles de collagène. Reproduit et modifié de Wang et al. 2012.

A la suite de ces travaux, dans le contexte de synthèse de matrices biomimétiques du tissu osseux, la phase minérale d'hydroxyapatite a été associée à la phase organique de fibrilles de collagène de type I. Pour cela, une synthèse de phosphate de calcium avait été développée au laboratoire, à partir d'une solution acide de précurseurs minéraux ioniques de l'hydroxyapatite qui précipitent par diffusion de vapeurs d'ammoniaque (Nassif *et al.* 2010) (*Figure 2*). Ces cristaux de phosphate de calcium présentent l'avantage de posséder les mêmes propriétés morphologiques et structurales que celles du tissu osseux en solution aqueuse (*e.g.* auto-assemblage) (Wang *et al.* 2013 ; Von Euw *et al.* 2019).

En associant les précurseurs ioniques acides de phosphate de calcium à la solution acido-soluble de collagène dans le procédé de dialyse inverse/ injection continue, il a été prouvé qu'après remontée de pH par diffusion de vapeurs d'ammoniaque, le collagène et les précurseurs d'HA co-précipitent. Les observations en MET démontrent que deux caractéristiques de la microstructure du tissu osseux ont été reproduites : la présence d'une structure en arceaux (*Figure 1E*) qui témoigne d'une organisation cholestérique au sein de la matrice et la présence des cristaux d'HA qui sont co-alignés le long de l'axe principal des fibrilles (*Figure 1F*).

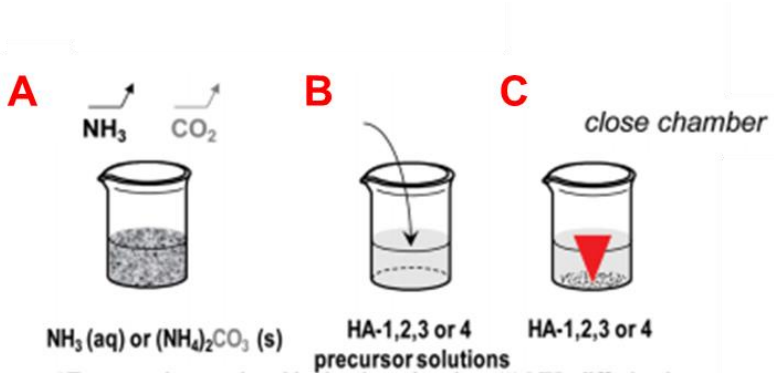


Figure 2 : Schéma du procédé de précipitation d'hydroxyapatite par diffusion de vapeurs. Les échantillons sont placés dans un bécher scellé avec du parafilm. (1) la diffusion de vapeurs d'ammoniac est induite par la décomposition d'une solution aqueuse d'ammoniaque en $NH_3(g)$ et $CO_2(g)$. (2) Solubilisation de $NH_3(g)$ (et $CO_2(g)$) dans les solutions de précurseurs d'HA et solutions de collagène acides. (3) Précipitation de HA. Reproduit de Nassif 2010.

Ces résultats ont permis de mettre en évidence le rôle de l'organisation tridimensionnelle de la phase organique des biopolymères sur la phase minérale (structure et orientation) dans la MEC du tissu osseux. Cette organisation tridimensionnelle correspond au niveau IX de l'organisation hiérarchique de l'os présentée dans le chapitre précédent.

Cette organisation se retrouve de manière aléatoire au sein de la matrice et correspond au niveau IX selon la proposition d'organisation hiérarchique dans le tissu osseux faite dans la littérature (Reznikov *et al.* 2018). De plus, les domaines cholestériques coexistent avec des plages d'alignements et isotropes (*Figure 3*). Ainsi, il est apparu intéressant de mettre en place une nouvelle méthode pour contrôler la formation de ces domaines anisotropes spatialement à l'échelle suprafibrillaire. **C'est dans ce contexte que ma thèse s'est inscrite**. **Nous avons fait l'hypothèse qu'une synthèse acellulaire de tels matériaux était possible**. Nous avons établi des modèles permettant de déterminer les paramètres physico-chimiques impliqué dans l'organisation suprafibrillaire afin de pouvoir contrôler la formation et la disposition des domaines anisotropes biomimétiques de l'os. Ces modèles permettront de pouvoir atteindre des niveaux hiérarchiques plus élevés, et ainsi de pouvoir reproduire les unités caractéristiques des différents tissus osseux (ostéons et trabécules).

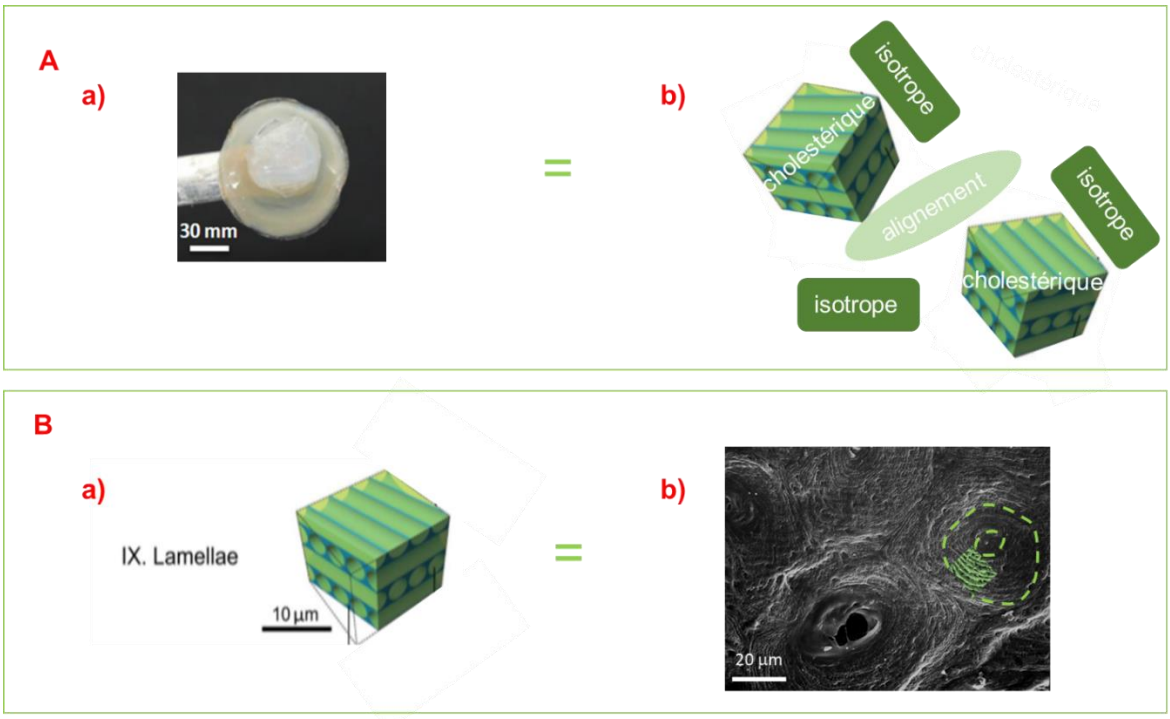


Figure 3 : (A) a) Photo d'une matrice dense de collagène synthétisée par dialyse inverse/injection continue, reproduit de Wang et al. 2011, et b) représentation schématique des différents domaines d'organisation au sein de la matrice. Reproduit et modifié de Reznikov et al. 2018. (B) a) Représentation schématique du niveau IX de l'organisation hiérarchique de l'os. Reproduit de Reznikov et al. 2018, et b) illustration du niveau IX sur un cliché en MEB d'un os compact partiellement décalcifié. Reproduit et modifié de Giraud-Guille et al. 2003.

Pour cela, il a fallu d'abord comprendre les différences et les similarités structurales des tissus osseux compacts et spongieux. Cette analyse est décrite dans la partie suivante.

II. Hypothèse de travail et structures visées de l'os cortical et l'os trabéculaire

Comme décrit dans le chapitre précédent, l'os est un matériau hybride composé d'une matrice organique dense et organisée de fibrilles de collagène de type I et d'un réseau de nanoparticules d'hydroxyapatite non-stœchiométrique. A l'échelle de notre étude, l'unité de base est le contre-plaqué torsadé (*i.e.* twisted plywood). En effet, cette unité de base se retrouve à la fois dans l'os cortical et l'os trabéculaire où respectivement elle s'organise de façon concentrique dans l'ostéon ou de façon linéaire le long de la trabécule comme schématisé dans la *Figure 4* qui suit.

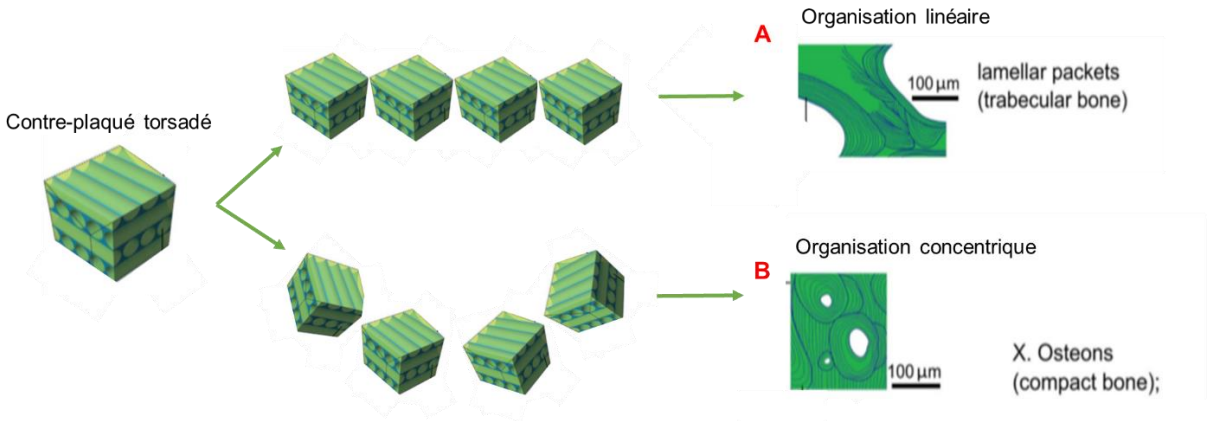


Figure 4 : Organisation du contre-plaqué torsadé de façon (A) linéaire dans l'os trabéculaire et (B) concentrique dans l'os cortical. Reproduit et modifié d'après Reznikov et al. 2018.

C'est en réalité plus complexe car il y a une continuité entre les domaines anisotropes et, à un niveau d'organisation supérieure, une association et une orientation des structures lamellaires nécessaire à la construction du tissu osseux. Cela est illustré pour l'os trabéculaire (*Figure 5A*) et l'os cortical (*Figure 5B*) dans la figure qui suit.

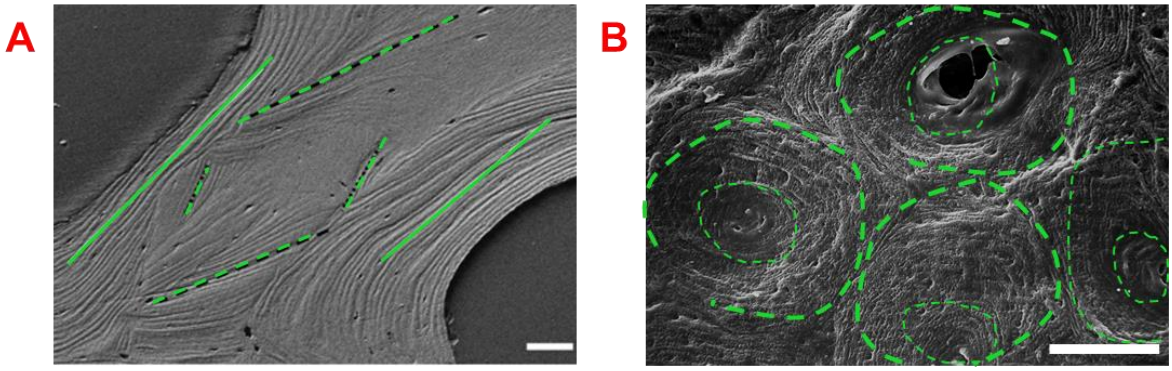


Figure 5 : Organisation du contre-plaqué torsadé dans l'os cortical et l'os trabéculaire (A) Cliché en MEB d'une trabécule osseuse montrant les différentes orientations des lamelles osseuses (barre d'échelle = 40 µm). Reproduit de Reznikov et al. 2015. (B) Cliché en MEB d'une fracture oblique d'un os cortical humain. Les lamelles osseuses s'organisent de façon concentrique autour des canaux de Havers (barre d'échelle = 100 µm). Reproduit de Giraud-Guille 2003.

La formation de cette architecture est complexe et est encore étudiée dans la littérature (Karsenty 2009). Il est néanmoins décrit qu'elle serait contrôlée grâce à l'activité cellulaire. On sait que les ostéoblastes sécrètent la matrice ostéoïde riche en collagène, qui se minéralise au cours du temps. Il est proposé, comme décrit dans le **Chapitre 1**, qu'ils effectueraient une rotation après chaque dépôt de plan fibrillaire pour former l'architecture en contre-plaqué torsadé (Bidan *et al.* 2016 ; Yamamoto *et al.* 2012) (*Figure 6*). Le pas du contre-plaqué correspond à une rotation de 360° selon l'axe hélicoïdal. Or, les ostéoblastes forment un tapis cellulaire en 2D à la surface du tissu osseux. Ainsi, cela impliquerait que les ostéoblastes de façon périodique arrêtent leurs jonctions intercellulaires systématiquement afin d'assurer leur cycle de rotation. Ainsi, nous pensons qu'un tel mécanisme peut être remis en question sur une telle épaisseur de tissu *in vivo*.

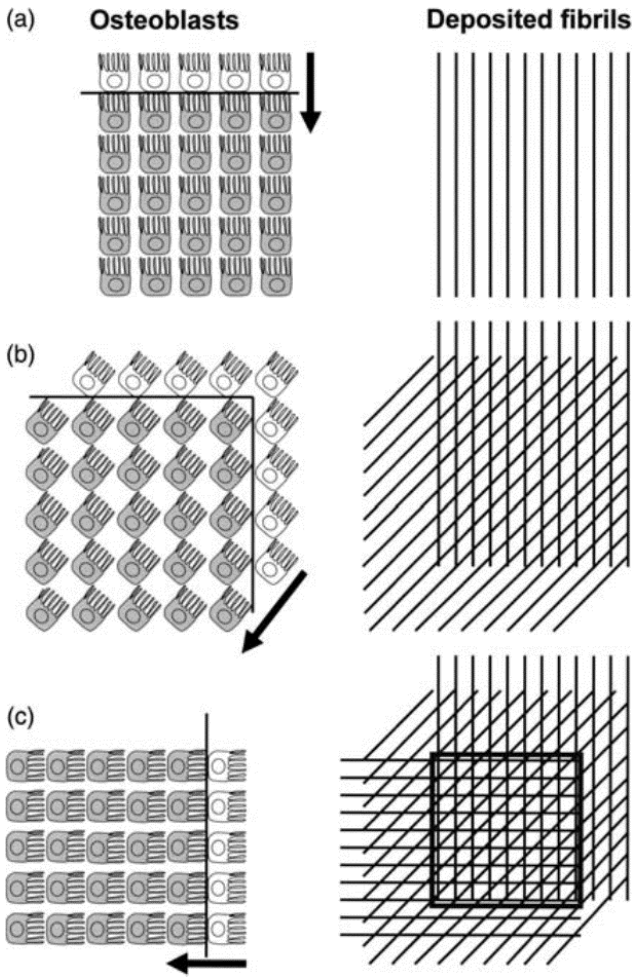


Figure 6 : Schéma représentant la rotation périodique des ostéoblastes pour former le contre-plaqué torsadé. (a) les ostéoblastes migrant dans une direction privilégiée, les fibrilles de collagène sont déposées de manière à être orientée de la même façon lors du premier dépôt, (b) les ostéoblastes effectuent une rotation, les fibrilles de collagène sont déposées selon une nouvelle direction dans ce nouveau plan, et (c) les ostéoblastes effectuent de nouveau une rotation et les fibrilles de collagène déposées forment une demi-période du contre-plaqué torsadé. Reproduit de Yamamoto et al. 2012.

Notre hypothèse est que la formation d'une telle organisation est régie par un contrôle cellulaire très localement mais est établi grâce à des phénomènes physico-chimiques (*i.e.* auto-assemblage sous confinement) à l'échelle suprafibrillaire.

Avant de présenter comment nous avons construit nos modèles expérimentaux, il était d'abord nécessaire d'identifier les caractéristiques structurales des tissus modèles visés. Nous avons tout d'abord observé des échantillons témoins d'os cortical et d'os trabéculaire de brebis, dont l'organisation suprafibrillaire est similaire à celle de l'os humain (Nunamaker 1998). Bien que connu dans la littérature, nous avons faits nos propres observations de coupes histologiques par microscopie optique à lumière polarisée (MOLP) afin d'identifier les textures de biréfringence des organisations tridimensionnelles des fibrilles de collagène du tissu visé (*Figure 7*).

Comme décrit dans la littérature, dans l'os trabéculaire, une alternance de bandes sombres et claires est observée le long des travées, qui révèle une texture cholestérique (*Figure 7A, A' et A''*). Dans l'os cortical, cette alternance de bandes sombres et claires se retrouve également au sein du tissu de façon concentrique autour des canaux de Havers (*Figure 7B, B' et B''*). Cette texture est typique d'une organisation en contre-plaqué torsadé des fibrilles de collagène dans le tissu (Reznikov *et al.* 2015 ; Giraud-Guille 1988 ; Giraud-Guille 2003 ; Reid 1986).

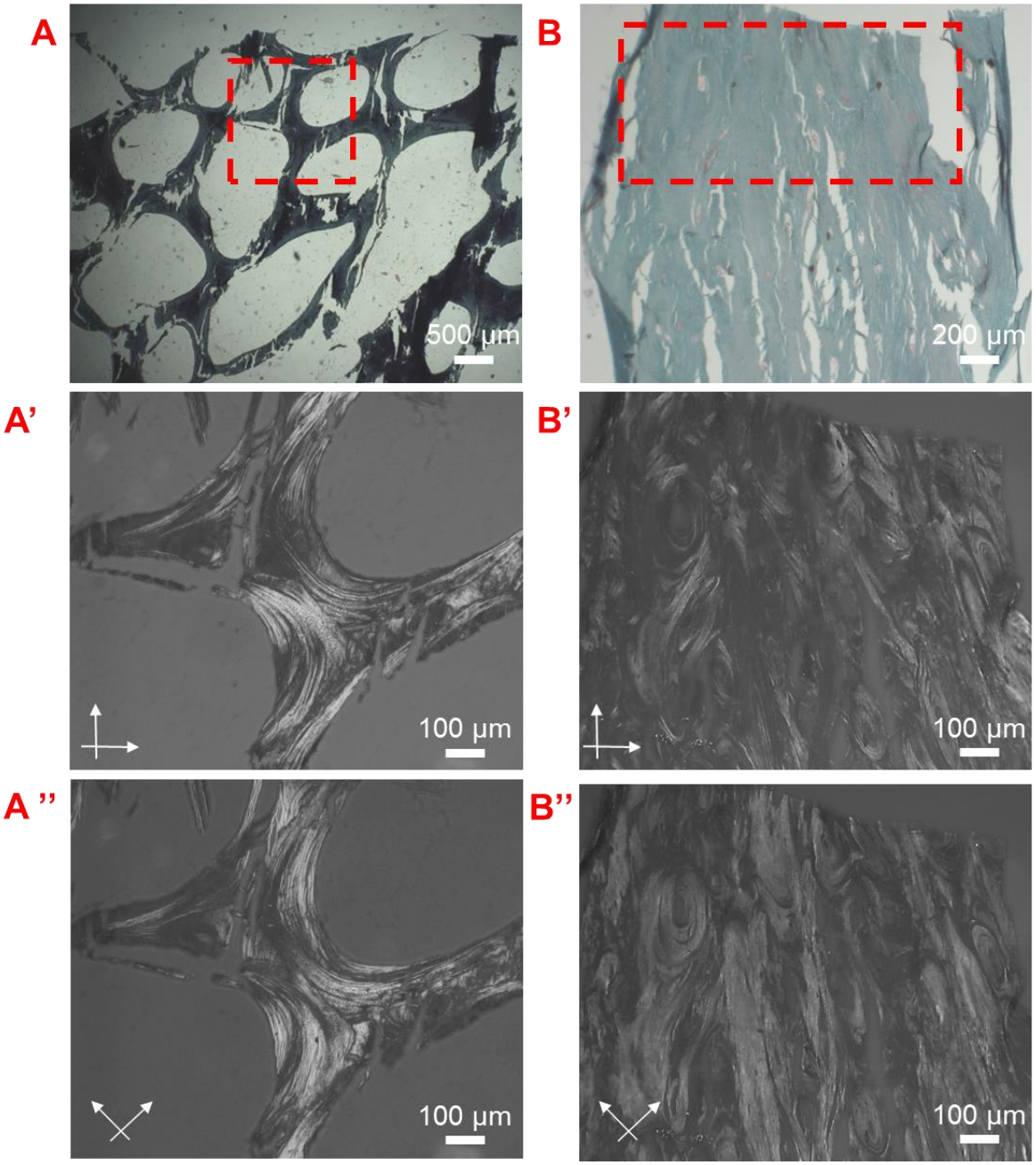


Figure 7 : Clichés par microscopie optique (MO) de coupes histologiques d'os cortical (A) et d'os trabéculaire (B) contrastées au trichrome de Masson (barre d'échelle 500 µm (A) et 200 µm (B)). Textures de biréfringence observées par MOLP des zones encadrées de (A) et (B) : (A') (A'') L'alternance de bandes sombres et claires le long des travées entre les deux positions des polariseurs croisés sont caractéristiques d'une organisation cholestérique (barre d'échelle 100 µm). (B') (B'') L'alternance de bandes sombres et claires, qui s'organisent de façon concentrique autour du canal de Havers, entre les deux positions des polariseurs croisés sont caractéristiques d'une organisation cholestérique (barre d'échelle 100 µm).

Néanmoins, soulignons que les textures observées paraissent plus complexes lorsque le plan de coupe n'est pas entre autres parfaitement transverse à l'axe cholestérique (*Figure 8*). Les observations dépendent également du plan où a été effectuée la coupe. A cela s'ajoute les artéfacts de coupes lorsque l'on observe les structures fibrillaires. Ces points ont été importants lors de l'observation des différentes organisations dans nos modèles afin d'identifier les plans de coupe. Notons que pour la *Figure 8D*, seul le schéma central correspond à l'observation en lumière polarisée d'une organisation cholestérique.

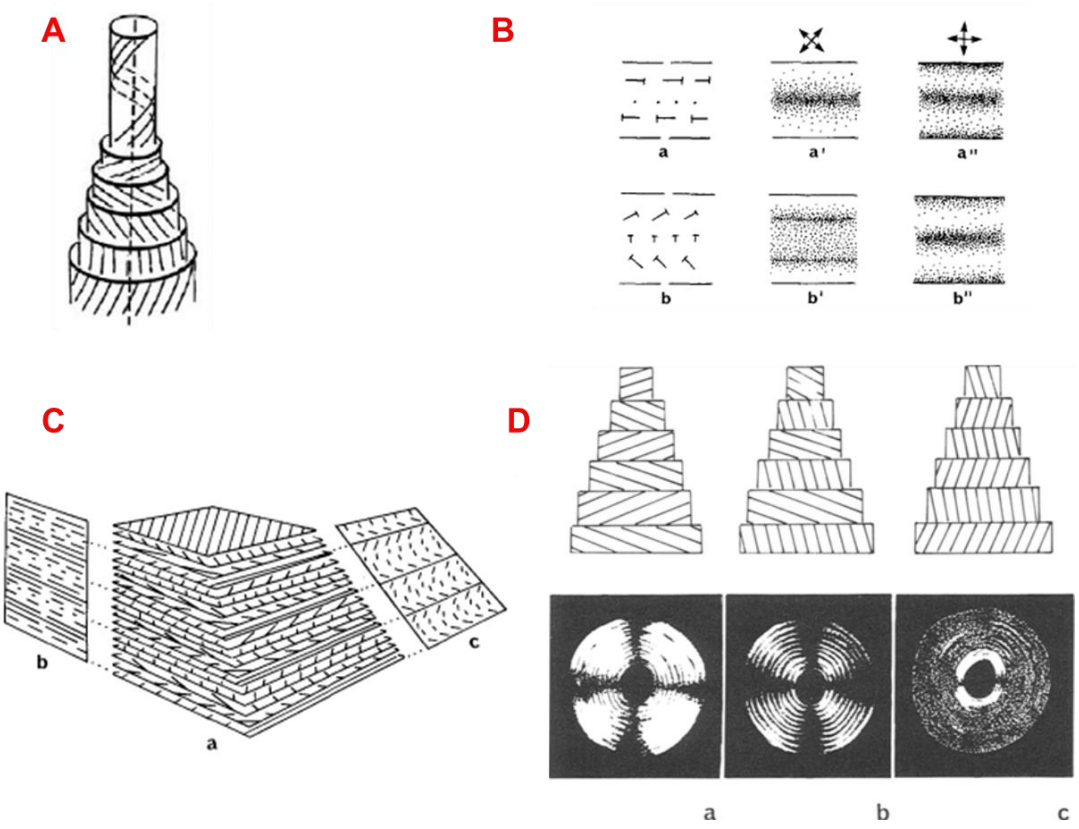


Figure 8 : Représentations schématiques de l'orientation fibrillaire au sein de l'ostéon montrant le changement régulier de l'orientation des fibrilles de collagène (A) ; de l'observation en lumière polarisée résultante du contre-plaqué torsadé (B) suivant un plan de transverse (a, a', a'') ou oblique (b, b', b'') ; du modèle du contre-plaqué torsadé (C), chaque plan indique la rotation progressive de l'orientation des fibrilles, et suivant le plan de coupe, transverse (b) ou oblique (c), l'observation des fibrilles est respectivement une alternance points/segments et des arceaux ; des trois différents types d'ostéons (D) (clair (a), intermédiaire (b) et sombre (c)) observés en coupe oblique en lumière polarisée . (A) Reproduit de Giraud-Guille 1998 et (B), (C), (D) Reproduits de Giraud-Guille 1988.

Bien que le passage par un état cristal-liquide des molécules de collagène n'a jamais encore été démontré *in vivo*, nous avons vu que les molécules de collagène possèdent des propriétés lyotropes *in vitro* (**Chapitre 1**). Ainsi, si cet état existe *in vitro* et est précurseur à l'état fibrillaire adoptant une architecture en contre-plaqué torsadé décrite par Bouligand (Bouligand 2008), alors différents facteurs tels que notamment, les effets de cisaillement, peuvent influencer l'auto-assemblage des molécules de collagène, et donc la phase résultante observée.

Or, *in vivo* l'os est traversé par les différents canaux (*i.e.* Havers et Volkmann) et vaisseaux qui permettent son irrigation et par les nerfs qui permettent son innervation. Cette vascularisation est notamment nécessaire lors du remodelage osseux (Lafarge-Proust *et al.* 2015 ; Barou *et al.* 2002 ; Carulli *et al.* 2013). Il est donc soumis également à la pression et au flux des circulations de fluides (*i.e.* fluides extracellulaires) (Arkin *et al.* 1956 ; Hillsley et Frangos 1994) qui peuvent influencer la géométrie cristal-liquide. A cela s'ajoute à une autre échelle, la présence des cellules au sein de la MEC (*i.e.* ostéocytes).

Nous avons ensuite observé des morceaux d'os de brebis décalcifiés au MEB afin de déterminer les dimensions caractéristiques des différentes unités (*i.e.* ostéons et travées) du tissu. Comme indiqué dans le chapitre précédent, l'os trabéculaire est formé de travées osseuses qui délimitent un réseau tridimensionnel de macropores interconnectés (*Figure 9A*). La taille de ces macropores varie de la dizaine de microns jusqu'au millimètre, on estime dans cette étude la taille moyenne d'un macropore à 200-300 microns. La taille d'une trabécule varie quant à elle entre 100 et 300 microns (*Figure 9A'*). L'os cortical est quant à lui formé de lamelles osseuses qui s'organisent de façon concentrique autour des canaux de Havers afin de former les ostéons (*Figure 9B*). Le diamètre d'un ostéon et la distance inter-ostéons varient respectivement entre 50 et 100 µm et entre 75 et 300 µm. On estime dans cette étude une distance moyenne de 200 µm entre les ostéons (*Figure 9B'*).

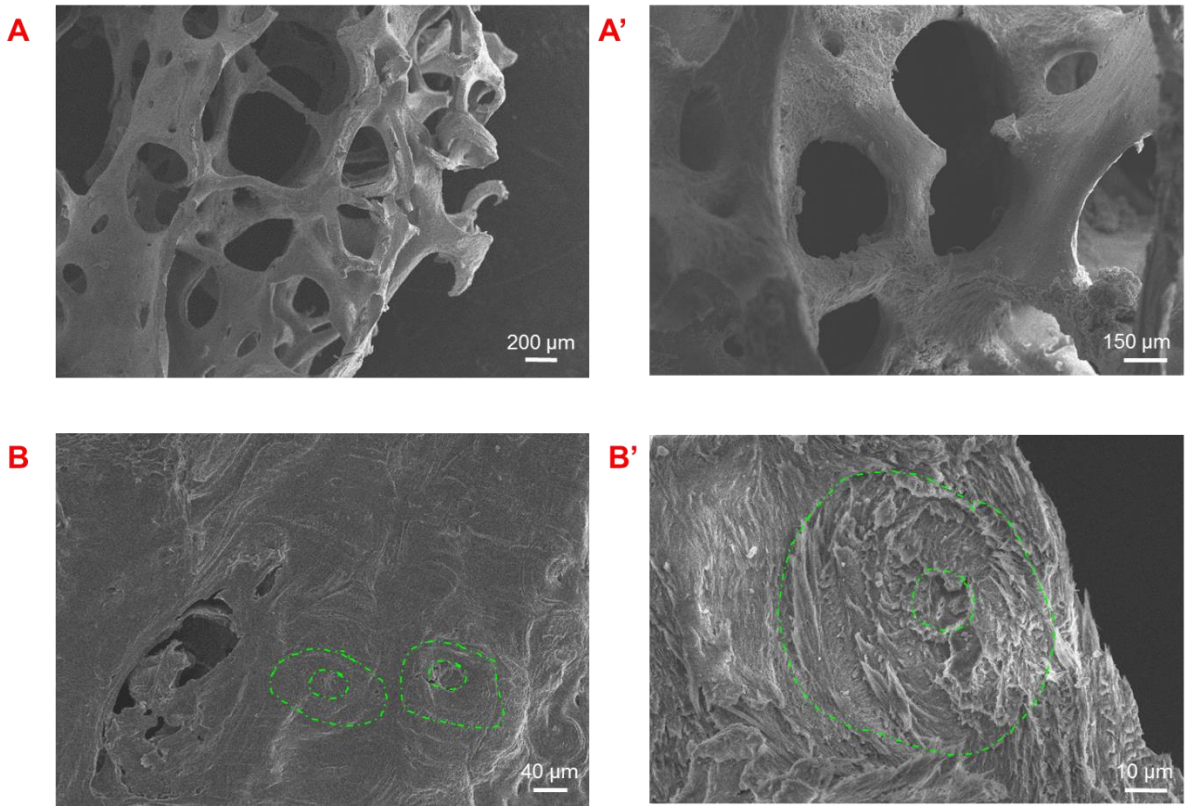


Figure 9 : Observations par MEB d'un morceau d'os trabéculaire (A) et d'os cortical (B) de brebis décalcifiés à l'EDTA. Les travées osseuses délimitent des macropores interconnectés dans (A) et, à plus fort grandissement, les tailles des pores et des travées sont mesurées (A') tandis que les lamelles osseuses s'organisent de façon concentrique et forment l'ostéon autour du canal de Havers dans (B), le diamètre d'un ostéon et la distance interostéons sont également mesurés (B').

Les distances caractéristiques que nous avons pu établir au laboratoire avec nos échantillons références d'os de brebis et de dromadaire et celles obtenues dans la littérature sont résumées dans le *Tableau 1*. Notons que l'on retrouve plus fréquemment dans la littérature des informations structurales sur le diamètre moyen des canaux de Havers, le diamètre moyen de l'ostéon, le diamètre moyen d'une trabécule et le pourcentage de porosité dans le tissu osseux. Sauf erreur de ma part, je n'ai trouvé que très peu de données dans la littérature sur les distances inter-ostéons et sur le diamètre moyen des macropores.

Os cortical	***Diamètre moyen canal de Havers (µm)***	***Distance moyenne interostéons (µm)***
Référence brebis	50 - 100	150 - 200
Référence dromadaire	150 - 200	100 - 300
Frost 1963 (humain)	76 ± 29	/
Giua *et al.* 2014 (brebis)	22 ± 2	/
Skedros *et al.* 2013 (humain)	46-60	/
Dragoi *et al.* 2014 (humain)	/	100-250
Os trabéculaire	***Diamètre moyen macropores (µm)***	***Taille moyenne trabécules (µm)***
Référence mouton	200 - 300	100 - 300
Référence dromadaire	300 - 400	100 - 250
Legrand *et al.* 2000 (humain)	/	97,3 ± 26,7
Whitehouse *et al.* 1971 (humain)	100 - 600	100 - 200
Singh 1977	/	80 - 300

Tableau 1 : Récapitulatif des distances moyennes caractéristiques observées au MEB ou obtenues dans la littérature pour l'os cortical et l'os trabéculaire.

Ainsi, le MOLP et le MEB sont les deux techniques qui ont été privilégiées dans cette thèse pour étudier les modèles expérimentaux mis en place pour reproduire l'organisation hiérarchique (niveau X) du tissu osseux (Reznikov *et al.* 2018) et nous permettre d'avancer dans l'identification des facteurs physico-chimiques intervenant dans les processus de morphogénèse du tissu osseux compact et spongieux.

III. Preuves de concept du confinement et étude de l'influence du flux sur l'orientation du collagène

Afin d'établir les modèles expérimentaux visant à reproduire la structure 3D de l'os cortical et de l'os trabéculaire, il a été nécessaire, dans un premier temps, de valider l'échelle de valeurs évaluée dans les échantillons biologiques pour un probable effet de confinement sur les mésophases du collagène. Dans la littérature, la notion de confinement sur la précipitation du minéral et la phase qui en résulte a notamment été très étudiée dans les travaux de F. Meldrum (Meldrum et O'Shaughnessy 2020 ; Meldrum et Cölfen 2008).

Je n'ai néanmoins pas trouvé dans la littérature de modèles impliquant un effet de confinement sur l'organisation des phases denses de collagène. Par contre, il existe des travaux où la notion de cisaillement a été étudiée. Dans ces travaux, les fibrilles de collagène sont alignées dans une même direction, par capillarité (Gobeaux *et al.* 2008) (*Figure 10A et G*), par spin-coating (Saeidi *et al.* 2011) (*Figure 10B*) ou par extrusion (Rieu *et al.* 2020) (*Figure 10C*). D'autres travaux ont également été menés sur différents biopolymères cités précédemment, la cellulose (Cherpak *et al.* 2018 ; Li *et al.* 2016) (*Figure 10D et E*), et la chitine (Belamie *et al.* 2004) (*Figure 10F*) où les domaines cholestériques sont alignées par capillarité. L'axe cholestérique est perpendiculaire au sens du cisaillement.

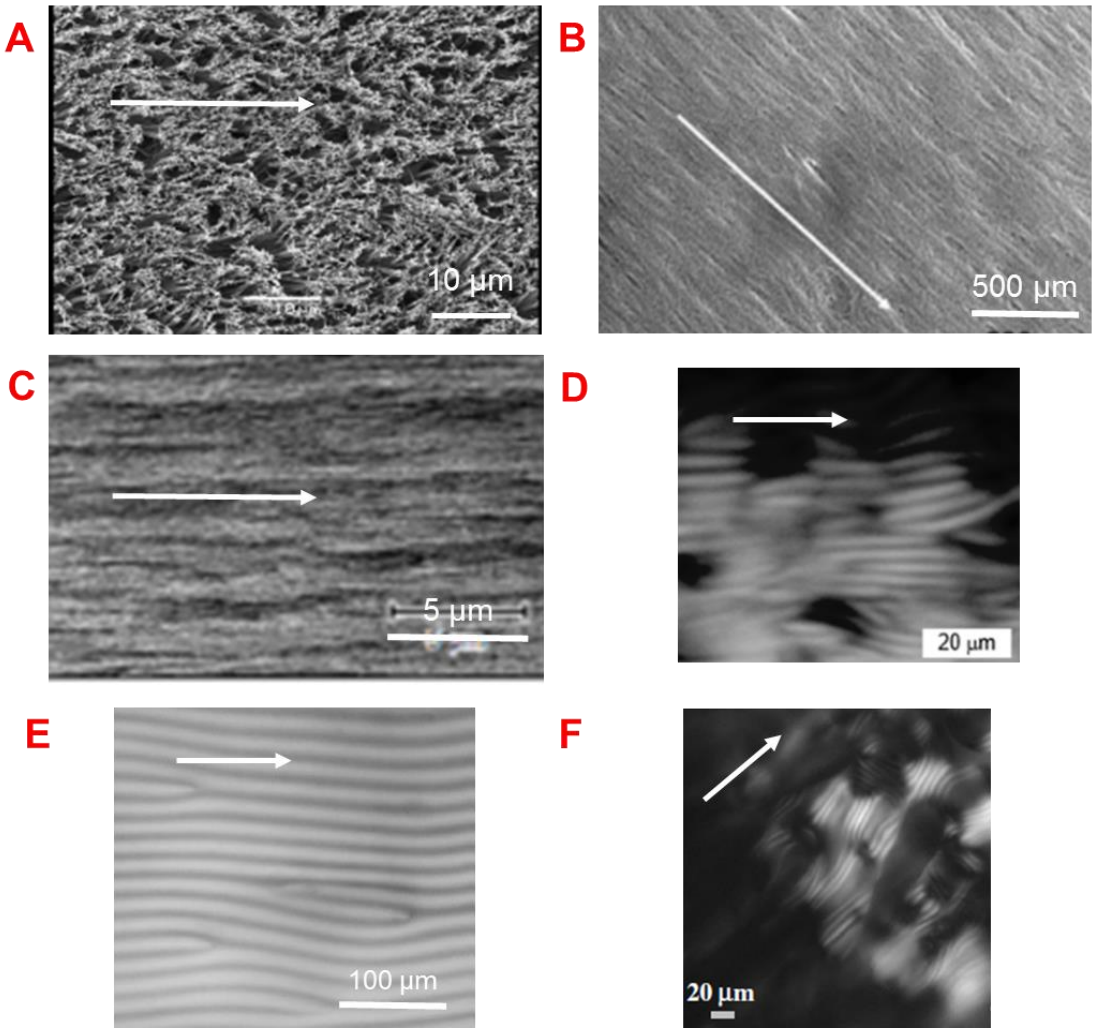


Figure 10 : Clichés en MEB (A, B, D), MET (C) et MOLP (E, F, G) de l'organisation de différents biopolymères par effet de cisaillement. Le sens de l'alignement est indiqué par les flèches blanches (A) collagène par capillarité, reproduit de Gobeaux et al. 2008 ; (B) collagène par spin-coating, reproduit de Saeidi et al. 2011 ; et (C) cellulose par capillarité. Les domaines cholestériques sont alignés dans le sens du cisaillement, l'axe cholestérique est quant à lui perpendiculaire dans la cellulose (D), la chitine (E) et le collagène (F). (C) et (D) reproduits de Cherpak et al. 2018 ; (E) et (F) reproduits de Belamie 2006.

Dans un deuxième temps, l'os étant un organe soumis à la pression et à la circulation des fluides (Arkin *et al.* 1956 ; Hillsley et Frangos 1994), l'influence du flux sur l'organisation tridimensionnelle des fibrilles de collagène a donc été également étudié.

1. Effet du confinement sur l'organisation tridimensionnelle du collagène

L'idée ici est de simplement pouvoir observer par microscopie optique à lumière polarisée si la biréfringence des molécules de collagène apparaît dans une certaine gamme de distances et si les valeurs que nous avons extraits de nos observations et de la littérature font sens.

Pour cela, nous avons utilisé une solution acido-soluble de collagène juste avant la concentration critique de la transition isotrope-anisotrope de 40 mg/mL, ici à 38 mg/mL. La solution a été placée dans un réseau de billes de verre (Ø ~ 0,5-1 mm), disposées de façon aléatoire sur une lame de verre pour générer des distances interbilles différentes. Le protocole de cette étude est détaillé dans le chapitre **Matériels et Méthodes**.

La nature des billes, ici le verre, va bien entendu influencer l'orientation des molécules de collagène puisqu'elles peuvent interagir avec la surface. Néanmoins, ce facteur n'est pas un point déterminant pour ce que nous cherchons à démontrer. Il le sera par contre pour nos études au sein des chambres microfluidiques et sera discuté dans le **Chapitre 3**.

Après 30 minutes, l'observation en lumière polarisée permet de mettre en évidence une anisotropie locale au sein de la solution acido-soluble de molécules de collagène à une distance de 200 µm entre les billes de verre. En effet, comme on peut le constater sur la *Figure 11*, des textures de biréfringence sont observées au contact de billes de verre (*Figure 11A et Figure 11A'*). Cette anisotropie n'est cependant pas observée lorsque la distance entre les billes est supérieure à 200 µm (*), on peut donc soulever la question d'une évaporation préférentielle des solvants entre les billes.

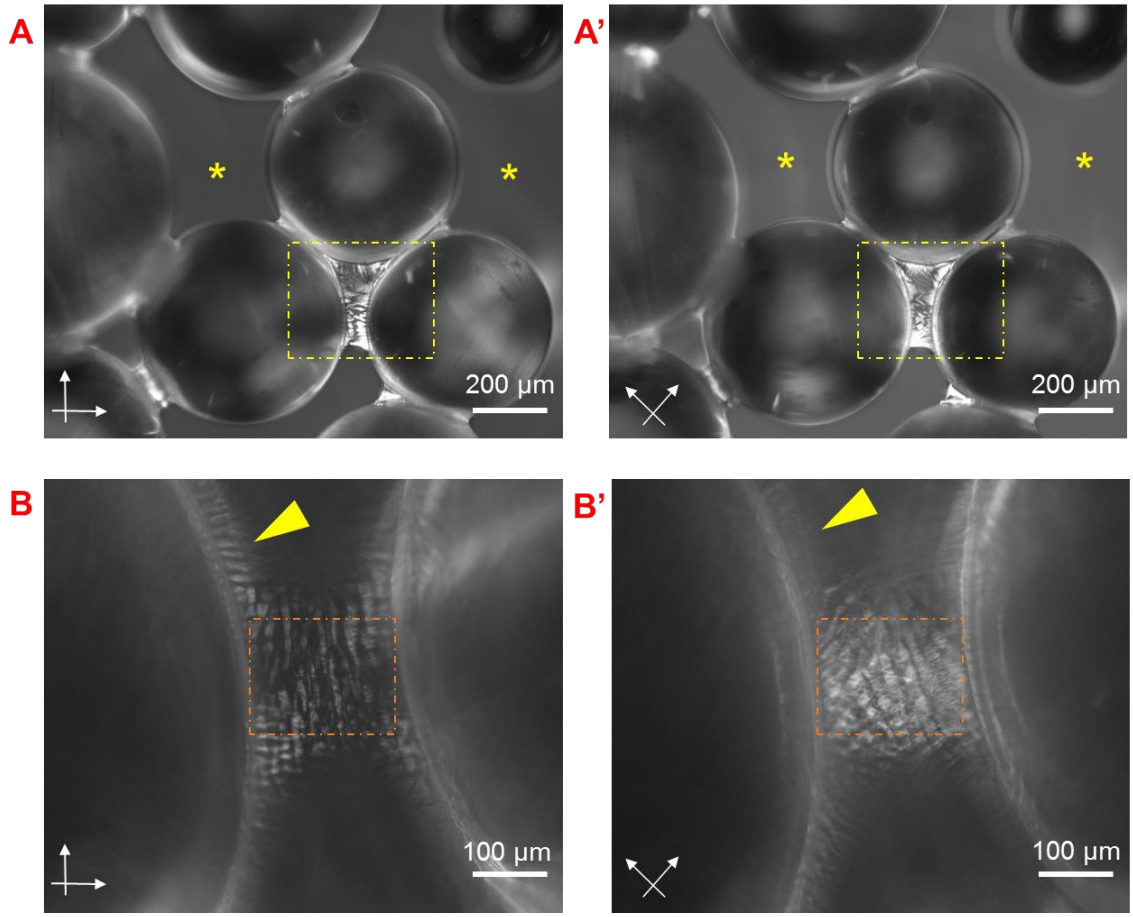


Figure 11 : Clichés en lumière polarisée de la solution acido-soluble de collagène concentrée à 38 mg/ml en présence des billes de verre à faible grandissement d'une première zone (A) et à plus fort grandissement d'une seconde zone (B). (A') et (B') correspondent à des clichés après rotations à 45° du polariseur et de l'analyseur. Des textures de biréfringence sont observées entre 3 billes (rectangle jaune), tandis qu'en dehors de ce confinement local, la solution est globalement isotrope (*). Une orientation préférentielle des molécules de collagène est observée à la surface des billes (flèche jaune). Précholestérique (orange) et nématique (jaune).

A plus fort grandissement, on observe également que les molécules de collagène s'orientent préférentiellement par rapport à la surface des billes de verre (flèche) (*Figure 11B et Figure 11B'*). La nature chimique des billes semble servir de point d'ancrage aux molécules de collagène, ce qui n'est pas étonnant compte tenu de la nature du solvant, ici l'acide acétique.

On peut observer des domaines d'alignements s'apparentant à une géométrie cristal-liquide nématique. Il est intéressant de constater que les textures de biréfringence semblent indiquer en plus de la phase nématique observée après 40 mg/mL, la présence également de domaines précholestériques (P et P* ; Salameh *et al.* 2020) (orange). Comme vu dans le **Chapitre 1**, cette phase ne se forme pourtant qu'à des concentrations supérieures à 45 mg/mL indiquant soit que la solution ne s'est pas évaporée de façon homogène et est plus concentrée ici localement, soit que le confinement permet de former ces assemblages à des concentrations plus faibles.

La présence de ces textures de biréfringence est d'autant plus intéressante car la distance entre les billes est d'environ 200 µm, qui est la distance moyenne que nous avons déterminé préalablement entre deux ostéons dans l'os cortical et la taille moyenne d'une trabécule.

En parallèle, nous avons concentré une solution de collagène à 250 mg/ml selon le procédé de dialyse inverse couplée à l'injection continue (Wang *et al.* 2011) afin d'observer les effets sur une solution où les assemblages cristal-liquides cholestériques sont atteints. Pour cela, des billes de verre ont été placées au sein du moule afin que la solution de collagène se concentre au contact des billes. Après une exposition aux vapeurs d'ammoniaque afin d'induire la précipitation des molécules de collagène en fibrilles, on peut observer à l'œil nu la présence de billes de verre au sein de la matrice de collagène CollGlass1 (*Figure 12*).

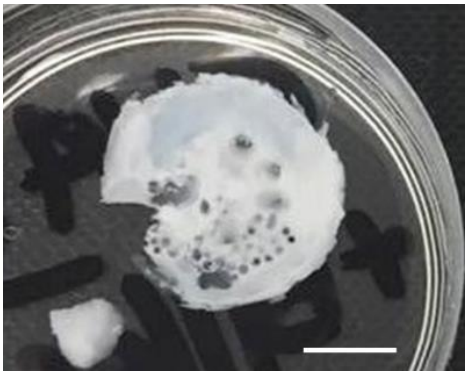


Figure 12 : Photo de la matrice CollGlass1. La présence de billes est visible au sein de la matrice (barre d'échelle = 0,5 cm).

Nous avons ensuite préparé la matrice de collagène CollGlass1 pour l'observation en microscopie électronique à balayage (*Figure 13*) (préparation des échantillons dans **Matériels et Méthodes** – Partie VI – 1.1). Dans les *Figure 13A* et *B,* on observe la présence (*) ou l'empreinte (+) des billes au sein de la matrice. Les fibrilles semblent s'organiser de manière concentrique autour des billes (*Figure 13A'*) indiquant un effet de confinement local des fibrilles de collagène. A plus fort grandissement, grâce à ces défauts laissés vacants, les fibrilles de collagène forment des strates (*Figure 13B'*) rappelant les organisations concentriques observées dans l'os cortical (Giraud-Guille 1994) (*Figure 13C et C'*).

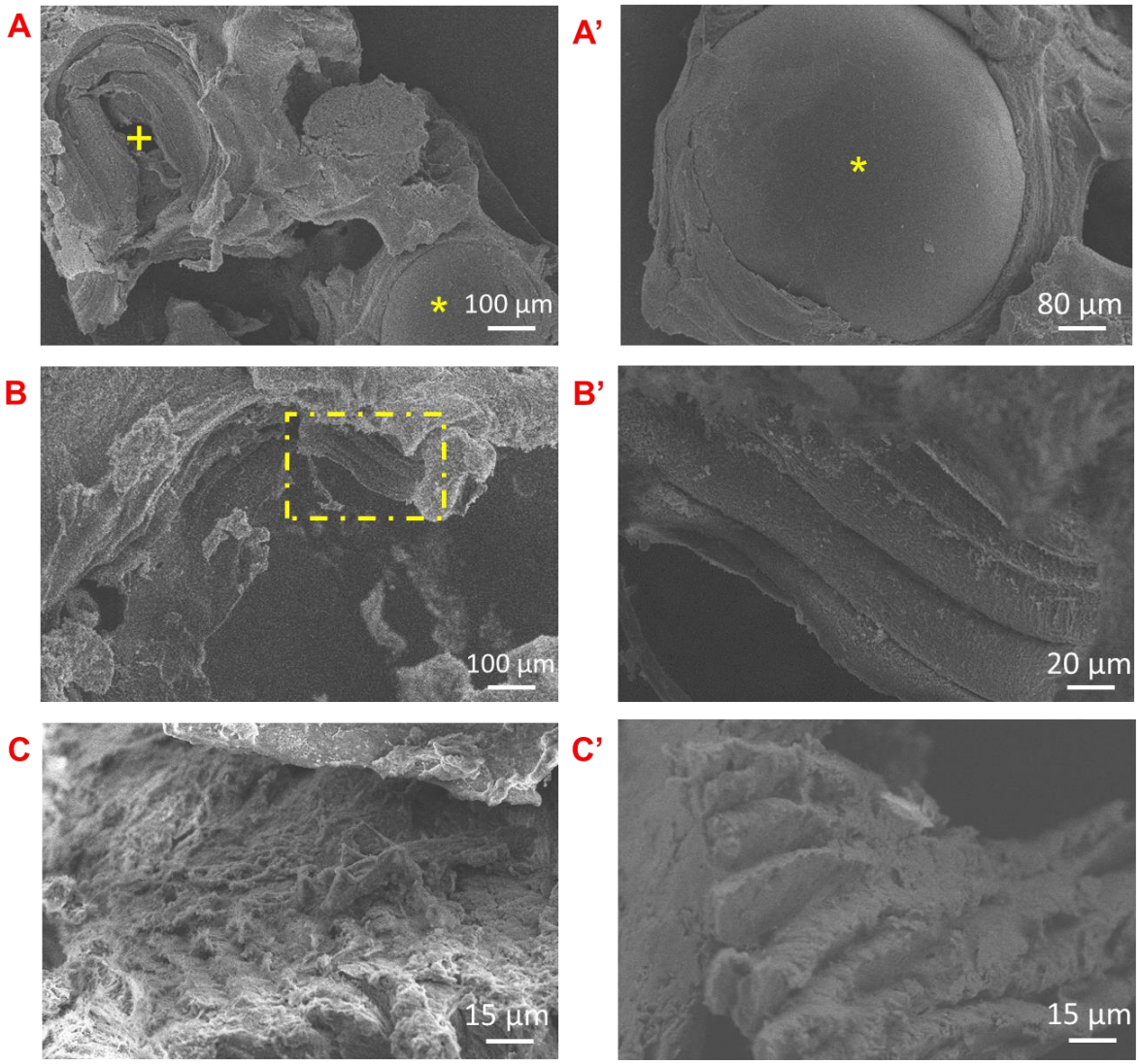


Figure 13 : Clichés en MEB de la matrice CollGlass1 concentrée à 250 mg/ml en présence de billes de silice (A) (A'). Des billes sont encore présentes au sein de la matrice (*), tandis que celles qui ont été retirées, laissent une empreinte (+) (A). Une organisation concentrique des fibrilles de collagène est observée autour de la bille (B). Des strates sont observées (B') rappelant l'organisation au sein du tissu biologique (C)(C') (crédits : N. Nassif).

Il est donc possible d'envisager *qu'in vivo*, l'agencement tridimensionnel des fibrilles de collagène soit dû en partie à un effet de confinement crée par les différents composants du tissu (*e.g.* vaisseaux, moelle osseuse). Il serait également intéressant d'étudier à une autre échelle si les cellules osseuses participent également à l'agencement final des fibrilles. En effet, les ostéocytes et les ostéoblastes ont un diamètre moyen de 15 µm (Canè *et al.* 1982 ; Jones et Boyde 1977 ; Florencio-Silva *et al.* 2015). Ces deux types cellulaires sont présents au sein de la matrice extracellulaire (Robin *et al.* 2016 ; Franz-Odendaal *et al.* 2006) et pourraient donc induire localement des défauts ou des zones de contraintes pour forcer l'organisation tridimensionnelle des fibrilles de collagène. La distance entre deux contraintes géométriques est également un paramètre qui peut être pris en considération dans notre étude (Schemenz *et al.* 2020 ; Repp *et al.* 2017).

Ainsi, l'observation de domaines anisotropes interbilles (MOLP) et autour des billes (MEB) mimant ceux du tissu osseux a permis d'envisager la mise en place de modèles géométriques pour étudier l'influence du confinement sur les propriétés d'auto-assemblage du collagène dans un contexte physiologique.

Dans les travaux de Gobeaux *et al.* (Gobeaux *et al.* 2008) la solution de collagène est aspirée au sein d'un capillaire (diamètre = 2 mm) dans lequel l'effet de cisaillement induit semble mener les domaines cholestériques à s'aligner dans la direction du capillaire (*Figure 14A*). On observe également dans la littérature que l'axe cholestérique est perpendiculaire aux effets de cisaillement comme dans les précédents travaux menés au laboratoire (Wang *et al.* 2011) (*Figure 14B*). *In vitro*, dans un milieu de culture cellulaire, l'axe cholestérique est également perpendiculaire aux ostéoblastes (*Figure 14C*) (Silvent *et al.* 2013). *In vivo*, les molécules de collagène secrétées par les ostéoblastes sont alignées parallèlement dans le sens des cellules, mais l'axe cholestérique est perpendiculaire au sens de sécrétion (Jones et Boyde 1976 ; McKee et Cole 2012) (*Figure 14D et E*). Dans notre cas, on observe une orientation des molécules par rapport à la surface des billes, un arrangement concentrique des fibrilles autour des billes qui semble suggérer une interaction avec la surface (*Figure 14F*). Il n'est néanmoins pas facile de conclure sur l'orientation de l'axe cholestérique dans notre modèle. La nature de l'interface peut influencer l'interaction avec les molécules de collagène. Néanmoins, ici le fait que la solution de collagène se concentre par évaporation avec l'air et que l'organisation concentrique est observée après injection/dialyse (les billes n'étant pas forcément à 200 µm, les unes des autres) laisse supposer le rôle primordial de la direction du flux des molécules de collagène. C'est ce qui est étudié dans la partie suivante.

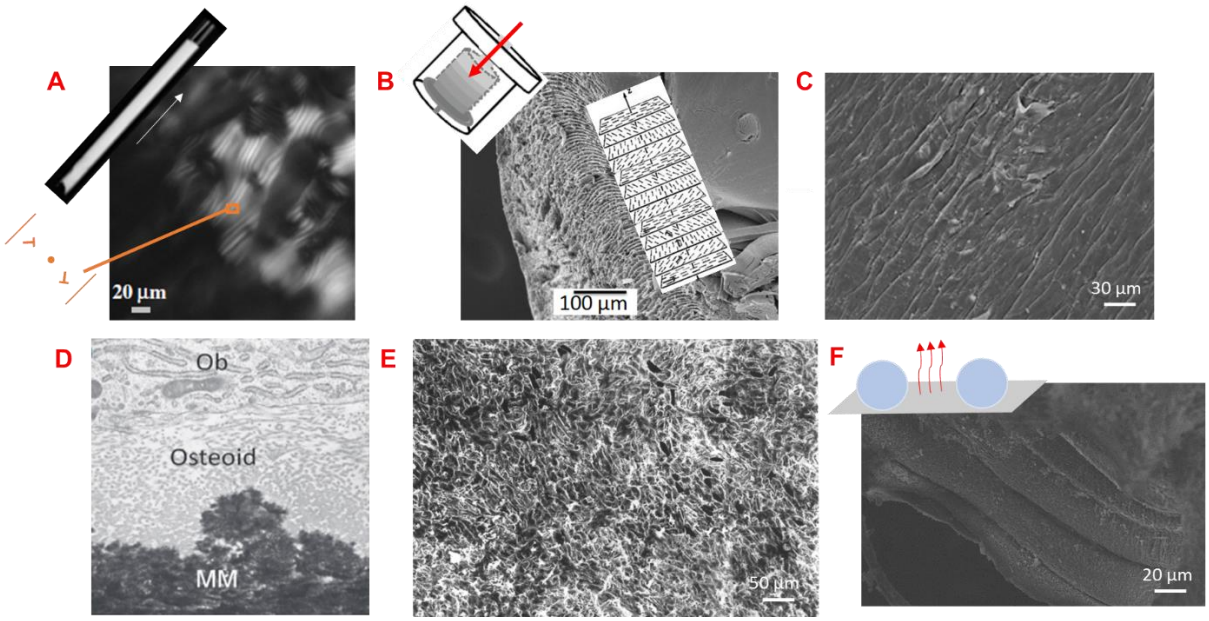


Figure 14 : L'orientation de l'axe cholestérique est perpendiculaire in vitro par rapport au flux ou au cisaillement et in vivo par rapport aux ostéoblastes. (A) Cliché MOLP de domaines cholestériques d'une solution de collagène orientés par capillarité. Reproduit de Gobeaux et al. 2008. Clichés MEB d'une matrice dense de collagène par dialyse inverse/injection continue (B) (reproduit de Wang et al. 2011), d'une matrice de collagène dense (40 mg/mL) par évaporation en présence d'ostéoblastes (C) (reproduit de Silvent et al. 2013), d'un os de singe (reproduit de Jones et al. 1975), de notre matrice dense de collagène par injection continue/ dialyse inverse en présence de billes de verre (F). (D) Cliché MET d'une coupe ultrafine d'un os humain. Ob=ostéoblastes et MM=matrice minéralisée montrant l'alignement de la matrice par rapport aux ostéoblastes. Reproduit de McKee et Cole 2012.

2. Effet du flux sur l'organisation tridimensionnelle du collagène

Comme expliqué précédemment, l'os possède un réseau vasculaire étendu qui assure la formation, le remodelage et l'homéostasie du tissu (Brandi 2006 ; Tomlinson 2013). Cette vascularisation assure l'apport en nutriments du tissu. Différentes techniques ont été mises en place afin de mesurer le flux sanguin au sein du tissu osseux (McCarthy 2006). Néanmoins, il est à noter que le squelette humain étant constitué de 206 os, chaque os possède son réseau vasculaire propre et la proportion os cortical/os trabéculaire/moelle osseuse varie (Gross 1981 ; Brookes 1974 ; Hillsley 1994). A plus petite échelle, l'os est également soumis au flux imposé par la production de composants (*e.g.* collagène et minéraux) par les cellules (Tate 2003).

La stratégie employée ici est d'étudier l'organisation des fibrilles de collagène par rapport à l'orientation d'une contrainte suivant le flux. Pour cela, nous avons choisi de travailler à une concentration en collagène (250 mg/mL) décrite comme menant à des structures en arceaux et une taille de fibrilles homogène du même ordre de grandeur que celles observées dans l'os cortical humain (Wang *et al.* 2012). Le protocole est détaillé dans le chapitre **Matériels et Méthodes** (Partie III – 2).

Des fibres de nylon (FN), dont le diamètre moyen est de 200 µm, sont placées dans une résine élastomère (PDMS). Par le biais du procédé de dialyse inverse couplée à l'injection continue, les FN-PDMS sont placées dans le moule selon deux directions différentes : (1) parallèle et (2) perpendiculaire au sens du flux d'injection de la solution de collagène qui arrive dans le moule. La précipitation des fibrilles est induite par exposition aux vapeurs d'ammoniaque pendant 24 h. Les échantillons ont été nommés CollBAD$^{\perp}$ et CollBAD$^{//}$ respectivement pour les échantillons dont les FN ont été placées perpendiculairement et parallèlement au sens du flux d'injection.

A l'œil nu, on peut observer que les FN sont bien « insérées » au sein des matrices CollBAD$^{\perp}$ (*Figure 15A*) et CollBAD$^{//}$ (*Figure 15B*) quel que soit leur orientation par rapport au flux d'injection de la solution de collagène.

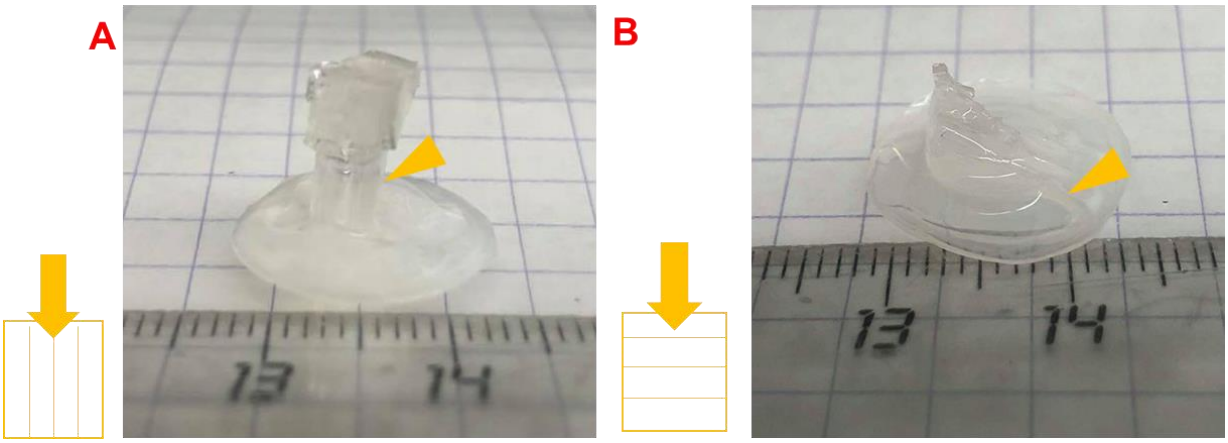


Figure 15 : Photos des matrices CollBAD$^{//}$ et CollBAD$^{\perp}$ où les fibres de nylon sont placées parallèlement (A) ou perpendiculairement (B) au flux de l'injection de la solution de collagène.

L'observation de ces matrices a été effectuée par MEB afin de nous renseigner principalement sur l'organisation à grande échelle des fibrilles autour des FN. L'empreinte des FN est visible au sein des matrices quelle que soit l'orientation (*Figure 16A et B*) mais le traitement des échantillons où les FN sont placées parallèlement au flux d'injection n'a pas permis de maintenir la structure 3D. Néanmoins, nous avons pu tout de même extraire les informations nécessaires. Ainsi, lorsque les FN sont placées parallèlement ou perpendiculairement au flux d'injection de la solution de collagène, on constate que les fibrilles de collagène s'orientent le long des FN (*Figure 16A' et B'*). La reproductibilité des échantillons est assurée par le maintien des FN dans la matrice de collagène.

Nous avions d'abord émis l'hypothèse en se référant à nos observations précédentes avec les billes de verre et les travaux de la littérature (Wang *et al.* 2011 ; Gobeaux *et al.* 2008 ; Belamie *et al.* 2004) que les domaines cholestériques résultants s'organiseraient perpendiculairement à la direction d'injection de la solution de collagène, peu importe le positionnement des FN au sein du moule. Ici, nous n'avons pu qu'observer des plages d'alignements. Cette observation coïnciderait avec une géométrie cristal-liquide nématique, l'axe nématique serait donc parallèle à la direction d'injection, ce qui ne semble pas converger vers les conclusions des travaux menés dans la littérature (Jones et Boyde 1976 ; McKee et Cole 2012). Il est donc intéressant de constater que le flux semble contrôler dans ces conditions expérimentales (sous contraintes et en présence d'une surface hydrophile) l'orientation des fibrilles de collagène.

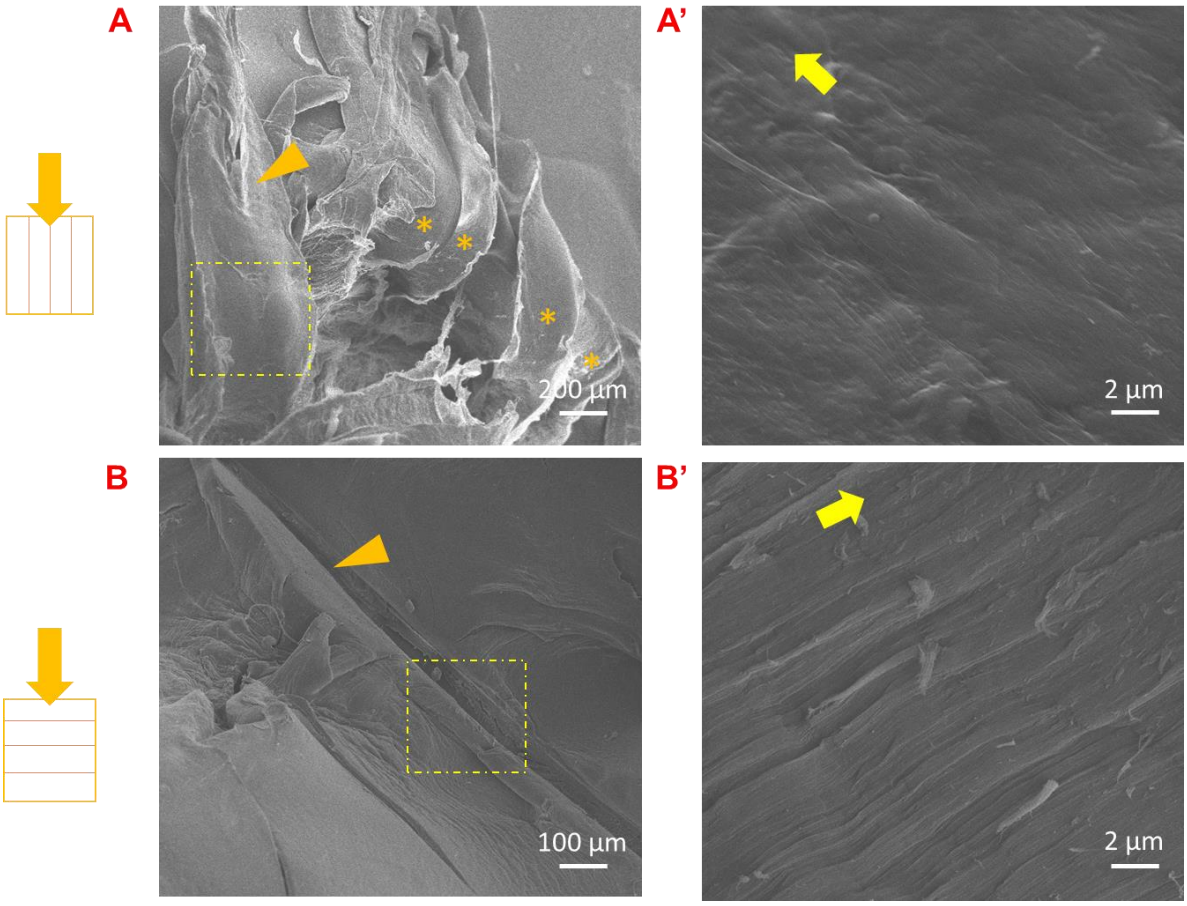


*Figure 16 : Clichés en MEB des matrices de collagène à 250 mg/ml synthétisés en présence des fibres de nylon. (A) CollBAD$^{//}$ et (B) CollBAD$^{\perp}$. L'empreinte des FN est visible au sein de la matrice (flèche orange). A plus fort grandissement (rectangle jaune), on observe que les fibrilles de collagène sont alignées dans le sens du flux (A') (B'), l'orientation des fibrilles est indiquée par les flèches jaunes et par des *.*

L'observation de coupes ultrafines par microscopie électronique à transmission (MET) des matrices de collagène nous renseigne sur la morphologie des fibrilles à l'échelle locale et la microstructure. En accord avec la concentration choisie, le matériau est dense en fibrilles. Les fibrilles sont striées ce qui démontre que la fibrillogénèse a correctement été induite. La taille des fibrilles est cependant relativement faible, ceci est probablement dû à la solution de collagène utilisé qui a mené également dans d'autres travaux à l'observation de fibrilles de petite taille. Différentes orientations fibrillaires sont observées. Les fibrilles sont alignées soit parallèlement (*Figure 17, barre*) soit perpendiculairement (*Figure 17, point*) au plan de coupe. Cette organisation est observée sur de grandes distances (~ 20 µm). Les observations de ces orientations fibrillaires s'apparentent aux organisations fibrillaires observées dans des plans de coupes obliques de contre-plaqués (orthogonaux ou torsadé). Cependant, il n'est pas possible de conclure d'un effet de l'orientation des FN sur la formation de ces organisations fibrillaires.

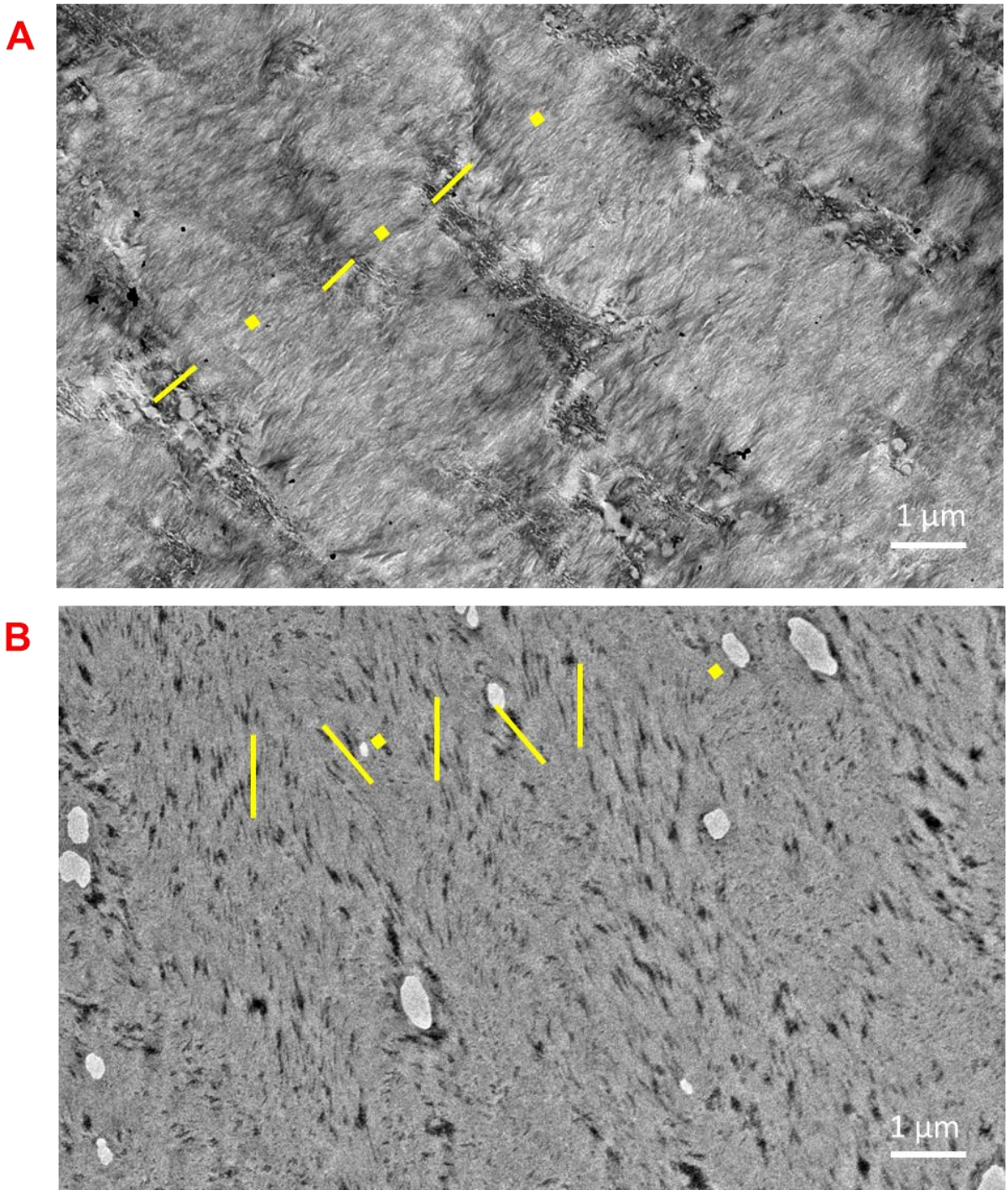


Figure 17 : Clichés en MET de coupes ultrafines contrastées à l'acétate d'uranyle des échantillons synthétisés en présence des FN parallèlement CollBAD// (A) et perpendiculairement CollBAD⊥ (B)au sens du flux d'injection. Les orientations des fibrilles sont représentées par des points (perpendiculaires au plan de coupe) et des traits (alignées dans le plan de coupe).

Nous avons démontré que l'alignement des fibrilles de collagène selon leur axe principal dans nos modèles semble être contrôlée par le sens du flux dans les conditions expérimentales que nous avons établi. Cette observation pourrait jouer un rôle avec les travaux dans la littérature montrant que l'orientation du flux et l'organisation spatiale des fibrilles de collagène jouent un rôle sur la différenciation cellulaire (Matsugaki *et al.* 2020 ; Ping Ng et Swartz 2006), il serait donc intéressant d'étudier nos matrices de collagène en culture cellulaire.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons d'une part pu vérifier que notre hypothèse de travail quant à l'implication du confinement sur la présence des structures observées dans l'os étaient cohérentes et, d'autre part, nous avons pu démonter l'influence de la direction du flux de collagène sur l'organisation tridimensionnelle résultante des fibrilles. Nous avons également constaté que l'organisation des fibrilles était différente selon la nature de la surface de la contrainte géométrique (hydrophile/hydrophobe) dans nos conditions expérimentales. Il serait intéressant d'effectuer ces mêmes expériences avec d'autres types de surface. Ces observations nous ont permis d'établir des modèles biomimétiques du tissu osseux et de discuter l'influence de ces paramètres sur les organisations formées à l'échelle suprafibrillaire. Ces modèles ont été construits par une structuration microfluidique pour l'os cortical (**Chapitre 3**) et par une approche émulsion/agents porogènes de l'interaction moelle-tissu pour l'os trabéculaire (**Chapitre 4**).

Références bibliographiques

Arkin, A. M., et J. F. Katz. 1956. « The effects of pressure on epiphyseal growth : the mechanism of plasticity of growing bone ». *Journal of Bone and Joint Surgery* 38 (5): 1056–1076.

Barou, O, S Mekraldi, L Vico, G Boivin, C Alexandre, et M. H Lafage-Proust. 2002. « Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: a quantitative study ». *Bone* 30 (4) : 604-12.

Belamie, E., G. Mosser, F. Gobeaux, et M. M. Giraud-Guille. 2006. « Possible transient liquid crystal phase during the laying out of connective tissues: α-chitin and collagen as models ». *Journal of Physics: Condensed Matter* 18: S115–S129.

Belamie, E., P. Davidson, et M. M. Giraud-Guille. 2004. « Structure and chirality of the nematic phase in α-chitin suspensions ». *The Journal of Physical Chemistry B* 108 (39): 14991-0.

Besseau, L., et M-M. Giraud-Guille. 1995. « Stabilization of fluid cholesteric phases of collagen to ordered gelated matrices ». *Journal of Molecular Biology* 251 (2): 197-202.

Bidan, C. M., P. Kollmannsberger, V. Gering, S. Ehrig, P. Joly, A. Petersen, V. Vogel, P. Fratzl, et J. W. C. Dunlop. 2016. « Gradual conversion of cellular stress patterns into pre-stressed matrix architecture during *in vitro* tissue growth ». *Journal of The Royal Society Interface* 13 (118): 20160136.

Black, J., R. Mattson, et E. Korostoff. 1974. « Haversian osteons: size, distribution, internal structure, and orientation ». *Journal of Biomedical Materials Research* 8 (5): 299-319.

Bouligand, Y. 2008. « Liquid crystals and biological morphogenesis: ancient and new questions ». *Comptes Rendus Chimie* 11 (3): 281-96.

Brookes, M. 1974. « Approaches to non-invasive blood flow measurement in bone ». *Biomedical Engineering* 9 (8): 342-47.

Canè, V., G. Marotti, G. Volpi, D. Zaffe, S. Palazzini, F. Remaggi, et M. A. Muglia. 1982. « Size and density of osteocyte lacunae in different regions of long bones ». *Calcified Tissue International* 34 (1) : 558-63.

Carulli, C., M. Innocenti, et M. L. Brandi. 2013. « Bone vascularization in normal and disease conditions ». *Frontiers in Endocrinology* 4.

Chappard, D., M.-F. Baslé, E. Legrand, et M. Audran. 2008. « Trabecular bone microarchitecture: a review ». *Morphologie* 92: 162-70.

Cherpak, V., V. F. Korolovych, R. Geryak, T. Turiv, D. Nepal, J. Kelly, T. J. Bunning, O. D. Lavrentovich, W. T. Heller, et V. V. Tsukruk. « Robust chiral organization of cellulose nanocrystals in capillary confinement ». *Nano Letters* 18: 6770-77.

Dillaman, R. M., R. D. Roer, et D. M. Gay. 1991. « Fluid movement in bone : theoretical and empirical ». *Journal of Biomechanics*, Proceedings of the NASA Symposium on the Influence of Gravity and Activity on Muscle and Bone, 24: 163-77.

Dragoi, G., P. Melinte, I. Dinca, M. Botoran, et E. Patrascu. 2014. « Histomorphometric evaluation of osteons inside the compacta of long bones diaphysis. Implication in pathology ». *Romanian Journal of Legal Medicine* 22: 109-16.

Farhi D.C. 2009. *Pathology of Bone Marrow and Blood Cells*, Seconde Edition. Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, PA.

Fazzi, R., S. Galimberti, R. Testi, S. Pacini, S. Trasciatti, S. Rosini, et M. Petrini. 2002. « Bone and bone marrow interactions: hematological activity of osteoblastic growth peptide (ogp)-derived carboxy-terminal pentapeptide: ii. action on human hematopoietic stem cells ». *Leukemia Research* 26 (9): 839-48.

Florencio-Silva, R., G. Rodrigues da Silva Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões, et P. Sérgio Cerri. 2015. « Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells ». Review Article. *BioMed Research International.*

Franz-Odendaal, Tamara A., Brian K. Hall, et P. Eckhard Witten. 2006. « Buried alive: how osteoblasts become osteocytes ». *Developmental Dynamics* 235 (1): 176-90.

Frost, H. M. 1963. « Mean formation time of human osteons ». *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 41 (5): 1307-10.

Galante, J., W. Rostoker, et R. D. Ray. 1970. « Physical properties of trabecular bone ». *Calcified Tissue Research* 5 (1): 236-46.

Giraud-Guille, M. M. 1988. « Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons ». *Calcified Tissue International* 42 (3): 167-80.

Giraud-Guille, M-M. 1992. « Liquid crystallinity in condensed type in collagen solutions: a clue to the packing of collagen in extracellular matrices ». *Journal of Molecular Biology* 224 (3): 861-73.

Giraud-Guille, M-M. 1994. « Liquid crystalline order of biopolymers in cuticles and bones ». *Microscopy Research and Technique* 27 (5): 420-28.

Giraud Guille, M. M., G. Mosser, C. Helary, et D. Eglin. 2005. « Bone matrix like assemblies of collagen: from liquid crystals to gels and biomimetic materials ». *Micron*, Bone structure in health and disease, 36 (7): 602-8.

Giraud-Guille, M.-M., L. Besseau, et R. Martin. 2003. « Liquid crystalline assemblies of collagen in bone and in vitro systems ». *Journal of Biomechanics*, Bone Cell and Tissue Mechanics, 36 (10): 1571-79.

Giraud-Guille M.-M., E. Belamie, G. Mosser, C. Helary, F. Gobeaux, et S. Vigier. 2008. « Liquid crystalline properties of type in collagen: perspectives in tissue morphogenesis ». *Comptes Rendus Chimie* 11 (3): 245-52.

Giua S., V. Farina, A. Cachhioli, F. Ravanetti, M. Carpucino, M. Mohadero Novas et M. Zedda. 2014. « Comparative histology of the femur between mouflon (*Ovis aries musimon*) and sheep (*Ovis aries aries*) ». *Journal of Biological Research* 87.

Gobeaux, F., G. Mosser, A. Anglo, P. Panine, P. Davidson, M. -M. Giraud-Guille, et E. Belamie. 2008. « Fibrillogenesis in dense collagen solutions: A physicochemical study ». *Journal of Molecular Biology* 376: 1509-22.

Goldstein, S.A. 1987. « The mechanical properties of trabecular bone: dependence on anatomic location and function ». *Journal of Biomechanics* 20 (11-12): 1055-61.

Gross, P. M., M. L. Marcus, et D. D. Heistad. 1981. « Measurement of blood flow to bone and marrow in experimental animals by means of the microsphere technique ». *Journal of Bone and Joint Surgery* 63 (6): 1028–1031.

Hayes. W. C. and Snyder, B. 1981. « Toward a quantitative formulation of Wolff's law in trabecular bone in mechanical properties of bone». *American Society OJ Mechanical Engineers* 45: 43-68.

Hillsley, M. V., et J. A. Frangos. 1994. « Review: bone tissue engineering: the role of interstitial fluid flow ». *Biotechnology and Bioengineering* 43 (7): 573-81.

Hoffman, C. M., J. Han, et L. M. Calvi. 2019. « Impact of aging on bone, marrow and their interactions ». *Bone*, Bone and Hematopoiesis, 119: 1-7.

Jones, S.J., A. Boyde, et J.B. Pawley. 1975. « Osteoblasts and collagen orientation ». *Cell and Tissue Research* 159 (1).

Karsenty, G., H. M. Kronenberg, et C. Settembre. 2009. « Genetic control of bone formation ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25 (1): 629-48.

Knothe Tate M. L. 2003. « Whither flows the fluid in bone? An osteocyte's perspective ». *Journal of Biomechanics* 36: 1409-1424.

Lafage-Proust, M.-H., B. Roche, M. Langer, D. Cleret, A. Vanden Bossche, T. Olivier, et L. Vico. 2015. « Assessment of bone vascularization and its role in bone remodeling ». *Bone Key Reports* 4.

Laib, A., O. Beuf, A. Issever, D. C. Newitt, et S. Majumdar. 2001. « Direct measures of trabecular bone architecture from MR images ». In *Noninvasive Assessment of Trabecular Bone Architecture and the Competence of Bone*, édité par Sharmila Majumdar et Brian K. Bay, 37-46. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Boston, MA: Springer US.

Landi, E., G. Celotti, G. Logroscino, et A. Tampieri. 2003. « Carbonated hydroxyapatite as bone substitute ». *Journal of the European Ceramic Society*, Ceramic and Metal Interfaces, 23 (15): 2931-37.

Legrand, E., D. Chappard, C. Pascaretti, M. Duquenne, S. Krebs, V. Rohmer, M.-F. Basle, et M. Audran. 2000. « Trabecular bone microarchitecture, bone mineral density, and vertebral fractures in male osteoporosis ». *Journal of Bone and Mineral Research* 15: 13-19.

Li, Y., J. Jun-Yan Suen, E. Prince, E. M. Larin, A. Klinkova, H. Thérien-Aubin, S. Zhu, B. Yang, A. S. Helmy, O. D. Lavrentovich et E. Kumacheva. 2016. « Colloïdal cholesteric liquid crystal in spherical confinement ». *Nature Communications* 7: 12520.

Matsugaki A., T. Matsuzaka, A. Murakami, P. Wang, et T. Nakano. 2020. « 3D printing of anisotropic bone-mimetic structure with controlled fluid flow stimuli for osteocytes: flow orientation determines the elongation of dendrites ». *International Journal of Bioprinting* 6 (4).

Matsugaki A., Y. Isobe, T. Saku, et T. Nakano. 2015. « Quantitative regulation of bone-mimetic, oriented collagen/apatite matrix structure depends on the degree of osteoblast alignment on oriented collagen substrates ». *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 103 (2): 489-99.

McCarthy, I. 2006. « The physiology of bone blood flow: a review ». *Journal of Bone and Joint Surgery* 88: 4–9.

McKee, M. D., et W. G. Cole. 2012. « Chapter 2 - Bone matrix and mineralization ». In *Pediatric Bone (Second Edition)*, édité par F. H. Glorieux, J. M. Pettifor, et H. Jüppner, 9-37. San Diego: Academic Press.

Meldrum, F. C., et C. O'Shaughnessy. 2020 « Crystallization in confinement ». *Advanced Materials* 32.

Meldrum, F. C., et H. Cölfen. « Controlling mineral morphologies and structures in biological and synthetic systems ». *Chemical Reviews* 108: 4332-4432.

Monro A. 1763. *The anatomy of the human bones, nerves and lacteal sac and duct...*Printed for G. Hamilton and J. Balfour.

Nassif, N., F. Martineau, O. Syzgantseva, F. Gobeaux, M. Willinger, T. Coradin, S. Cassaignon, T. Azaïs, et M. M. Giraud-Guille. 2010. « *In vivo* inspired conditions to synthesize biomimetic hydroxyapatite ». *Chemistry of Materials* 22 (12): 3653-63.

Nassif, N., F. Gobeaux, J. Seto, E. Belamie, P. Davidson, P. Panine, G. Mosser, P. Fratzl, et M.-M. Giraud Guille. 2010. « Self-assembled collagen−apatite matrix with bone-like hierarchy ». *Chemistry of Materials* 22 (11): 3307-9.

Nunamaker, D. M. 1998. « Experimental models of fracture repair ». *Clinical Orthopaedics and Related Research*® 355: S56.

O'Brien, F. J. 2011. « Biomaterials & scaffolds for tissue engineering ». *Materials Today* 14 (3): 88-95.

Pease, D. C. 1956. « An electron microscopic study of red bone marrow ». *Blood* 11 (6): 501-26.

Ping Ng C. et M. A. Swartz. 2006. « Mechanisms of interstitial flow-induced remodeling of fibroblasts-collagen cultures ». *Annals of Biomedical Engineering* 34: 446-454.

Reid, S. A. 1986. « A study of lamellar organization in juvenile and adult human bone ». *Anatomy and Embryology* 174 (3): 329-38.

Repp F., P. Kollmannsberger, A. Roschger, M. Kerschnitzki, A. Berzlanovich, G. M. Gruber, P. Roschger, W. Wagermaier, et R. Weinkamer. 2017. « Spatial heterogeneity in the canalicular density of the osteocyte network in human osteons ». *Bone Reports* 6: 101-8.

Reznikov, N., H. Chase, V. Brumfeld, R. Shahar, et S. Weiner. 2015. « The 3D structure of the collagen fibril network in human trabecular bone: relation to trabecular organization ». *Bone* 71: 189-95.

Rieu, C., N. Rose, A. Taleb, G. Mosser, B. Haye, T. Coradin, F. Le Grand, et L. Trichet. 2020. « Differential myoblast and tenoblast affinity to collagen, fibrin and mixed threads in the prospect of muscle-tendon junction modelisation ». *Preprint. Bioengineering*.

Robin M., C. Almeida, Thierry Azaïs, B. Haye, C. Illoul, J. Lesieur, M.-M. Giraud-Guille, N. Nassif, et C. Hélary. 2016. « Involvement of 3D osteoblast migration and bone apatite during in vitro early osteocytogenesis ». *Bone* 88: 146-56.

Rubin, M. A, J. Rubin, et I. Jasiuk. 2004. « SEM and TEM study of the hierarchical structure of C57BL/6J and C3H/HeJ mice trabecular bone ». *Bone* 35 (1): 11-20.

Saeidi, N., E. A. Sander, R. Zareian, et J. W. Ruberti. 2011. « Production of highly aligned collagen lamellae by combining shear force and thin film confinement ». *Acta Biomaterialia* 7: 2437-47.

Salameh C., F. Salviat, E. Bessot, M., J.-M. Chassot, E. Moulongui, Y. Wang, *et al.* 2020. « Origin of transparency in scattering biomimetic collagen materials ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (22): 11947-53.

Schemenz, V., A. Gjardy, F. F. Chamasemani, A. Roschger, P. Roschger, P. Zaslansky, L. Helfen, M. Burghammer, P. Fratzl, R. Weinkamer, R. Brunner, B. M. Willie et W. Wagermaier. 2020. « Heterogeneity of the osteocyte lacuno-canalicular network architecture and material characteristics across different tissue types in healing bone ». *Journal of Structural Biology* 212 (2): 107616.

Silvent, J., N. Nassif, C. Helary, T. Azaïs, J.-Y. Sire, et M. M. Giraud Guille. 2013. « Collagen osteoid-like model allows kinetic gene expression studies of non-collagenous proteins in relation with mineral development to understand bone biomineralization ». *PLOS ONE* 8 (2): e57344.

Singh, I. J. 1978. « The architecture of cancellous bone ». *Journal of Anatomy* 127: 305-310.

Singh, I. J., et D. L. Gunberg. 1971a. « Effect of estrogen treatment on bone cortex of the young rat ». *The Anatomical Record* 171 (2): 273-82.

Singh, I. J., et D. L. Gunberg. 1971b. « Quantitative histology of changes with age in rat bone cortex ». *Journal of Morphology* 133 (2): 241-51.

Skedros, J. G., A. N. Knight, G. C. Clark, C. M. Crowder, V. M. Dominguez, S. Qiu, D. M. Mulhern, S. W. Donahue, B. Busse, B. I. Husley, M. Zedda et S. M. Sorenson. 2013 « Scaling of haversian canal surface area to secondary osteon bone volume in ribs and limb bones ». *American Journal of Physical Anthropology* 151: 230-44.

Strelitzki, R., J. A. Evans, et A. J. Clarke. 1997. « The influence of porosity and pore size on the ultrasonic properties of bone investigated using a phantom material ». *Osteoporosis International* 7 (4): 370-75.

Tancred, D. C., B. A. O. McCormack, et A. J. Carr. 1998. « A synthetic bone implant macroscopically identical to cancellous bone ». *Biomaterials* 19 (24): 2303-11.

Tomlinson, R. E., et M. J. Silva. 2013. « Skeletal blood flow in bone repair and maintenance ». *Bone Research* 1 (1): 311-22.

Turner, C. H., M. R. Forwood, et M. W. Otter. 1994. « Mechanotransduction in bone: do bone cells act as sensors of fluid flow? » *The Federation of American Societies for Experimental Biology* 8 (11): 875-78.

Ulrich, D, B van Rietbergen, A Laib, et P Ŗuegsegger. 1999. « The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone ». *Bone* 25 (1): 55-60.

Von Euw, S., Yan Wang, G. Laurent, C. Drouet, F. Babonneau, N. Nassif, et T. Azaïs. 2019. « Bone mineral: new insights into its chemical composition ». *Scientific Reports* 9: 8456.

Wang Y. 2012. « Elaboration de modèles collagène/apatite pour l'étude de la biominéralisation du tissu osseux ». Matériaux. Université Pierre et Marie Curie – Paris VI. Français. NNT : 2012PAO66484. Tel-00839469.

Wang Y., T. Azaïs, M. Robin, A. Vallée, C. Catania, P. Legriel, G. Pehau-Arnaudet, F. Babonneau, M.-M. Giraud-Guille, et N. Nassif. 2012. « The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite ». *Nature Materials* 11 (8): 724-33.

Wang, Y., S. Von Euw, G. Laurent, C. Crevant, L. Bonhomme-Coury, M.-M. Giraud-Guille, F. Babonneau, N. Nassif, et T. Azaïs. 2014. « Impact of collagen confinement vs. ionic substitutions on the local disorder in bone and biomimetic apatites ». *Materials Horizons* 1 (2): 224-31.

Wang Y., J. Silvent, M. Robin, F. Babonneau, A. Meddahi-Pellé, N. Nassif, et M. M. Giraud Guille. 2011. « Controlled collagen assembly to build dense tissue-like materials for tissue engineering ». *Soft Matter* 7 (20): 9659-64.

Whitehouse, W J, E D Dyson, et C K Jackson. « The scanning electron microscope in studies of trabecular bone from a human vertebral body. » *Journal of Anatomy* 108: 481-96.

Williams, J. L., M. J. Grimm, F. W. Wehrli, K. R. Foster, et H-W. Chung. 1996. « Prediction of frequency and pore size dependent attenuation of ultrasound in trabecular bone using Biot's theory ». In *Mechanics of Poroelastic Media*, édité par A. P. S. Selvadurai, 263-71. *Solid Mechanics and Its Applications*. Springer Netherlands.

Yamamoto, T., T. Hasegawa, M. Sasaki, H. Hongo, C. T., Z. Liu, M. Li, et N. Amizuka. 2012. « Structure and formation of the twisted plywood pattern of collagen fibrils in rat lamellar bone ». *Microscopy* 61 (2): 113-21.

Chapitre 3 : Vers l’os cortical par une structuration microfluidique des ostéons

Table des matières du Chapitre 3

Chapitre 3 : Vers l'os cortical par une structuration microfluidique des ostéons 129

I. Construction du modèle microfluidique 135

II. Etude de facteurs physico-chimiques pouvant contrôler l'organisation cristal-liquide 143

1. Effet de confinement 144
2. Effet de la concentration en collagène 147
3. Effet de surface de la chambre microfluidique 150
4. Effet de la géométrie du réseau de plots 152
5. Effet de la force ionique en vue de la co-précipitation collagène/hydroxyapatite .. 155

III. Défauts topologiques des organisations cristal-liquides 161

IV. Conclusion 168

Références bibliographiques 171

Afin de pouvoir reproduire l'organisation suprafibrillaire hiérarchique du tissu à l'échelle de l'os cortical dans le but d'identifier les paramètres physico-chimiques impliqués dans le processus de morphogénèse du tissu osseux, nous avons mis en place différents modèles intégrant les données recueillies dans le chapitre précédent sur les distances interdomaines. L'objectif est ici d'appliquer *in vitro* des contraintes géométriques sur les mésophases de collagène afin de contrôler l'arrangement tridimensionnel des domaines anisotropes et leur distribution spatiale. Les contraintes imposées visent à mimer celles qui peuvent être impliquées *in vivo* à l'échelle suprafibrillaire, tels que les canaux de Havers dans le cas de l'os cortical. Notons que l'on s'est affranchit ici du réseau cellulaire formé par les ostéocytes afin de simplifier dans un premier temps cette étude.

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence un effet de confinement sur l'organisation tridimensionnelle du collagène. Les travaux de la littérature montrent qu'un effet de cisaillement sur l'auto-assemblage de biopolymères (*i.e.* collagène, chitine, cellulose) résulte en une organisation unidirectionnelle des domaines cholestériques qui semblent ainsi dirigés par la surface en contact de la solution cristal-liquide et par le sens de la pression d'aspiration au sein du capillaire (Gobeaux *et al.* 2008 ; Belamie *et al.* 2006 ; Cherpak *et al.* 2018). Pourtant *in vivo*, si on observe des domaines cholestériques alignés, la distribution plus complexe en 3D de ces domaines dans le matériau démontre que d'autres mécanismes sont mis en jeu.

Nous avons choisi d'effectuer les études par microfluidique qui est un procédé utilisant des fluides étudiés à l'échelle du micron au sein de canaux. Ce domaine de recherche permet l'étude de matériaux complexes à l'échelle micrométrique, et donc comprends l'échelle que nous souhaitions étudier. Les applications des systèmes microfluidiques dans la littérature sont étendues, allant de l'optique à l'astrobiologie en passant évidemment pas l'étude de modèles biomimétiques (Domachuk *et al.* 2009 ; Stone et Kim 2004 ; Tan et Desai 2003). Les biopolymères, comme le collagène, sont largement utilisés dans les systèmes microfluidiques, notamment pour la culture cellulaire (*Figure 1A, B et C*) (Paguirigan et Beebe 2006 ; Cabodi *et al.* 2005 ; Puleo *et al.* 2009 ; Hung et Lee 2007 ; Lee 2006 ; Lanfer *et al.* 2008 ; Guo et Kaufman 2007). Sans discuter de l'état du collagène (moléculaire ou fibrillaire) dans ces études, on voit ici aussi que le collagène est « simplement » aligné le long des canaux microfluidiques sur quelques microns (1-100 µm). L'organisation résultante du collagène en terme de densité n'est pas biomimétique du tissu biologique visé ici, à savoir l'os compact.

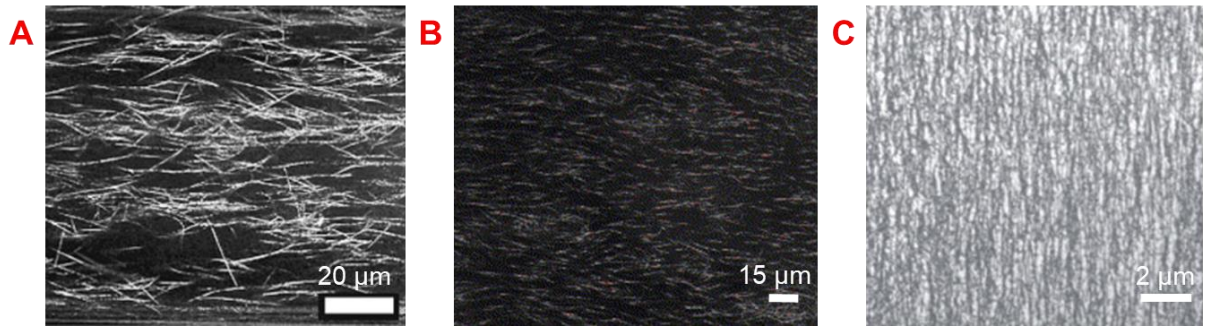


Figure 1 : Organisations du collagène sous confinement microstructuré. Microscopie confocale (A) 1,5 mg/mL, reproduit de Lee et al. 2006 ; (B) 2,5 mg/mL en présence d'un aimant et de billes magnétiques, reproduit de Guo et Kaufman 2007 ; (C) 0,8 mg/mL sur un substrat de POMA, reproduit de Lanfer et al. 2008.

Des modèles microfluidiques mimant l'organisation du tissu osseux ont précédemment été établis afin d'étudier certaines pathologies (Bersini *et al.* 2014), la vascularisation (Jusoh *et al.* 2015) ou les interactions cellules-médicaments/bactéries (Lee *et al.* 2012). Néanmoins, d'une part le design des systèmes microfluidiques utilisés n'est pas biomimétique des unités du tissu osseux, les distances micrométriques utilisés dans les modèles n'étant pas des ordres de grandeur de celles identifiées dans le tissu biologique, et d'autre part, l'environnement chimique n'est pas biomimétique de la matrice extracellulaire du tissu osseux car la composition (concentration en collagène) ne permet pas d'atteindre les organisations tridimensionnelles observées dans le tissu.

L'effet du confinement sur l'arrangement tridimensionnel de cristaux-liquides au sein de chambres micro-patternées et l'étude de leurs défauts topologiques ont déjà été étudiés dans la littérature (*Figure 2*) (Opathalage *et al.* 2019 ; Kim *et al.* 2018 ; Saw *et al.* 2017 ; Kawagushi *et al.* 2017). Notons que si les échelles de grandeurs sont respectées, l'intégration de la « géométrie osseuse » n'est pas prise en compte dans le modèle (*Figure 2A*). A l'inverse, la mise en présence de plots au sein de la chambre microfluidique pour étudier la formation des défauts topologiques d'un cristal-liquide nématique, similaires à ceux que nous avons mis en place dans notre modèle plus loin dans ce chapitre, n'est pas effectuée à une échelle similaire à celle du tissu osseux (facteur 10) (*Figure 2B*). Néanmoins, certains modèles microfluidiques établis pour l'étude des défauts topologiques au sein de l'épithélium lors de l'extrusion cellulaire sont du même ordre de grandeur que le tissu biologique visé (*Figure 2C*) et confortent l'hypothèse de l'existence d'analogues cristal-liquides aux tissus biologiques (Bouligand 1978).

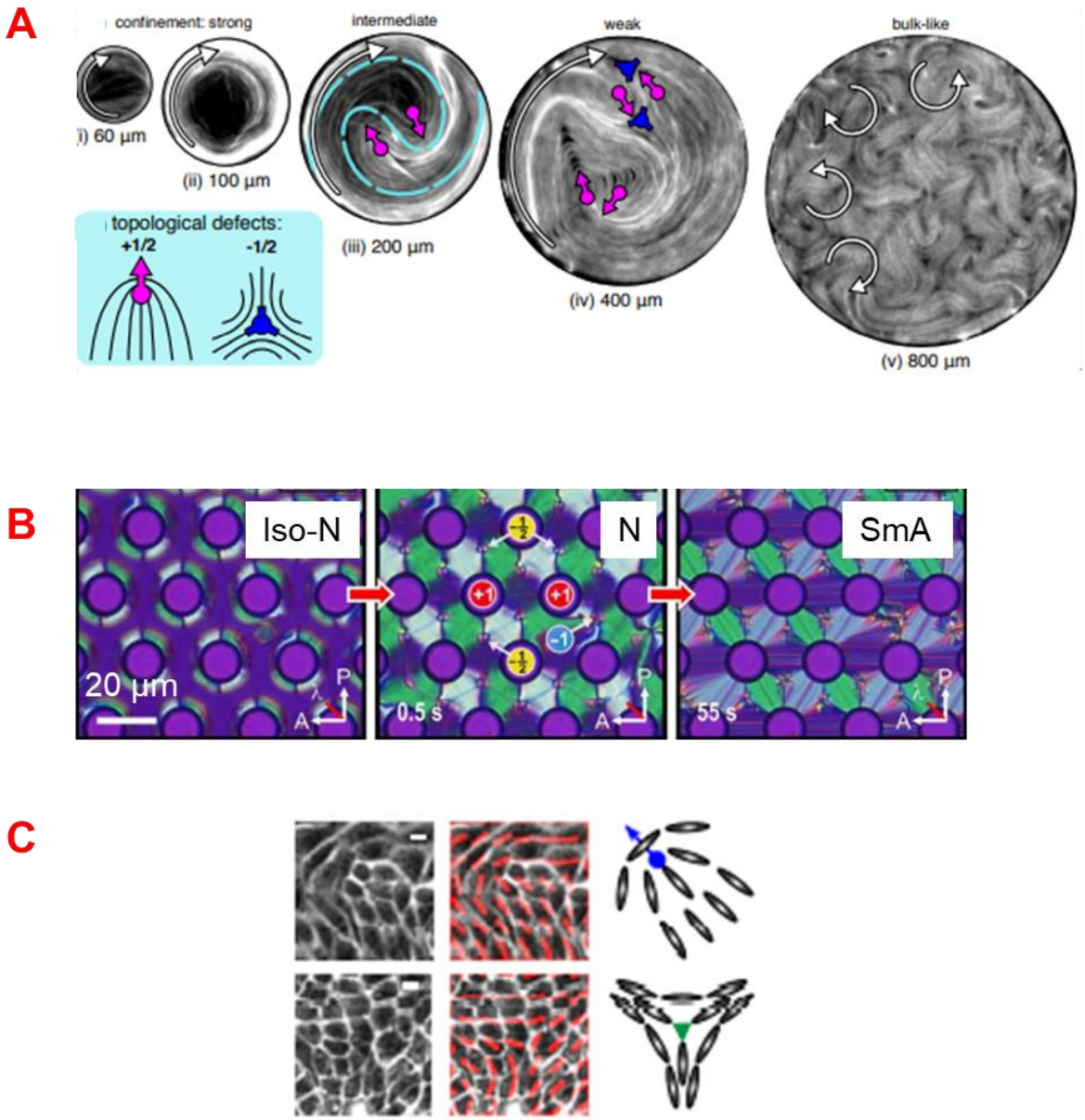


Figure 2 : Défauts topologiques des cristaux liquides étudiés par structuration microfluidique. (A) Microscopie à fluorescence du nématique selon différents régimes de confinements. Les flèches blanches indiquent la circulation du nématique, le cyan la double spirale, le bleu et la magenta, les défauts topologiques de charge -1/2 ou +1/2, reproduit de Opathalage et al. 2019 ; (B) Clichés en MOLP de l'évolution d'un système isotrope-nématique-smectique A. La croissance des domaines nématiques résulte en la formation de défauts -1/2, reproduit de Kim et al. 2018 ; (C) Clichés en microscopie confocale des défauts +1/2 et -1/2 au sein d'un modèle microfluidique mimant l'extrusion cellulaire, reproduit de Saw et al. 2017.

La mise en évidence de défauts dans le tissu osseux n'a pas été directement étudiée dans la littérature. Cependant, quelques travaux notent la présence de différentes morphologies d'ostéons (*Figure 3A*) (Skedros *et al.* 2016/2009 ; Pazzaglia *et al.* 2012). De par nos observations des travaux faits dans la littérature, nous ne pouvons qu'observer la présence de ces défauts (*Figure 3B*) (Granke *et al.* 2013). Néanmoins, aucune analogie avec les cristaux-liquides n'a été mise en avant dans ces observations. **Nous pensons que ces architectures tridimensionnelles sont directement liées par l'organisation d'analogues cristal-liquides au sein du tissu biologique.**

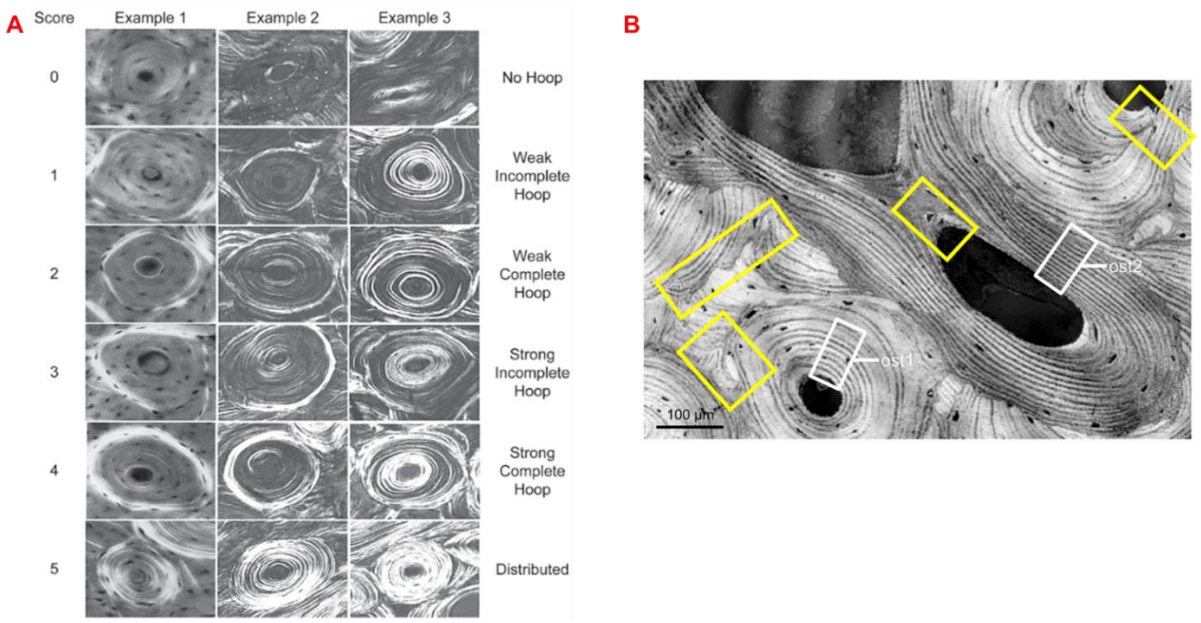


Figure 3 : (A) Clichés en MEB des différentes morphologies d'ostéons observées en coupe transverse, reproduit de Skedros et al. 2016 ; (B) cliché en microscopie acoustique de la présence de défauts d'organisations (rectangles jaunes ajoutés) au sein des ostéons, reproduit de Granke et al. 2013.

Pour pouvoir conclure, la topologie et la composition du tissu osseux devront être respectés dans notre modèle. Des observations en lumière polarisée linéaire et circulaire nous permettront d'étudier *in situ* la formation des domaines anisotropes et des défauts topologiques inhérents à cette organisation résultant de l'effet de confinement impliqué par la géométrie de notre modèle. Le rôle de la présence de ces défauts topologiques n'a pas été étudié dans cette partie mais il serait pertinent d'approfondir cet aspect.

I. Construction du modèle microfluidique

Comme décrit dans le chapitre précédent, l'os cortical est composé de lamelles osseuses formant des unités cylindriques, les ostéons, qui s'organisent de façon concentrique. Les ostéons sont creusés en leur centre par les canaux de Havers.

Toutes les étapes de la construction de la chambre microfluidique mimétique de l'os cortical initialement prévue sont décrites ci-après dans la *Figure 4*. Des chambres microfluidiques texturées ont été utilisées pour réaliser cette étude. Nos observations nous ont menées à estimer le diamètre moyen d'un ostéon et la distance inter-ostéons respectivement à 50-100 µm et 200 µm (*Figure 4A, Figure 4B et Tableau Chapitre 2*). Le procédé de fabrication de ces chambres en polydiméthylsiloxane (PDMS) par photolithographie et les différents paramètres des chambres sont détaillés dans le chapitre **Matériels et Méthodes** (Partie IV) (*Figure 4C*). Nous avons utilisé le PDMS pour ses nombreuses propriétés intéressantes telles que sa transparence permettant l'observation dus système en microscopie optique et sa maniabilité permettant de mouler des objets de taille micrométrique facilement.

La texture prend la forme d'un réseau de plots circulaires répartis de manière régulière à la surface de la chambre. La hauteur et le diamètre des plots sont respectivement d'environ 50 µm et 100 µm, et la distance inter-plots varient entre 75 et 240 µm. Ces plots représentent un « négatif » de l'os cortical (*Figure 4D*), chaque plot simule un canal haversien.

La stratégie prévue initialement consistait à associer le procédé de dialyse inverse/injection continue et les chambres microfluidiques (*Figure 4E*). En injectant en continu une solution de collagène, diluée à 1 mg/ml, au sein de la chambre, nous espérions pouvoir observer *in situ* (i) la formation de phases cristal-liquides, puis (ii) un arrangement concentrique du collagène autour des plots. L'injection était prévue pour être effectuée par les 4 côtés de la chambre afin de favoriser une diffusion « homogène » de la solution de collagène au sein de la chambre. Enfin, la concentration finale devait être contrôlée en plaçant une membrane de dialyse (*Figure 4E*) et en plongeant la chambre dans une solution acide de PEG (300 mg/mL) (*Figure 4F*) comme décrit pour les matrices denses de collagène concentrées par injection continue/dialyse inverse (Wang *et al.* 2011).

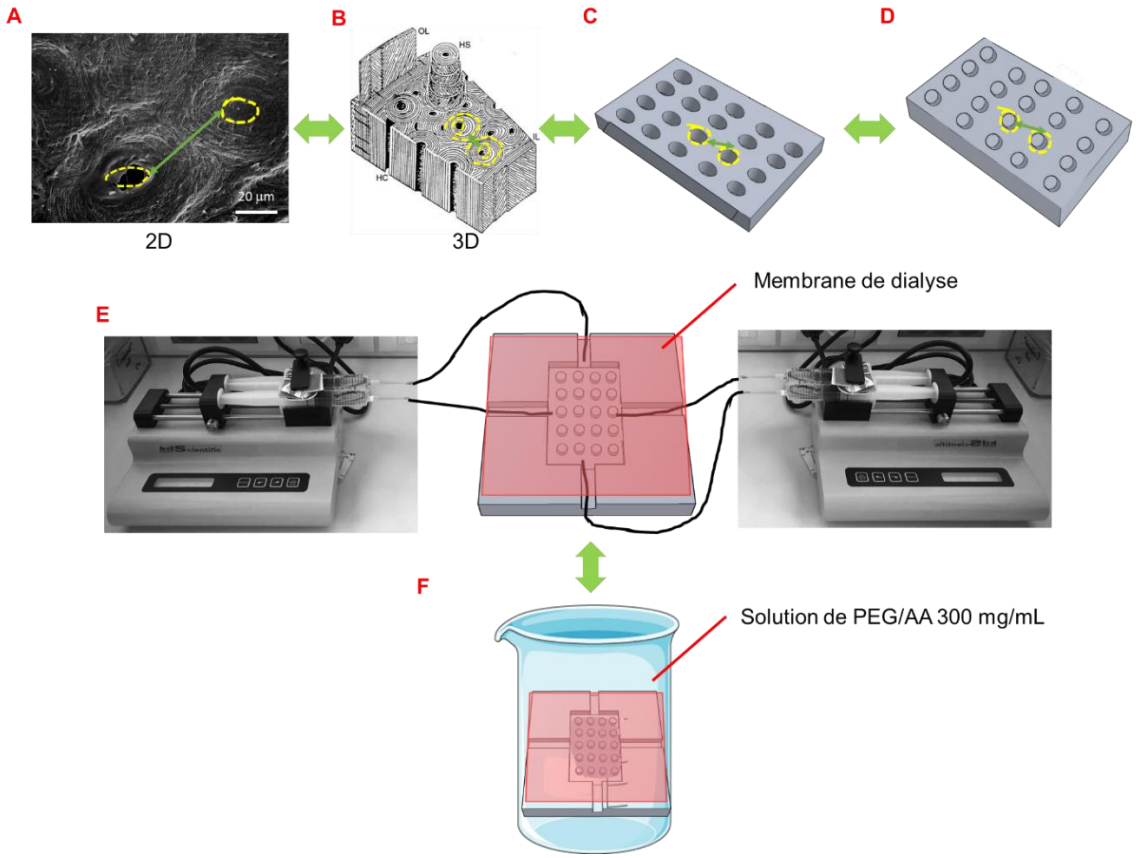


Figure 4 : Etapes décrivant la mise en place d'une chambre microfluidique mimant la structure de l'os compact = système haversien assimilé à un réseau de cylindres surlignés par des cercles jaunes pointillés et l'interdistance par une ligne verte. (A) Cliché en MEB d'une coupe transverse d'os compact humain décalcifié. Reproduit de Giraud-Guille 1994. (B) Schéma de l'organisation lamellaire d'un os compact long coupé transversalement. Les lamelles concentriques formant les ostéons sont disposées autour des canaux haversiens. Reproduit de Giraud-Guille 1988. (C) Schéma du masque lithographique représentant les canaux haversiens en résine SU-8. (D) Réplique négative du masque représentant le réseau de plots en PDMS. (E) (gauche et droite) Photo du montage d'injection continue de la solution de collagène diluée à 1 mg/ml au sein de la chambre microfluidique (centre) recouverte d'une membrane de dialyse. (F) Lors de l'injection de la solution de collagène, la chambre microfluidique est mise dans un bécher rempli d'une solution PEG/AA à 300 mg/mL afin d'atteindre une concentration finale à 250 mg/mL selon Wang et al. 2011.

Nous nous sommes heurtés à différents problèmes techniques qui n'ont pas rendu possible la mise en place d'un tel dispositif : (i) l'herméticité de la chambre n'a pas pu être parfaitement assurée car nous voulions récupérer la matrice de collagène pour les caractérisations structurales, il n'était donc pas possible de sceller la chambre microfluidique par plasma sur une lame de verre ; (ii) la membrane de dialyse n'a pas permis pas d'assurer un contrôle de la concentration au sein de la chambre car il a été impossible d'assurer un contact hermétique de la membrane sur la chambre ; (iii) la concentration de la solution de collagène par diffusion des solvants (H_2O, acide) au travers du PDMS a été rendue difficile par la pression de l'injection dans la chambre qui tend à décoller la chambre de la lame de verre ; et (iv) l'opacification de la chambre a rendu impossible des observations par lumière polarisée après 2 semaines d'injection, le PDMS étant à la base transparent. Ces problèmes ne sont pas observés dans le procédé d'injection continue/dialyse inverse classique car l'herméticité du système est assurée par le bouchon, la membrane de dialyse et le débit d'injection de la solution au sein du moule.

Il a donc été décidé d'aborder un montage microfluidique moins conventionnel que nous avons appelé ici microfluidique en « statique ». Ce procédé permet d'étudier les textures de biréfringence, c'est-à-dire l'arrangement des molécules de collagène en solution autour des plots pendant l'évaporation des solvants (H_2O, AAc) entre lame de verre et chambre microfluidique (*Figure 5A*). Le système est régulièrement contrôlé à différents temps par microscopie optique à lumière polarisée dans un premier temps, puis par microscopie optique à mesure polscope dans un deuxième temps.

Des solutions acido-solubles de collagène à différentes concentrations initiales (40, 50, 65 et 80 mg/ml) ont été préparées à partir de microparticules denses de collagène (Lama *et al.* 2020). Cette méthode permet de contrôler précisément la concentration initiale des solutions de collagène déposées dans les chambres. Elle rend donc cette étude plus systématique, le contrôle et la détermination des concentrations en collagène n'étant pas une tâche aisée à de telles concentrations. Comme décrit dans le chapitre **Matériels et Méthodes** (Partie III - 4), pour cela on pèse la masse de poudre de collagène que l'on mélange ensuite à une solution d'AAc (500 mM). Ces concentrations ont été choisies car elles correspondent à l'observation de différentes textures de biréfringences du diagramme de phase du collagène préalablement présenté dans le **Chapitre 1** ; 40 mg/mL étant la concentration en dessous de la concentration critique de formation des phases cristal-liquides. Un volume de solution de collagène (200 µL) est déposé sur une lame de verre (*Figure 5B1*), puis la chambre microfluidique est déposée par-dessus la solution (*Figure 5B2*), côté texturé sur le verre. Une pression homogène est exercée afin d'assurer un contact entre les plots et la lame de verre (*Figure 5B3*). Après 3 jours d'observations, le système est exposé aux vapeurs d'ammoniaque afin d'induire la précipitation des molécules de collagène en fibrilles. Les matrices de collagène sont nommées Coll/X/Y/Z, où X est la distance inter-plots de la chambre utilisée, Y la concentration de la solution initiale de collagène et Z la présence du plasma (P) ou des précurseurs minéraux (HA), le cas échéant. Le récapitulatif des différents paramètres étudiés est donné dans le ***Erreur ! Source du renvoi introuvable.*** de Matériels et Méthodes.

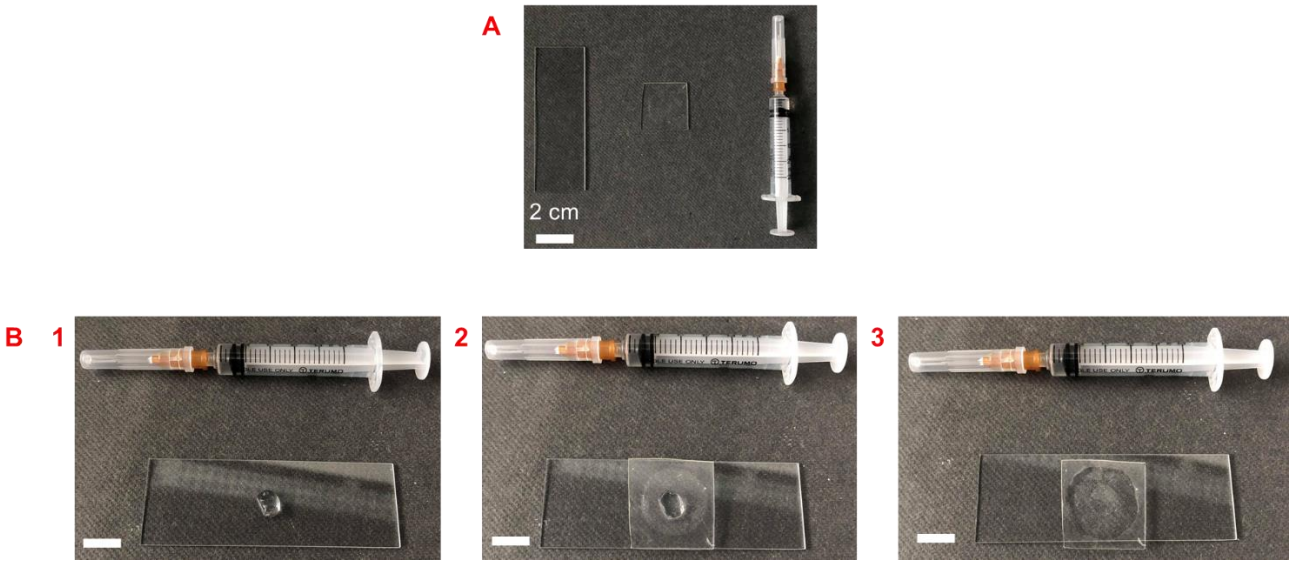


Figure 5 : Photo du système solution de collagène-chambre microfluidique texturée (A) et étapes de préparation du montage collagène-chambre (B) : (1) 200 µL de la solution de collagène sont déposés sur la lame de verre ; (2) la chambre est posée sur la goutte, texture tournée vers le bas ; (3) une pression homogène est exercée sur la chambre afin d'assurer le contact texturation-lame de verre.

De par la mise en place et l'évolution du système, plusieurs facteurs, schématisés en *Figure 6*, l'évaporation de surface au travers du PDMS, le cisaillement et la référence, ont été surveillés afin de pouvoir observer les effets des paramètres physico-chimiques que nous avions décidé d'étudier. La pression exercée afin d'assurer le contact entre les plots et la lame de verre entraîne un écoulement de la solution de collagène à l'intérieur de la chambre.

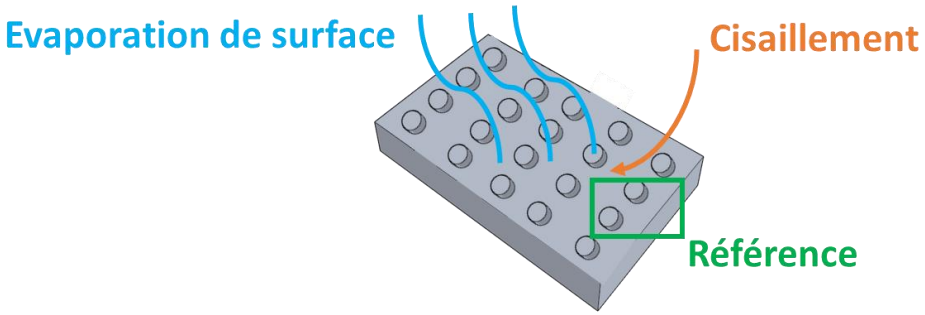


Figure 6 : Schéma représentatif des paramètres surveillés s'appliquant aux observations en lumière polarisée du système.

Des effets de cisaillement locaux sont appliqués à la solution de molécules de collagène lors de l'étalement de la goutte (*Figure 7*). Différentes directions de flux radiaux de la solution de collagène peuvent être observées en lumière polarisée (flèches blanches). La direction du flux dépend de la disposition des plots dans le réseau. Il est donc apparu nécessaire de laisser le système « s'équilibrer » avant de commencer les observations afin de laisser les molécules de collagène se réorganiser. Notons que la direction des molécules semble persister dans cet effet de cisaillement induit. Les observations en lumière polarisée ont donc été faites à « distance » de la zone de cisaillement afin de négliger les effets d'écoulements.

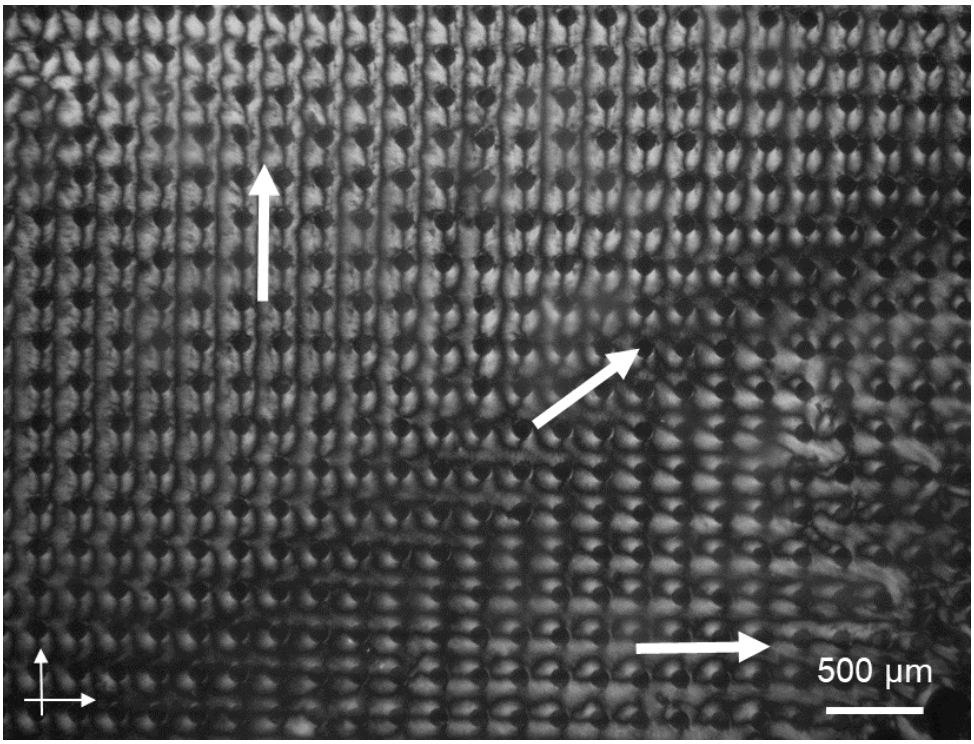


Figure 7 : Cliché en lumière polarisée des différentes directions de flux à t=J+2 sur l'échantillon Coll/120/8%. Les flèches indiquent le sens de cisaillement des molécules de collagène.

Entre lame de verre et PDMS, l'évaporation des solvants se fait par diffusion lente au travers de la surface en PDMS. Cette évaporation est cependant plus rapide par les côtés de la chambre et entraîne une concentration de la solution de collagène plus important aux bords. L'observation des textures de biréfringence par lumière polarisée (*Figure 8A*) est toujours mise en parallèle avec la lumière blanche (*Figure 8B*) afin de vérifier que les domaines observés soient toujours en solution cristal-liquide, c'est-à-dire que la solution de collagène n'ait pas séchée.

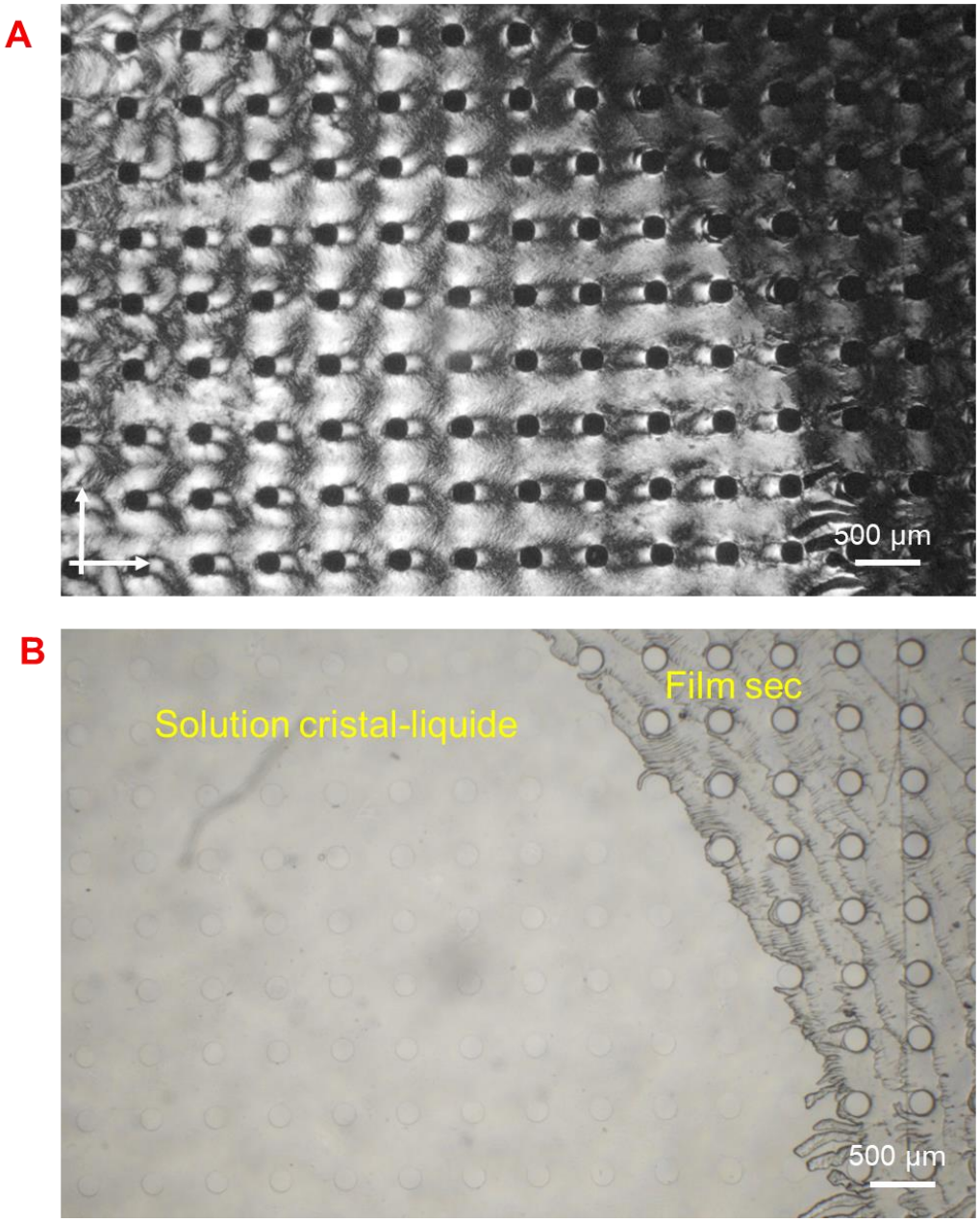


Figure 8 : Clichés en lumière polarisée (A) et en lumière blanche (B) de l'échantillon Coll/200/8% à t=J+7 mettant en parallèle la chambre où la solution cristal-liquide est encore liquide avec la formation d'un film sec.

Afin de s'assurer que les organisations observées soient bien induites par la géométrie des plots de la chambre microfluidique, les textures de biréfringence sur le « bord » de la chambre (sans plots) ont été utilisées en guise de référence. Dans la *Figure 9*, on observe bien qu'entre les plots, les textures de biréfringence observées s'apparentent à des organisations d'ordre nématique (jaune) et cholestérique (rouge), tandis que dans une zone dit de référence sans plots, on observe seulement de larges domaines homogènes d'alignements des molécules qui s'apparentent à une géométrie nématique (jaune).

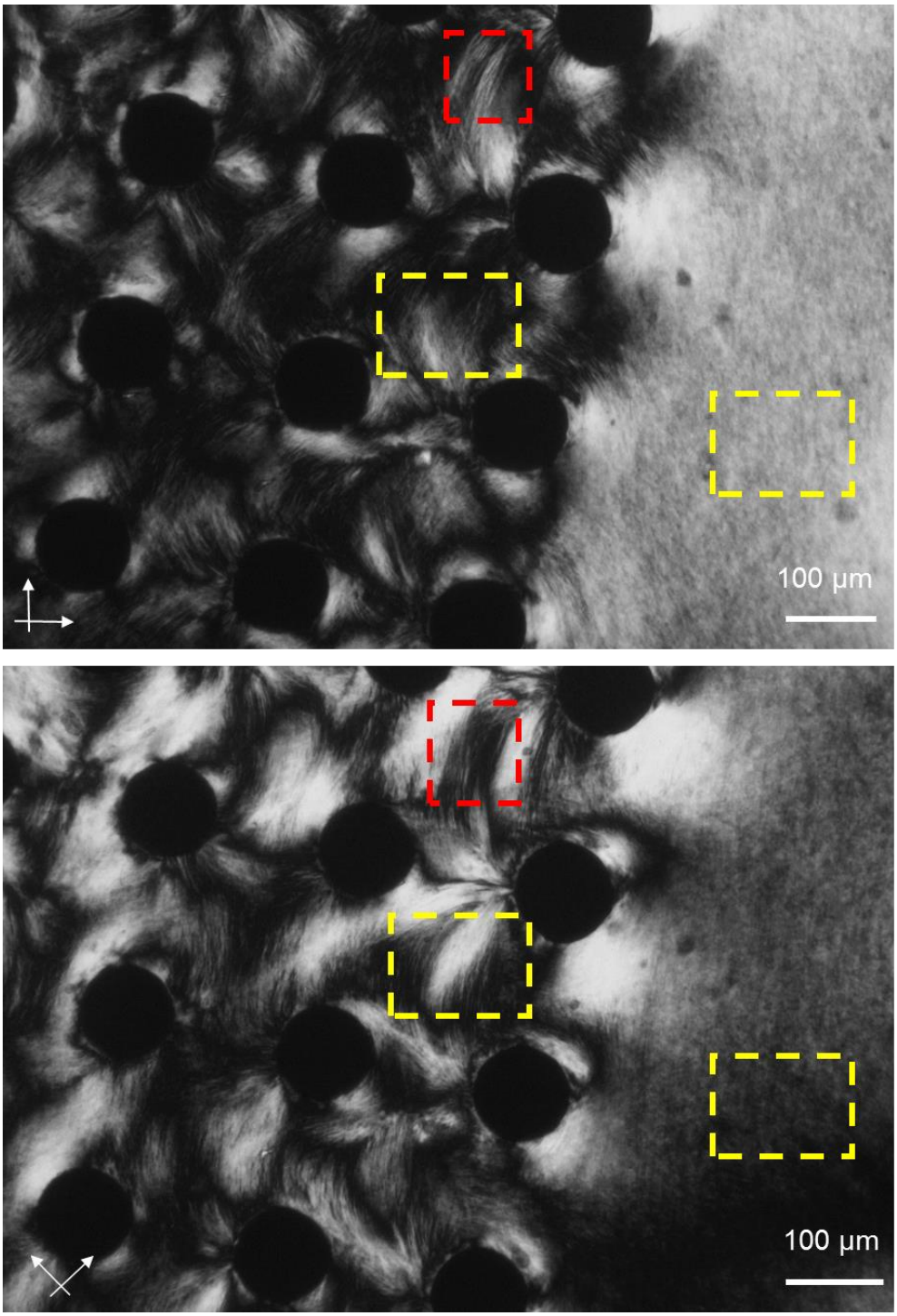


Figure 9 : Clichés en lumière polarisée de Coll/120/8% à t=J+2 mettant en évidence les différentes textures de biréfringence observées avec et sans plots : nématique (jaune) et cholestérique (rouge).

Le confinement entre les plots induit donc bien la formation de différentes textures de biréfringence de complexité supérieure, qui n'apparaissent pas dans une zone hors motif. Suite à ces d'observations, nous avons ensuite pu étudier l'effet de différents facteurs physico-chimiques au sein des chambres microfluidiques.

II. Etude de facteurs physico-chimiques pouvant contrôler l'organisation cristal-liquide

Plusieurs facteurs physico-chimiques pouvant influencer la géométrie des phases cristal-liquides du collagène (agencement des molécules) à l'échelle macroscopique ont été choisis afin d'identifier leur implication dans les organisations biologiques observées, à savoir : (i) le confinement, (ii) le diagramme de phase du collagène, (iii) les changements d'état de surface de la chambre microfluidique, (iv) la géométrie du réseau de plots et enfin (v) la présence de la phase minérale du tissu osseux. Les observations ont été limitées à un réseau de 4 plots à t=J+3 dans ce manuscrit. En effet, après trois jours d'étude, un « équilibre » est atteint, le système tend à ne plus évoluer et sèche. J'ai donc privilégié ici des planches réalisées proche du bord des chambres, là où le système évolue le plus rapidement.

Notons qu'il est difficile parfois d'observer les domaines cristal-liquides s'apparentant à une géométrie cholestérique car les tailles de domaines observés en lumière polarisée ici ne sont pas continus comme dans le tissu osseux. Observer localement à travers le PDMS, dont l'épaisseur n'est pas homogène suivant la chambre, est donc une contrainte qui a limité nos observations à différents grandissements.

En parallèle, la répétition des organisations cristal-liquides observées dans nos modèles nous a permis d'aborder les notions d'ancrage, de longueur de persistance et de défauts topologiques présentées brièvement dans le **Chapitre 1**. Nous n'avons pas établi de modèle théorique ou effectué de calculs par rapport à ces observations, nous nous sommes concentrés sur la présence de ces phénomènes dans nos chambres.

Les planches illustrant les organisations à plus petit grandissement sont présentées en **Annexes**. Les préparations et les traitements de toutes les matrices sont résumés dans le *tableau* dans le chapitre **Matériels et Méthodes**.

1. Effet de confinement

Nous avons vu dans le **Chapitre 2**, l'influence de billes de verre sur l'organisation des phases cristal-liquides du collagène en fonction de leur distance. Pour étudier ce confinement plus rigoureusement, des premiers modèles microfluidiques ont été construits en faisant varier la distance entre les plots, mimant ainsi la distance interostéons dans le tissu osseux. Nous avons sélectionné ici 4 distances inter-plots (75, 120, 200 et 240 µm) qui visent à borner les distances préalablement déterminées dans le **Chapitre 2**.

La *Figure 10* résume les observations par lumière polarisée effectuées après 3 jours de concentration de la solution de collagène, soit 12 heures où la cinétique de transformation de phase évolue à TA, à une concentration initiale en collagène de 40 mg/mL. On constate qu'en fonction de la distance inter-plots, différentes textures de biréfringence peuvent être observées dans une même chambre. L'identification des phases n'est pas aisée, néanmoins on peut observer des agencements classiques décrits pour le collagène (Giraud-Guille et Besseau 1998). Cette disparité d'organisations est dépendante de la distance entre les plots à laquelle elles sont observées. Des domaines identifiés comme nématique (jaune), précholestérique (orange) et cholestérique (rouge) ont été à titre d'exemples encadrés sur les clichés.

Pour une distance inter-plots de 75 µm (*Figure 10A*), des textures sous forme d'alignements et d'ondulations respectivement caractéristiques d'organisations nématiques et précholestériques sont observées. Cependant, nous avons constaté lors de nos observations que la solution de collagène avait tendance à sécher plus rapidement pour cette distance inter-plots particulière. Nous n'avons pas pu expliquer ce phénomène avec plus de précisions. Pour l'étude des autres paramètres, nous avons donc décidé d'écarter cette interdistance.

Pour une distances inter-plots de 120 µm (*Figure 10B*), on observe de larges domaines nématiques et la formation de domaines précholestériques et des domaines précholestériques/cholestériques.

Pour une interdistance de plots de 200 µm (*Figure 10C*), la présence de domaines nématiques et précholestériques est observée. L'alternance régulière de bandes sombres et claires formant un motif d'empreintes digitales (Giraud-Guille 1989) témoigne également de la présence de domaines cholestériques. Ainsi, ces organisations se rapprochent de celles observées dans les ostéons (Giraud-Guille 1988).

Pour une distance inter-plots de 240 µm (*Figure 10D*), des domaines nématiques sont observés, avec semble-t-il des domaines cholestériques, par l'agencement plus régulier d'alternances de bandes sombres et claires. Ces domaines sont intercalés avec des domaines qui semblent isotropes, car ils restent sombres après rotation de 45° de l'analyseur et du polariseur. Cette observation indique que la distance inter-plots est trop grande pour étudier un effet de confinement dans les conditions fixées.

De ces observations, pour les études des autres paramètres, nous avons sélectionné la chambre dont la distance inter-plots est 200 µm. Les observations de confinement à cette interdistance confortent l'échelle des distances interostéons validée dans le chapitre précédent.

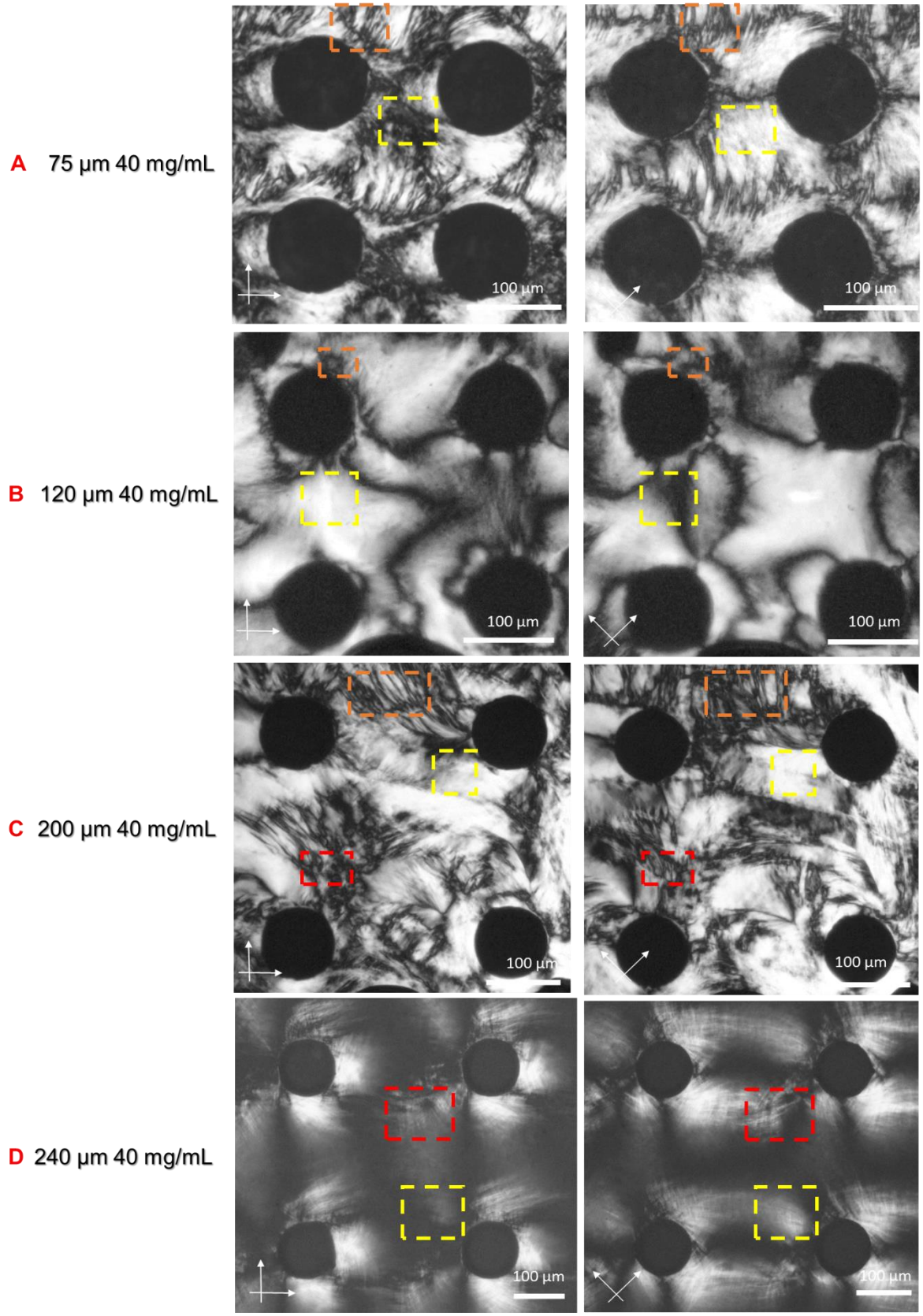


Figure 10 : Observations en lumière polarisée des textures de biréfringence à partir d'une solution initiale de collagène de 40 mg/mL après t=J+3 dans les chambres microfluidiques dont la distance inter-plots est respectivement 75 (A), 120 (B), 200 (C) et 240 µm (D). Nématique (jaune), précholestérique (orange) et cholestérique (rouge).

D'un point de vue physico-chimique, le collagène est une molécule semi-rigide (Sun *et al.* 2002) avec une longueur de persistance comprise entre 12 et 40 nm dans l'eau (Lovelady *et al.* 2013) et 161 nm dans l'acide acétique (Amis *et al.* 1985). La longueur de persistance permet de caractériser la rigidité intrinsèque d'un polymère. La répétition sur plusieurs réseaux de plots de l'organisation cristal-liquide indique une anisotropie à grande échelle. Cependant, comme nous le verrons plus loin dans le chapitre, la notion d'ancrage à la surface du verre et du PDMS induit ces organisations.

Même s'il est difficile de conclure quant à la concentration du collagène à un temps t étant donné que l'évaporation des solvants au sein de la chambre n'est pas forcément homogène, l'observation de différentes phases cristal-liquides au sein des chambres confirme l'intérêt de travailler avec une interdistance biomimétique de plots de 200 µm. Des études en atmosphère contrôlée (température, pression), comme cela avait été envisagé initialement, seraient bien entendu plus concluantes Néanmoins, les observations menées en lumière polarisée nous ont permis de démontrer qu'**en jouant sur la distance inter-plots**, nous pouvions **contrôler l'auto-assemblage des molécules de collagène autour des plots**.

2. Effet de la concentration en collagène

Comme indiqué en début de chapitre, plusieurs solutions acido-solubles de collagène ont été préparées. L'effet possible de la concentration en collagène sur les assemblages observés a été étudié en changeant la concentration initiale de la solution de collagène soit donc 40, 50, 65 et 80 mg/mL, correspondant respectivement à des agencements isotropes, précholestériques P*, précholestériques P et cholestérique selon la littérature (Salameh *et al.* 2020). Nous avons étudié l'évolution des textures de biréfringence à une distance inter-plots fixée à 200 µm, qui est la distance moyenne que nous avons estimée sur nos observations précédentes, pendant 3 jours d'évaporation lente des solvants. La *Figure 11* représente les observations à t=J+3

De façon intéressante, des textures de biréfringence associées à une géométrie nématique sont observées à t=0 (**Annexe**) même avec la solution de collagène à 40 mg/mL, qui est la concentration en dessous de la transition isotrope-anisotrope. Ceci peut être dû aux effets de cisaillement induits par la seringue et la pression de la chambre microfluidique sur la lame de verre. Après trois jours d'étude, des domaines nématiques, précholestériques et cholestériques peuvent être observées par lumière polarisée (respectivement encadrés jaunes, oranges et rouges) (*Figure 11A, B, C et D*). Cependant, on observe que la coexistence de ces organisations à un même temps n'est pas aussi bien marquée ; la géométrie observée sur l'ensemble des chambres tend à être plus homogène. De manière intéressante, les organisations observées à une concentration initiale en collagène de 65 mg/mL (*Figure 11C*) rappellent celles de coupes transverses d'ostéons dits « clairs » (Ascenzi et Bonucci 1968 ; Giraud-Guille 1988) (*Figure 12*).

Comme mentionné précédemment, la concentration du collagène au sein de la chambre ne peut être spécifiquement déterminée lors des observations *in situ*. De plus, la température de la pièce n'étant pas contrôlée (20 °C ± 2°C) avec précision, elle peut aussi avoir un impact sur ces transitions de phases (Engel et Catchpole 1970). Ainsi, il est difficile de conclure si les agencements observés s'effectuent aux mêmes concentrations que celles discutées pour le diagramme de phase (Giraud-Guille et Besseau 1998 ; Gobeaux *et al.* 2007) ou si la cinétique y est modifiée. Néanmoins, une comparaison systématique à partir de différentes concentrations peut nous aider à identifier d'éventuelles modifications sur les organisations résultantes.

La concentration initiale de la solution acido-soluble de collagène ne semble pas affecter le processus d'auto-assemblage des molécules de collagène. Ce facteur physico-chimique permet une cinétique plus rapide lorsque la concentration est initialement plus élevée (65 ou 80 mg/mL). Cependant, (i) la présence de domaines cholestériques dans le tissu biologique est avérée (Giraud-Guille *et al.* 2005), or l'analogue cristal-liquide *in vitro* d'une telle organisation est observé en lumière polarisée à partir d'une concentration en collagène de 80 mg/mL, ce qui n'est pas le cas dans notre modèle microfluidique où l'on observe des domaines apparentés à une géométrie précholestérique P* (*Figure 11D*) ; et (ii) sur la même figure, la présence de domaines isotropes (flèche) est observée. La présence de telles organisations paraît surprenante *in vitro*, or, *in vivo* la présence de domaines isotropes a été étudiée dans le tissu osseux (Weiner *et al.* 1999 ; Reznikov *et al.* 2014).

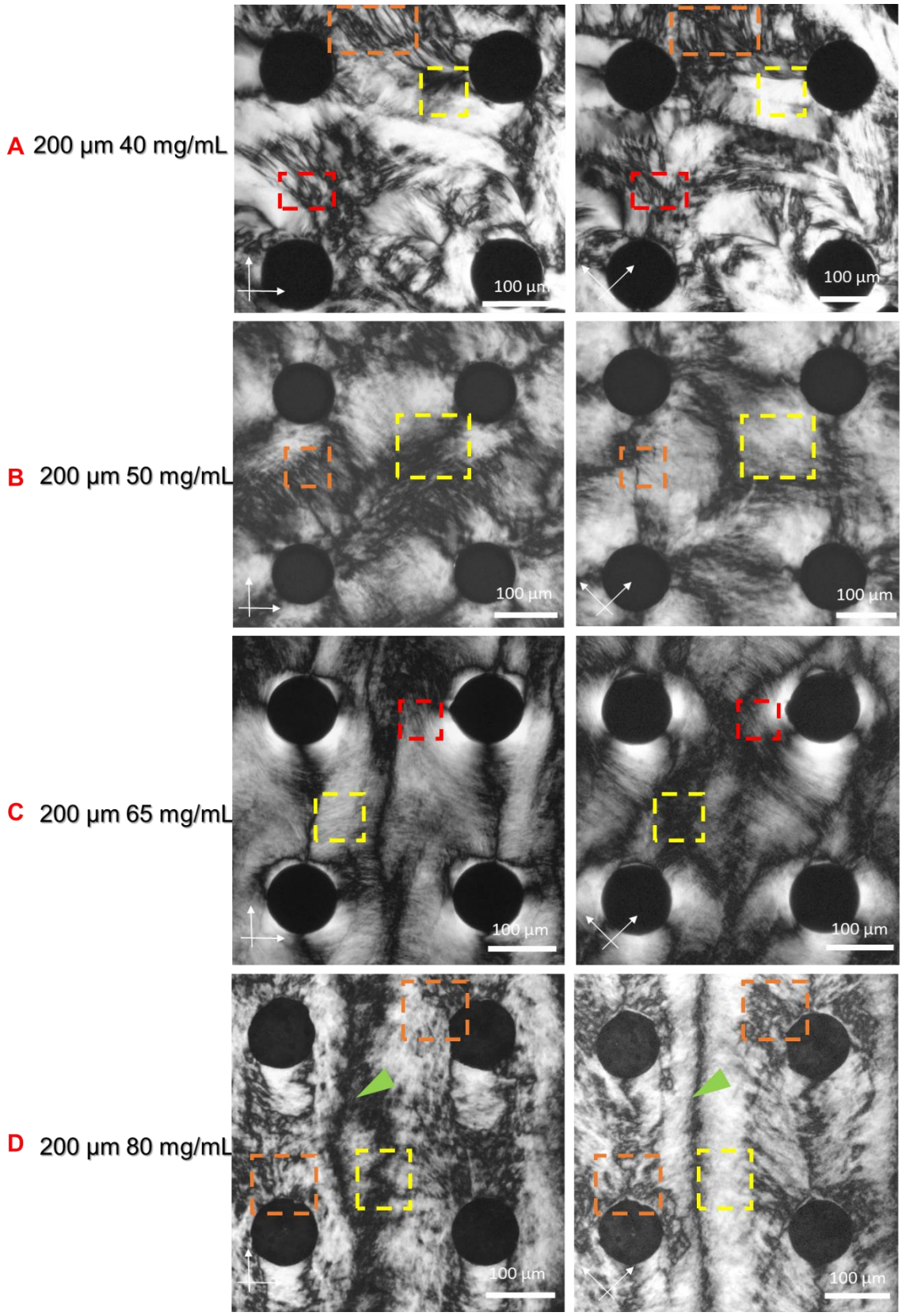


Figure 11 : Observations en lumière polarisée des textures de biréfringence en fonction de la concentration initiale en collagène à t=J+3 dans une chambre microfluidique avec interdistance de 200 µm : 40 (A), 50 (B), 65 (C) et 80 (D) mg/mL.

Les observations les plus intéressantes dans une perspective de biomimétisme semblent être obtenus pour les cellules 200 µm avec une concentration initiale de collagène à 65 mg/mL. Après 3 jours étude, la concentration en collagène peut avoir dépassé la concentration critique de transition précholestérique/cholestérique à 80 mg/mL *in vitro*. En effet, si on fait le parallèle avec la chambre à 40 mg/mL où l'on observe des domaines précholestériques normalement observés au-dessus de 45 mg/mL, une augmentation de l'ordre de 15 mg/mL semble être atteinte au sein des chambres après 3 jours. Pour la suite, nous nous sommes limités à l'utilisation des solutions de collagène concentrées à 40 comme témoin et à 65 mg/mL comme modèle à développer.

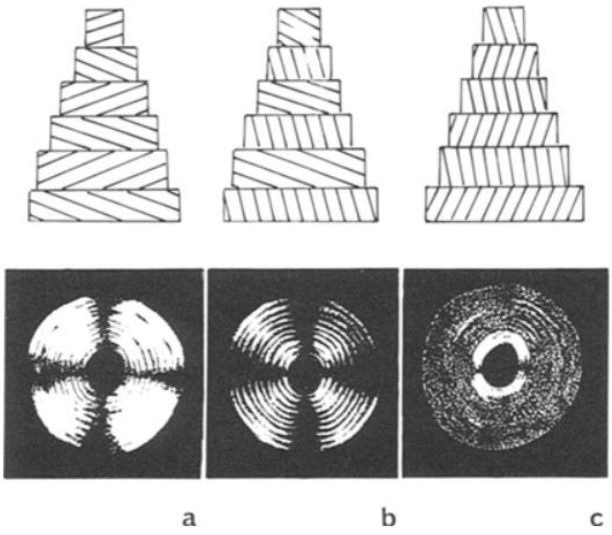


Figure 12 : Représentations schématiques des différentes orientations fibrillaires des ostéons et leur observation respective en lumière polarisée : a) ostéon clair ; b) ostéon intermédiaire et c) ostéon sombre. Reproduit de Giraud-Guille 1988.

3. Effet de surface de la chambre microfluidique

Les chambres microfluidiques sont fabriquées en PDMS, qui est un élastomère de la famille des siloxanes. Après réticulation, le PDMS est hydrophobe grâce aux groupements méthyls présents en surface. Or, nos solutions acido-solubles de collagène contiennent de l'eau. Il nous a donc semblé pertinent d'étudier l'organisation tridimensionnelle du collagène en modifiant la surface du PDMS pour confirmer la pertinence de notre modèle microfluidique.

Pour cela, les chambres microfluidiques ont été placées pendant 30 secondes sous plasma O_2 afin de nettoyer et d'activer la surface pour la rendre hydrophile pour le début de l'étude. Dans la littérature, il est démontré que la formation de groupements silanols par prétraitement plasma permet d'augmenter l'adsorption de biomolécules à la surface du PDMS (Jastrzebska *et al.* 2018). Nous avons étudié l'effet de l'état de surface sur une chambre d'interdistance de plots 200 µm à 40 et 65 mg/mL, mais les observations ont mené aux mêmes résultats. Nous montrons ici en *Figure 13*, les observations en lumière polarisée sur un réseau de 15 plots après deux jours d'évaporation.

Les mêmes textures de biréfringence sont observées à la différence près que la longueur de persistance de la molécule de collagène semble plus grande sans (*Figure 13A*) qu'avec traitement plasma (*Figure 13B*). En effet, comme discuté précédemment, la flexibilité de la molécule de collagène lui permet de s'organiser tridimensionnellement. Dans nos modèles, les molécules sont ancrées à la surface selon un ancrage planaire (Oswald et Pieranski 2000), c'est-à-dire qu'elles sont parallèles à la surface du PDMS. Sur une surface hydrophile, les molécules de collagène ne peuvent plus s'ancrer sur le PDMS, les organisations cristal-liquides ne sont pas les mêmes d'un réseau de plots à l'autre. Les ancrages des molécules mènent à la formation de défauts topologiques caractéristiques des phases cristal-liquides observées, nous reviendrons plus tard sur ces phénomènes dans le chapitre.

Malgré cette différence, l'organisation similaire entre les 2 échantillons nous indique qu'un traitement plasma n'est pas nécessaire pour notre modèle microfluidique. En effet, de nombreux travaux dans la littérature montrent que, même si la surface est hydrophobe, le PDMS peut adsorber des biomolécules, dont le collagène, à la surface (Toepke et Beebe 2006).

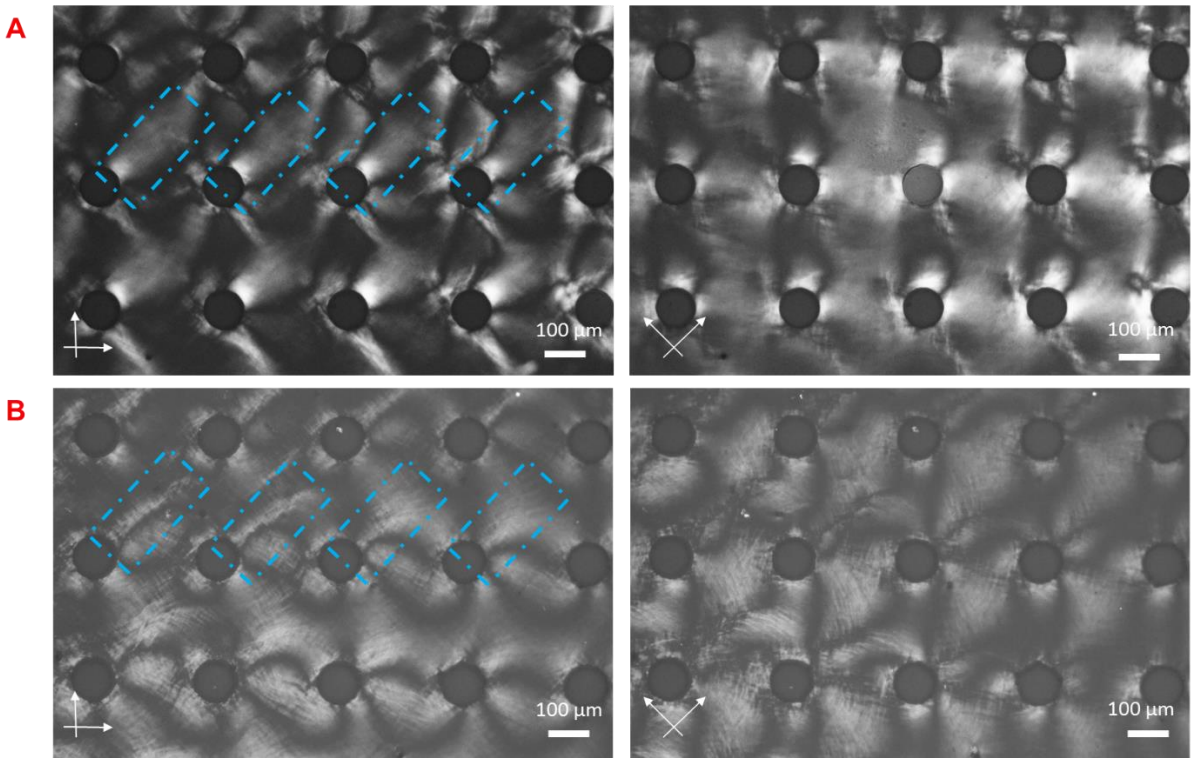


Figure 13 : Observations en lumière polarisée des textures de biréfringence à t=J+3 au sein d'une chambre microfluidique d'interdistances de plots de 200 µm à une concentration initiale de 40 mg/mL de la solution de collagène. (A) sans traitement et (B) avec traitement plasma.

4. Effet de la géométrie du réseau de plots

Dans les chambres microfluidiques utilisées jusqu'à présent, les plots sont disposés dans un réseau carré (*Figure 14A*). Ici, un nouveau modèle de texturation microfluidique a été utilisé, basé sur un pavage de Penrose de type 3 de quasi-symétrie 5 (*Figure 14B et C*). Les plots sont alors organisés dans un arrangement apériodique de deux différents losanges. **Nous avons fait ici l'hypothèse que créer localement du désordre dans le réseau de plots, pouvait déstabiliser l'organisation tridimensionnelle répétitive du collagène.**

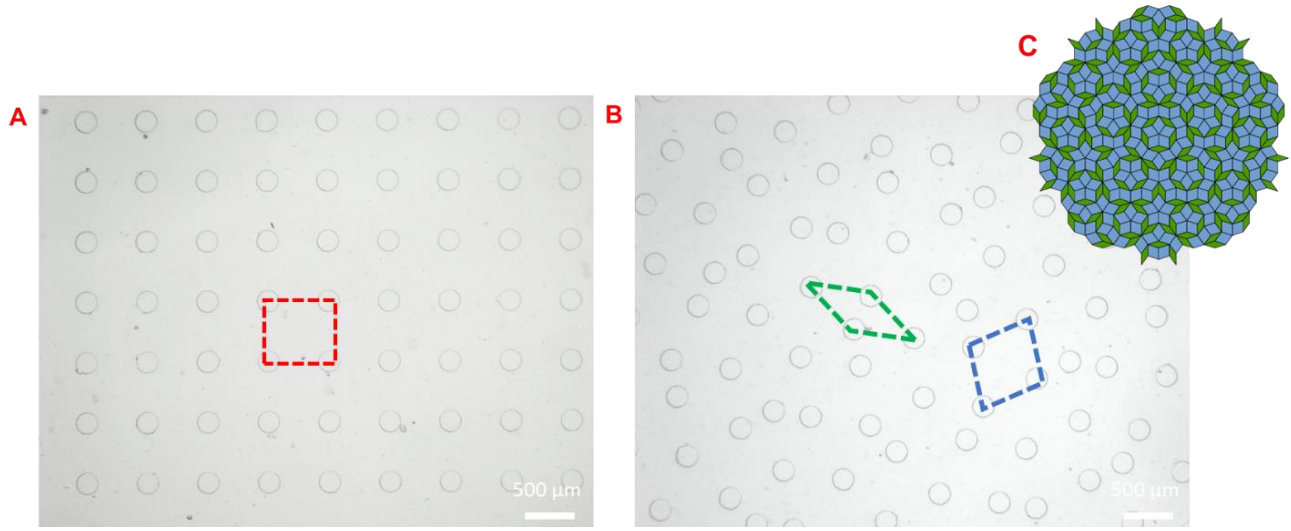


Figure 14 : Clichés en lumière blanche d'une chambre microfluidique texturée dont les plots sont disposés dans un réseau carré, surlignés par pointillés rouges (A) et dans un motif type pavage de Penrose de symétrie 3, surlignés par pointillés verts et bleus (B). (C) Représentation schématique d'un pavage de Penrose de symétrie 3. Le désordre local est induit par la juxtaposition de deux losanges différents.

Nous avons étudié le désordre en comparant les textures de biréfringence observées à t=J+3 à partir de notre concentration témoin (40 mg/mL) et de notre concentration d'étude (65 mg/mL) avec une chambre microfluidique d'interdistances de plots (réseau carré) de 200 µm et la chambre à motif pavage de Penrose.

Les observations en lumière polarisée montrent que les molécules de collagène s'auto-assemblent et qu'une répétition des textures de biréfringence est observée dans chaque réseau de 4 plots au sein d'un réseau carré (*Figure 15A et C*).

Ce qui contraste nettement avec les études précédentes est qu'au sein d'un réseau hétérogène (*Figure 15B et D*), différents domaines cristal-liquides coexistent selon la distance entre les plots dans un réseau apériodique (*Figure 15B*). De la même manière que précédemment, il est difficile d'observer la présence des domaines cholestériques du fait de l'épaisseur des chambres. Des domaines isotropes sont également observés lorsque la distance interplots augmente. Les auto-assemblages autour des plots ne sont pas reproductibles d'un réseau de plots à l'autre. Un désordre local du réseau de plots induit donc la formation de différents domaines cristal-liquides non répétitifs entre chaque réseau de plots. Ce modèle s'inscrit donc dans une démarche d'apparence plus biomimétique (différentes interdistances) que les modèles utilisés jusqu'à maintenant ici et dans la littérature (Jusoh *et al.* 2015 ; Blin *et al.* 2016). Cependant, il serait envisageable d'étudier l'organisation du collagène sur une chambre dont le motif serait totalement aléatoire (diamètre, interdistances, hauteur de plots).

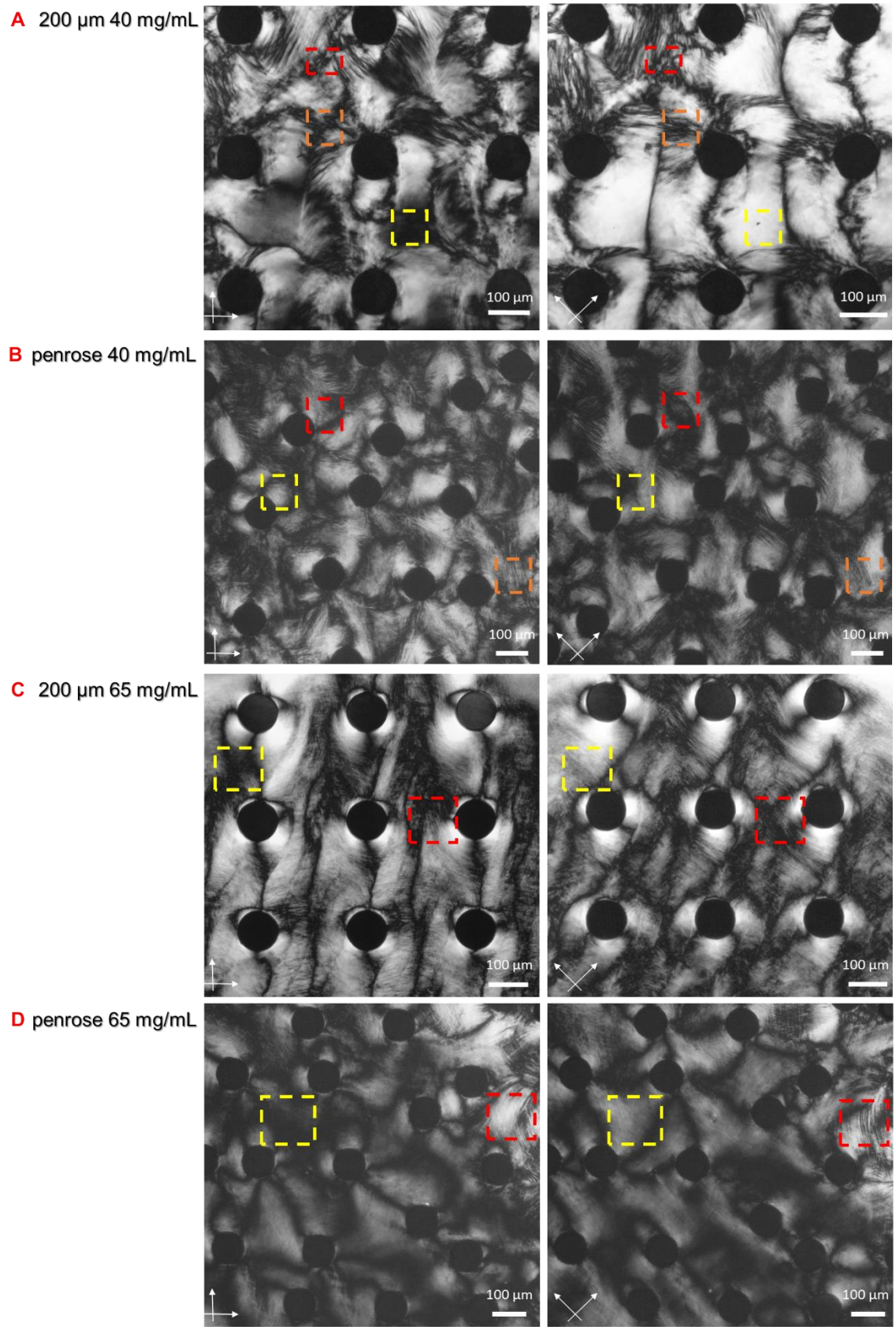


Figure 15 : Clichés en lumière polarisée des textures de biréfringence observées avec une concentration initiale en collagène de à 40 (A)(B) et à 65 mg/mL (C) (D) à t=J+3 d'une chambre microfluidique dont les plots sont organisés dans un réseau carré (A) (C) et dans un pavage de Penrose (B) (D). Nématique (jaune), précholestérique (orange) et cholestérique (rouge).

Or, comme nous l'avons montré *Figure 12* dans ce chapitre et en *Figure 8* du **Chapitre 2**, les travaux dans la littérature ont démontré que suivant l'orientation des molécules de collagène, l'observation des textures de biréfringence des ostéons est différente. On peut alors imaginer que les domaines cristal-liquides observés dans nos modèles sont issus de différentes orientations du contre-plaqué (Giraud-Guille 1988 ; Skedros *et al.* 2013).

5. Effet de la force ionique en vue de la co-précipitation collagène/hydroxyapatite

Pour pouvoir reproduire l'architecture du tissu osseux à l'échelle suprafibrillaire, les précurseurs minéraux acides de l'hydroxyapatite, dont la force ionique est identique à celle dans le plasma sanguin (Wang *et al.* 2012), ont été ajoutées dans la solution initiale de collagène. Les observations en lumière polarisée des textures de biréfringence sans (*Figure 16A*) et en présence (*Figure 16B*) des précurseurs minéraux d'hydroxyapatite ne permettent pas de conclure d'un effet de la phase minérale sur l'organisation résultante des molécules de collagène dans les conditions expérimentales établies. En effet, les mêmes textures de biréfringence sont observées (*Figure 11C*). Ceci est en accord avec les travaux précédents effectués au laboratoire mais sur des matrices de collagène en 3D de plus grands volumes (Wang *et al.* 2012). Nous sommes allés caractériser plus finement ces échantillons après remontée de pH pour induire la co-précipitation des molécules de collagène en fibrilles et des cristaux d'hydroxyapatite notamment afin de pouvoir observer ou pas le co-alignement des fibrilles et des cristaux d'hydroxyapatite caractéristique du tissu osseux (Weiner et Traub 1986 ; Fratzl *et al.* 2004).

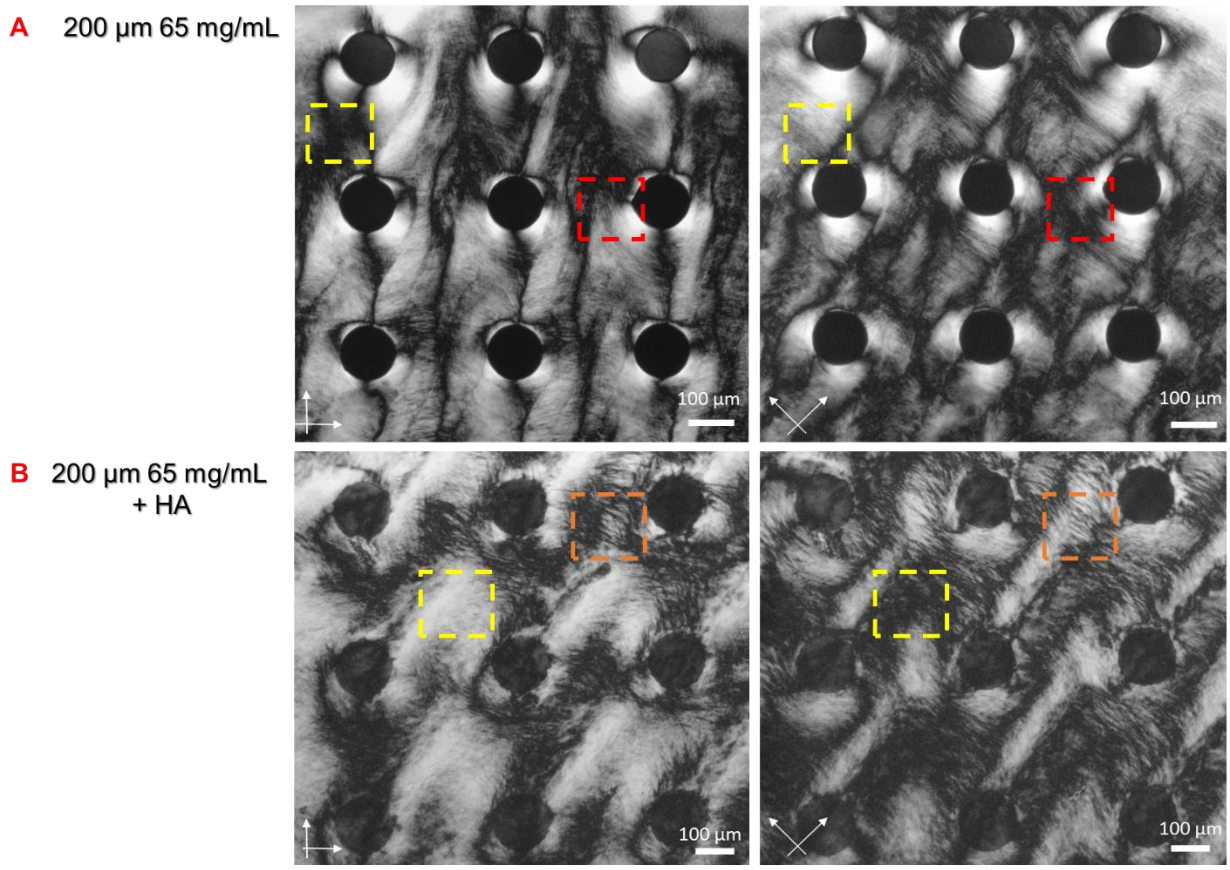


Figure 16 ; Clichés en lumière polarisée des domaines cristal-liquides observés à t=J+3 d'une solution de collagène concentrée à 65 mg/mL sans (A) et en présence (B) des précurseurs acides d'hydroxyapatite. Nématique (jaune), précholestérique (orange) et cholestérique (rouge)

Après remontée de pH, nous avons ensuite caractérisé la matrice fibrillaire. Par MEB, l'observation de l'orientation des fibrilles de collagène (*Figure 17*) est plus ardue même si on peut encore distinguer les organisations (flèche blanche/noire montrant respectivement un défaut ancré au plot et un arrangement concentrique). Ceci indique que le minéral est aligné avec le réseau tridimensionnel de fibrilles de collagène et qu'il n'y a pas de formation de sphérulites (Wang *et al.* 2012).

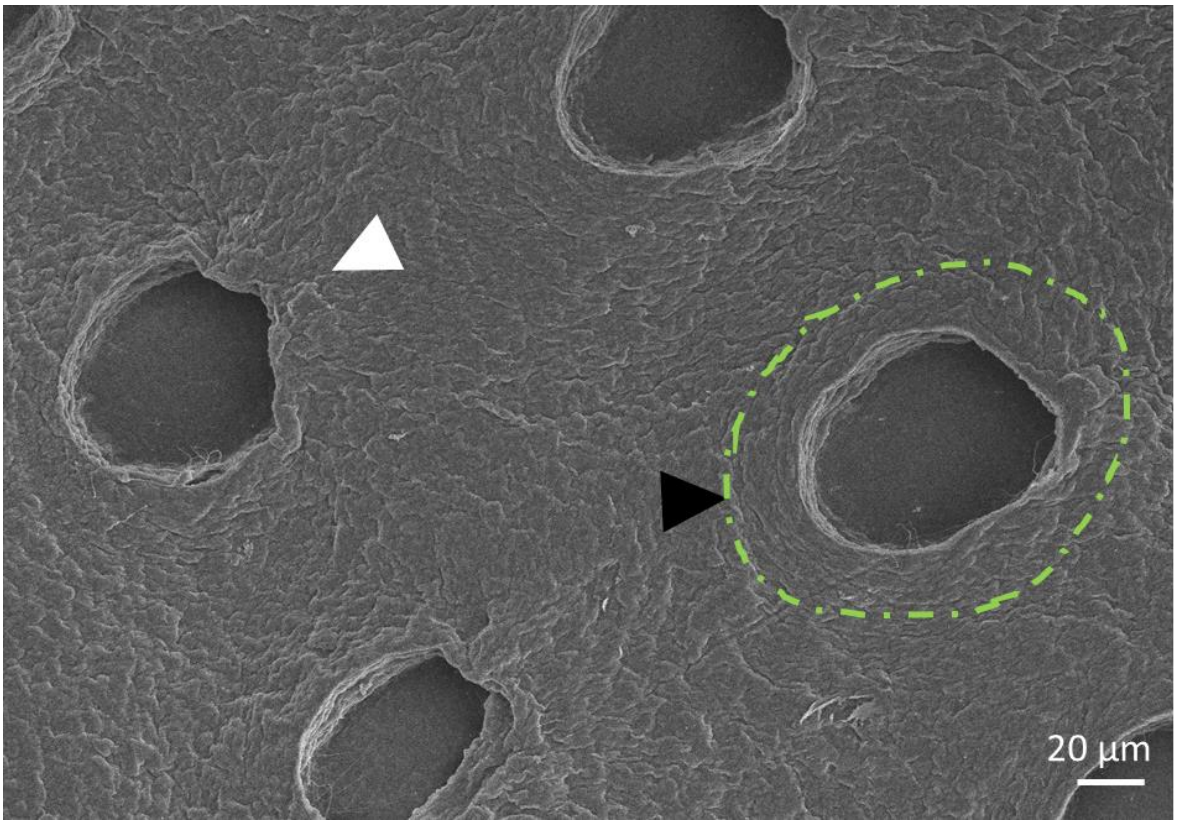


Figure 17 : Cliché en MEB de la matrice de collagène Coll/200/4% minéralisée après 48 h d'exposition aux vapeurs d'ammoniaque. Les flèches indiquent les organisations fibrillaires visibles : défaut en blanc et arrangement concentrique en noir.

Le taux de minéralisation des matrices de collagène minéralisées est déterminé par analyses thermogravimétriques (ATG). Comme décrit dans **Matériels et Méthodes** (Partie VI – 2.1), la perte de masse entre TA et 200°C correspond à l'évaporation de l'eau physisorbée (Legeros 1978). Cette perte d'eau à la surface des fibrilles correspond à environ 90% de la masse totale de la matrice initialement introduite, c'est pourquoi nous l'avons négligé pour calculer le taux de minéralisation dans nos matrices Ensuite, de 200 à 600°C, l'eau chimisorbée et le collagène sont dégradés en H_2O et CO_2 ; la concentration en collagène se calcule donc à partir de 200°C. On détermine une concentration pour la matrice, dont le thermogramme est présenté en *Figure 18*, une concentration en collagène de 85 mg/mL, ce qui concorde avec l'augmentation d'environ 15 mg/mL que nous avions établi par rapport à nos observations en lumière polarisée. La perte de masse liée à l'hydroxyapatite a lieu entre 600 et 1000°C. Le taux de minéralisation d'une matrice est calculé en fonction de la masse de la phase organique et de la phase minérale. On en déduit donc que le taux de minéralisation moyen de nos matrices de collagène minéralisées est d'environ 7%. Ce taux est en accord avec les résultats précédents du laboratoire pour des matrices 3D de plus gros volume (Wang *et al.* 2012) où le taux de minéralisation est compris entre 5 et 10% avec ce procédé de co-précipitation.

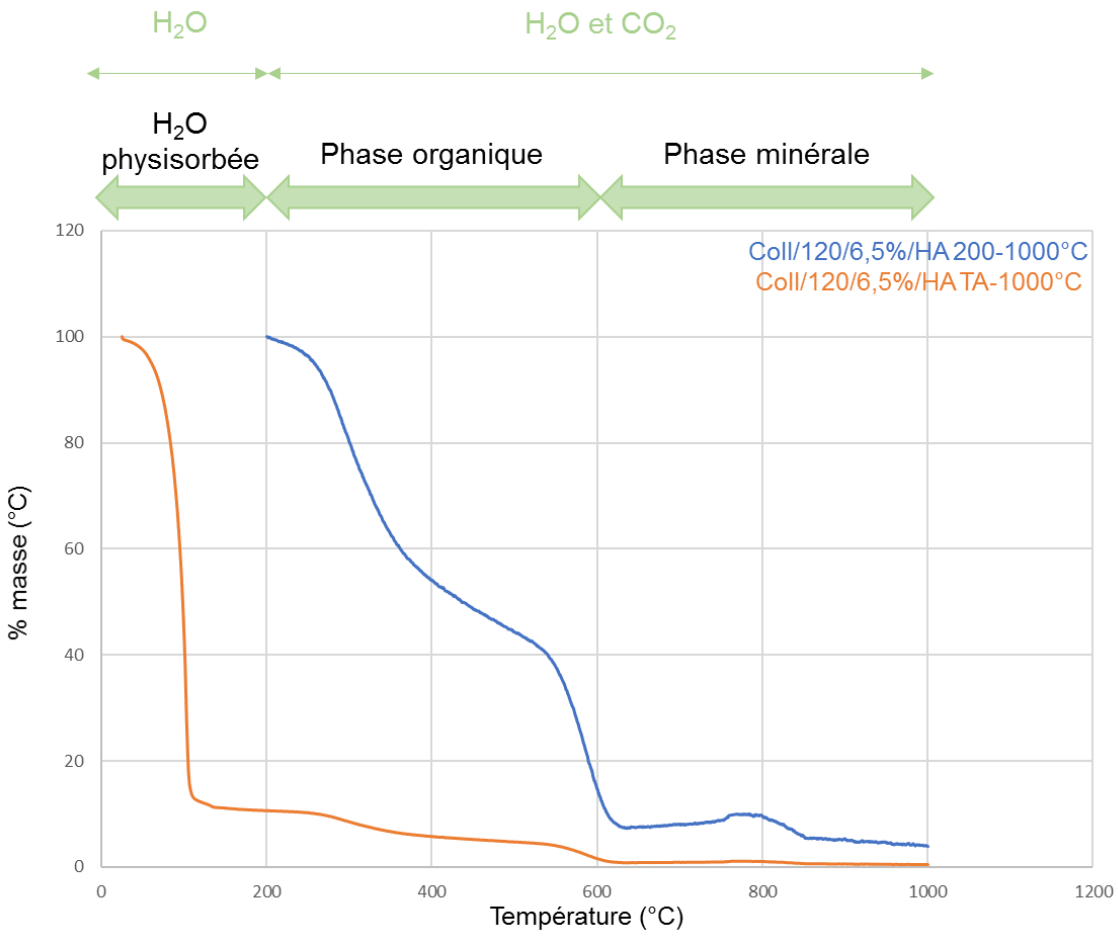


Figure 18 : Thermogramme de la matrice Coll/120/6,5%/HA avec (orange) ou sans (bleu) prise en compte de l'eau physiosorbée..

Des analyses en diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) en transmission ont été faites afin de caractériser plus finement l'interaction entre la phase minérale et les fibrilles de collagène (*Figure 19A*). Nous avons pour cela comparé nos échantillons à des échantillons de références d'os décalcifiés (*Figure 19B*). Les études ont été faites en montant les échantillons dans des capillaires de borosilicate de 1 mm pour les matrices de collagène et de 2 mm pour les échantillons d'os décalcifiés. L'intensité observée sur les clichés à des angles 2Θ particuliers correspond à des distances caractéristiques sondées dans nos échantillons. On observe une forte diffusion anisotrope (flèches blanches) dans nos matrices de collagène et les échantillons d'os décalcifiés. Cette anisotropie est observée par l'intensité de diffusion plus importante qui indique une orientation particulière des fibrilles à grande échelle ce qui concorde avec les observations faites dans la littérature sur l'anisotropie du tissu osseux (Rinnerthaler *et al.* 1999 ; Cedola *et al.* 2007 ; Grünewald *et al.* 2020).

Les profils linéaires 1D des gels et des os en fonction du vecteur *q* (*Figure 19C*) sont obtenus par accumulation radiale des clichés en 2D. Par la formule reliant le vecteur q aux distances interréticulaires d ($q= (4\pi/\lambda)*\sin(\Theta/2) = 2\pi/d$), on remonte à la distance interfibrillaire dans nos matrices de collagène minéralisées qui est d'environ ~1,2 nm avec q= 0,5307 Å contre ~1,4 nm sans minéral avec q= 0,4848 Å. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui montrent qu'en présence de minéral, la distance interfibrillaire diminue (Glimcher 1984 ; Landis *et al.* 1990, Fratzl *et al.* 1992/2012). Il est intéressant de noter qu'une distance de 1,3 nm est également retrouvée dans nos échantillons de référence d'os décalcifiés de brebis (q= 0,5336 Å). Cette distance interfibrillaire similaire entre matrice de collagène minéralisé et os décalcifiés indique que (i) nos matrices sont faiblement minéralisées et (ii) que la décalcification de l'os n'est que partielle, il reste du minéral résiduel au sein du tissu. Ceci avait été également observé dans le cas des matrices denses de collagène de plus gros volumes (Wang *et al.* 2012 ; Nassif *et al.* 2010) indiquant que ce faible degré de minéralisation est inhérent au procédé de co-précipitation dans les expérimentales choisies (*e.g.* concentration).

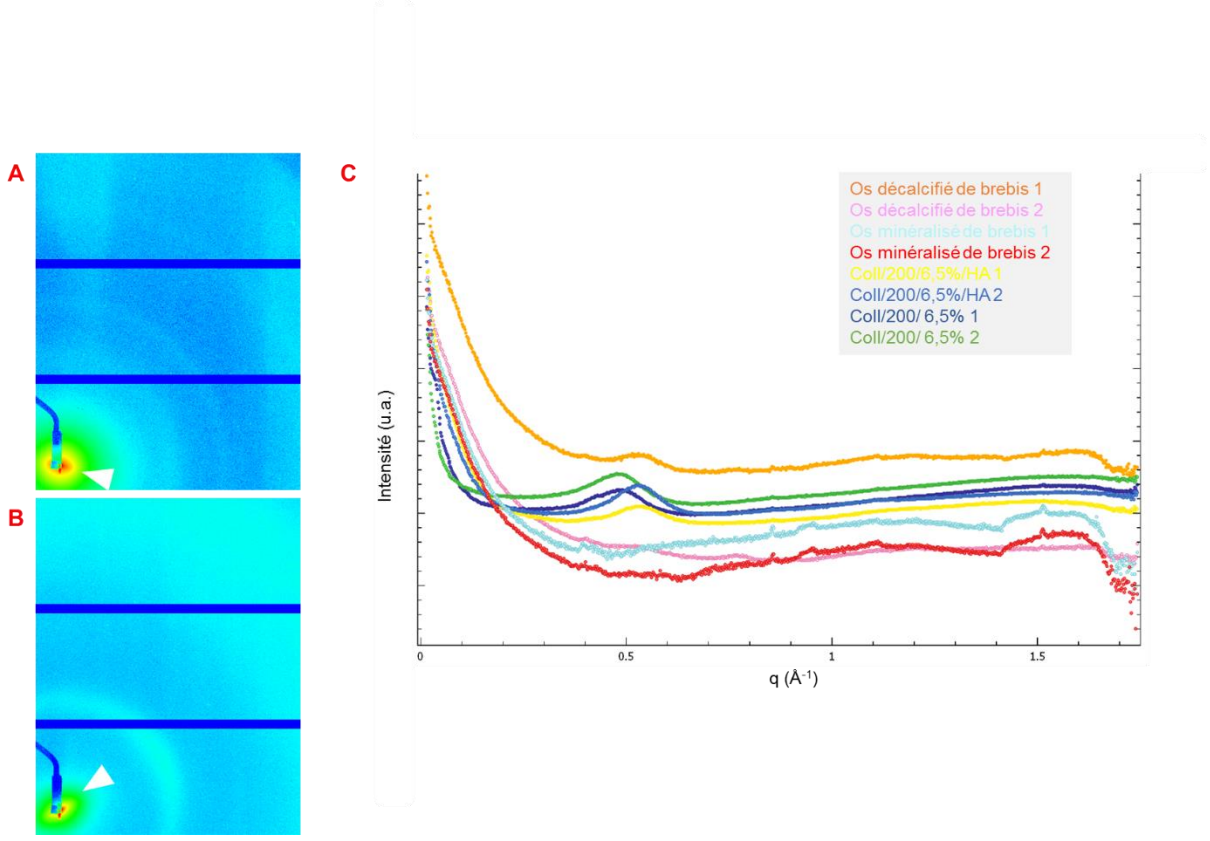


Figure 19 : Clichés en 2D de diffusion des RX aux petits angles d'un os de brebis décalcifié à l'EDTA (A) et d'une matrice de collagène 200/6,5% (B). Les profils linéaires de l'intensité et du vecteur q sont pris le long de l'orientation axiale (C).

Je n'ai malheureusement pas pu inclure à temps dans ce manuscrit les résultats des observations des matrices denses de collagène par MET pour caractériser plus finement la microstructure du réseau de collagène et l'interface collagène/apatite. En effet, des problèmes techniques sur le microscope m'ont empêché de les observer jusqu'à maintenant. Il en est de même pour la caractérisation de la phase minérale par RMN à l'état solide du ^{31}P qui aurait confirmé la nature de la phase minérale.

Il serait très intéressant pour la suite de ce travail d'effectuer des analyses plus approfondies par 3D SAXS (Georgiadis *et al.* 2015 ; Seidel *et al.* 2012), ainsi que des caractérisations simultanées WAXS-SAXS (White *et al.* 1977 ; Gupta *et al.* 2006) par rayonnement synchrotron sur nos matrices de collagène comme cela a été effectué précédemment sur des matrices denses collagène/apatite au laboratoire (Nassif *et al.* 2010) et sur les échantillons d'os décalcifiés de références auraient pu nous renseigner plus finement sur l'ultrastructure de nos matériaux.

III. Défauts topologiques des organisations cristal-liquides

En parallèle, des études en PolScope ont été menées en collaboration avec Franck Artzner et Arnaud Bardouil à Rennes (IPR) afin d'étudier les phénomènes de défauts des cristal-liquides que nous avons évoqués au **Chapitre 1**. Les mesures d'azimuth et de retardance nous ont permis de déterminer les orientations à 360° des molécules de collagène dans les chambres microfluidiques. La retardance (intensité des couleurs) traduit la biréfringence de la solution de collagène dans la chambre à l'interface air/collagène. Ce phénomène indique donc que la solution de collagène se concentre comme nous l'avions envisagé auparavant.

Comme indiqué précédemment, lors de l'étalement de la goutte et au cours de l'évaporation des solvants, le collagène va s'organiser localement suivant différentes orientations. De par la topologie du réseau de la chambre microfluidique et de l'ancrage des molécules de collagène à la surface du PDMS, ces orientations ne peuvent pas toujours être compatibles avec la transition cholestérique, c'est-à-dire que d'autres orientations du collagène (autres phases cristal-liquides) sont en contact avec des orientations susceptibles de mener à des géométries cholestériques car l'espace libre disponible ne permet pas au collagène de s'organiser corrrectement. Ces incompatibilités vont alors former ce qu'on appelle des défauts topologiques, qui sont des points de contacts entre les différentes orientations. Ces défauts vont se traduire par des mesures d'azimuth différentes, c'est-à-dire un changement de couleur abrupt. L'overlay mesuré nous permet de donner l'orientation des molécules dans l'espace (perpendiculaire aux traits blancs) comme montré sur la *Figure 20*. En fonction de l'interdistance des plots dans le réseau carré, la localisation des défauts diverge légèrement comme cela est illustré avec deux exemples : 120 et 200 µm. Ici, les clichés ont été pris à t=J+1. Comme pour la MOLP, j'ai choisi ici des clichés représentatifs de mes observations qui ont duré plusieurs jours et qui ont dû être répétées afin de vérifier la reproductibilité des phénomènes observés. Cela a constitué une grande partie de mon travail de thèse. Pour l'illustrer, des planches d'observations reflétant cette étude ont été placées en **Annexes**.

Pour une interdistance de 120 µm, on observe en moyenne deux défauts dans un réseau de 4 plots (*Figure 20A*). La présence de défauts supplémentaires peut être due aux impuretés (poussières ou rugosité du PDMS) présentes en surface. La position des défauts est reproductible d'un réseau à l'autre, l'un est situé entre les plots (cercle), et l'autre semble être ancré aux plots (+). Pour une interdistance de 200 µm, les défauts observés sont différents d'un réseau à l'autre avec la présence de 2 ou 3 défauts (*Figure 20B*). L'interdistance augmentant, il est possible d'envisager l'augmentation du nombre d'incompatibilités d'orientations.

Le collagène se réorganise au cours de l'évaporation des solvants en suivant son diagramme de phase (Besseau et Giraud-Guille 1998) et le nombre de défauts par réseau de plots semble augmenter avec l'interdistance. J'ai donc émis l'hypothèse qu'à l'interdistance biomimétique de 200 µm, la présence de défauts soit favorisée par l'espace disponible dans le tissu biologique.

Afin d'améliorer notre compréhension sur les procédés d'auto-assemblage du collagène autour des plots, nous avons induit la fibrillogénèse *in vitro* des molécules de collagène afin de fixer l'organisation à l'état fibrillaire. Des études par MEB au laboratoire et microscopie électronique à balayage aux ions hélium (SHIM) à Dublin (Trinity College, Département d'Ingénierie Biomédicale) ont été faites.

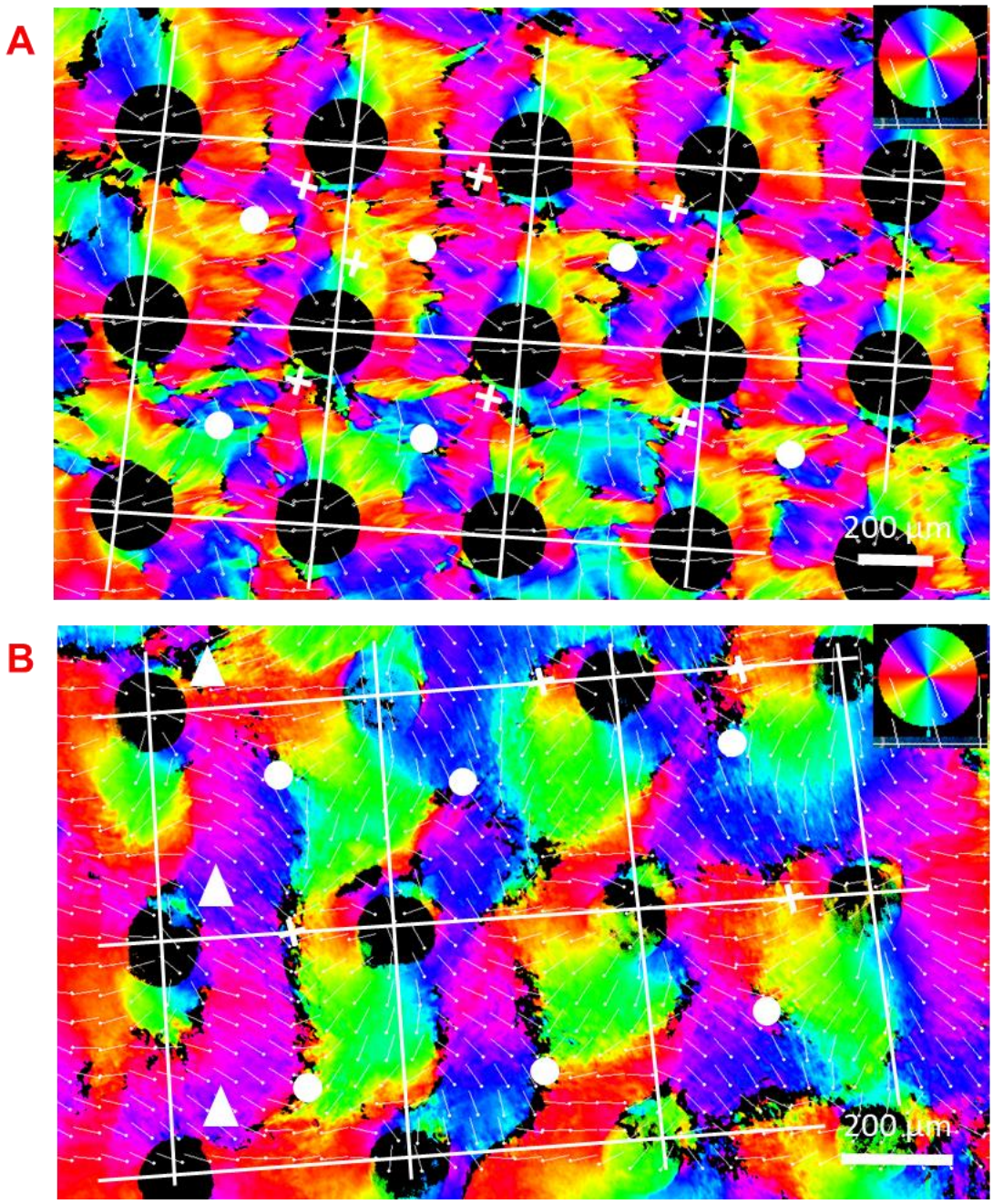


Figure 20 : Clichés en PolScope de la solution de collagène en milieu microtexturé réseau carré d'interdistance de plots de 120 (A) et 200 (B) µm avec une concentration initiale de collagène à 65 mg/mL après t=J+3. Les flèches blanches sont l'overlay des orientations mesurées. + défauts ancrés au plots, ○ défauts entre 4 plots, ▲ défaut triple.

Les observations de matrices en MEB nous permettent de constater que le motif de la chambre microfluidique est bien conservé (*Figure 21A*). A plus fort grandissement, on observe que les fibrilles s'organisent de façon concentrique autour du plot (*Figure 21B*) (cercle jaune). Cependant, une orthogonalité des fibrilles au point d'ancrage du défaut établi précédemment semble indiquer la présence de défauts topologiques caractéristiques d'un nématique de type +1/2 (Oswald et Pieranski 2000) (*Figure 21C*). Ces observations se confirment lorsque l'on utilise une matrice d'interdistance de plots de 240 µm (*Figure 21D*). **J'ai émis l'hypothèse que le défaut situé près du plot pouvait être le point de départ de la cholestérisation des orientations** (*Figure 21E*).

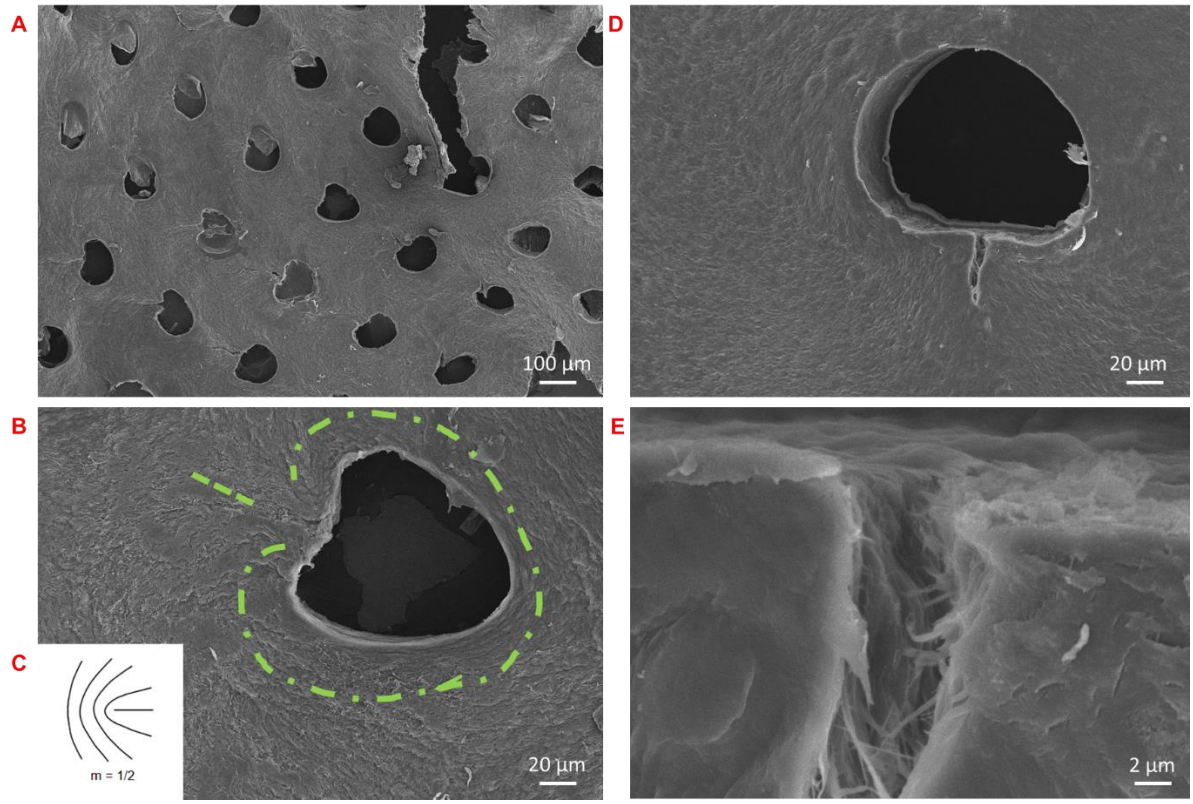


Figure 21 : Clichés en MEB de l'organisation tridimensionnelle des fibrilles de 200/8% (A) et 240/8% (D) après 48 h d'exposition aux vapeurs d'ammoniac. (B) et (E) sont des grandissements respectifs de (A) et (D). (C) Défaut topologique de type +1/2 dans l'organisation nématique. Reproduit de Oswald et Pieranski 2000.

Notons que nous avions présenté dans le **Chapitre 1** les différents défauts topologiques liés aux organisations cristal-liquides nématiques et cholestériques. La phase cholestérique, appelée également nématique chiral ou mésophase frustrée, possède en plus des défauts liés aux rotations autour de l'axe cholestérique, les défauts de la phase nématique (Kléman et Friedel 1969). **Sans caractérisation de l'ultrastructure par MET, nous ne pouvons donc confirmer ou infirmer la présence d'une organisation cholestérique**.

En parallèle, nous avons pu confirmer la pertinence de nos observations en les comparant à des échantillons de référence d'os décalcifiés de dromadaire (*Figure 22A et A'*) et de brebis (*Figure 22B et B'*). En effet, nous avons pu observer également la présence de ce même type de défauts topologiques (rectangles rouges). Des conflits d'organisations de la matrice organique au sein du tissu biologique pourraient conduire à la formation de ces défauts qui se traduisent par des changements abrupts des orientations fibrillaires. Ce phénomène n'ayant pas été étudié dans la littérature, il serait intéressant de déterminer si la formation de ces défauts est inhérente aux phénomènes de remodelage osseux ou si l'apparition de ces défauts est visible dès la primo-formation du tissu osseux.

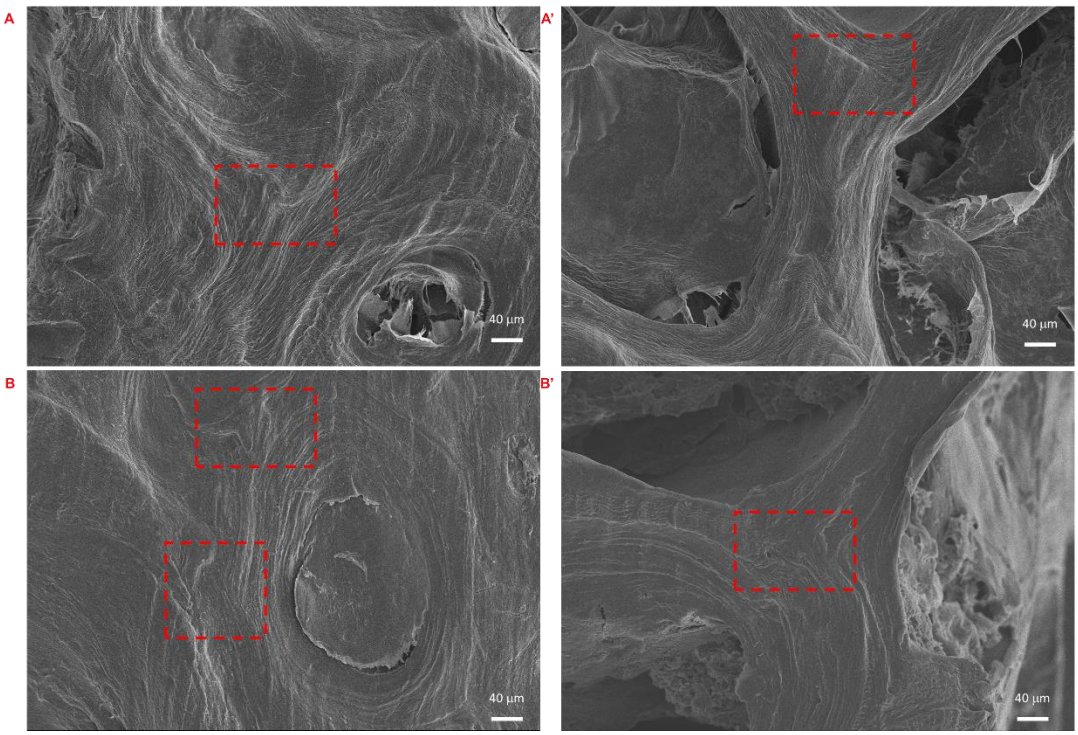


Figure 22 : Clichés en MEB des échantillons de références d'os corticaux et trabéculaires décalcifiés à l'EDTA de dromadaires (A)(A') et de brebis (B)(B').

Néanmoins, il a déjà été fait mention de la présence de défauts topologiques dans le tissu osseux mais à une autre échelle, par un contrôle cellulaire. Il est décrit que les ostéocytes imposent localement (à l'échelle de 10 µm) l'organisation spatiale des lamelles osseuses (Skedros *et al.* 2006 et 2013).

Nous avons ensuite étudié nos échantillons par microscopie électronique à balayage aux ions hélium SHIM. Cette technique de microscopie a permis une meilleure profondeur de champ et ainsi d'observer l'organisation fibrillaire à l'interface du plot/collagène (*Figure 23A*). On observe de façon intéressante la même organisation sous forme de strates concentriques (flèches blanches) entre l'échantillon de synthèse et celle d'un échantillon biologique à savoir l'interface d'un vaisseau sanguin et de la MEC d'un ostéon d'os de brebis (*Figure 23B*). Notons également la similarité des observations à une échelle plus locale au sein d'une lacune de Howship, qui est une cavité dans le tissu osseux de faible densité creusée par les ostéoclastes, après décellularisation (*Figure 23C*). Comme en MEB, on observe bien à l'extérieur du plot des domaines fibrillaires orientés avec une homogénéité en taille de fibrilles (*Figure 23A*).

Notre modèle paraît donc pertinent pour étudier à cette échelle la formation des organisations des fibrilles de collagène du tissu osseux.

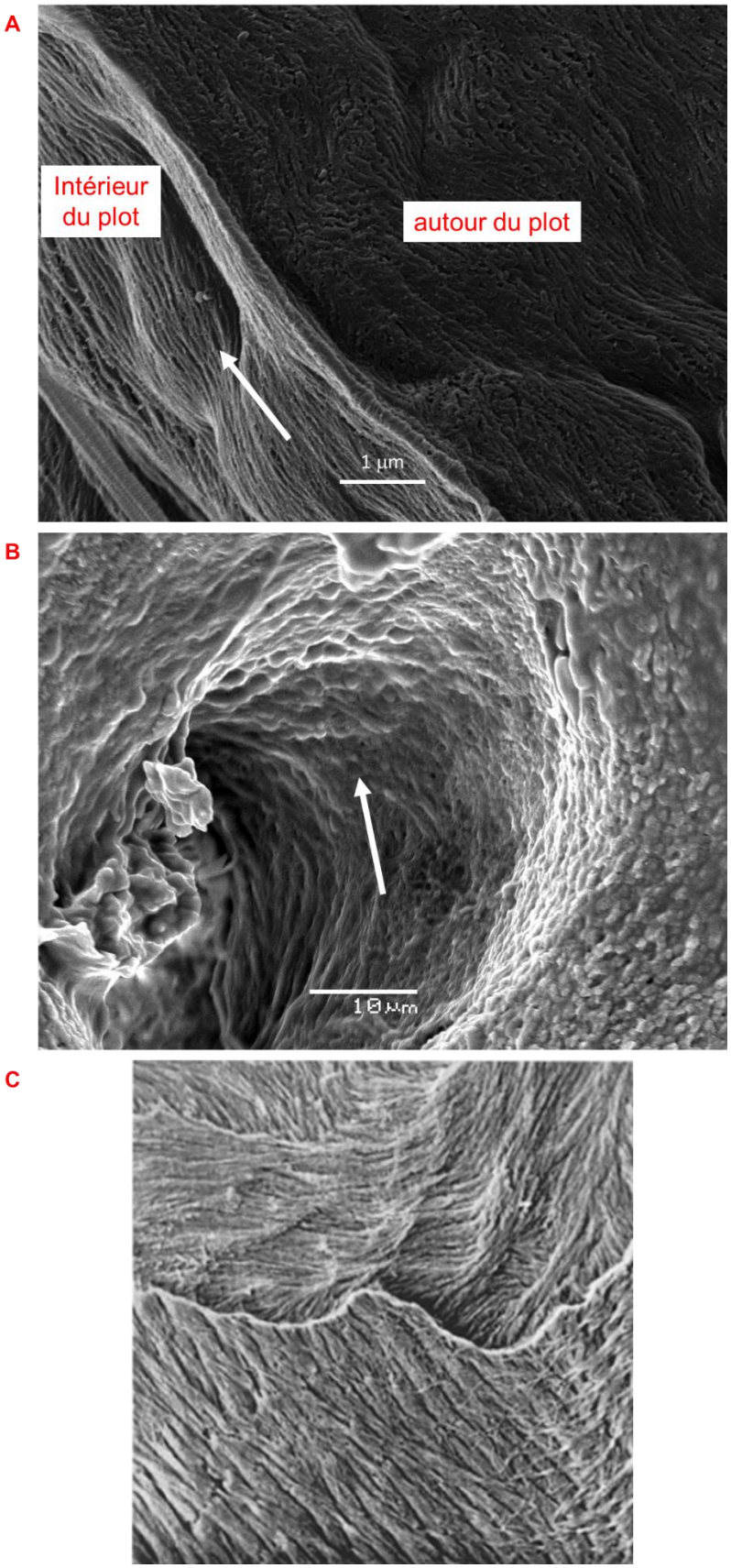


Figure 23 : (A) Clichés en SHIM de l'organisation fibrillaire du collagène dans le plot et clichés MEB à l'interface vaisseau sanguin/MEC d'os de brebis (B) et dans une lacune de Howship (x1000) (C).(C) reproduit de Boyde et Hobdell 1969.

IV. Conclusion

Afin d'étudier les phénomènes physico-chimiques impliqués dans la morphogénèse du tissu osseux et ainsi pouvoir reproduire *in vitro* l'organisation suprafibrillaire de l'os à l'échelle du tissu cortical, nous avons élaboré des modèles microfluidiques biomimétiques de ce tissu. Nous avons ciblé différents paramètres à étudier tels que le confinement, la concentration initiale en collagène, l'état de surface, la géométrie et la présence de la phase minérale, afin de pouvoir contrôler l'arrangement spatial des fibrilles de collagène.

Nous avions établi au préalable une échelle de grandeur de distances interostéons à 200 µm. Par l'étude des textures de biréfringences dans des chambres d'interdistances de plots différentes, nous avons pu observer des organisations cristal-liquides similaires à celles observées dans le tissu biologique (Giraud-Guille 1988) pour une distance de plots de 200 µm, ce qui valide notre modèle entre billes de verre.

L'étude systématique à partir de solutions initiales de collagène de concentrations différentes a permis d'observer la présence de différentes organisations assimilées à des géométries cristal-liquides par lumière polarisée au même temps. De manière intéressante, la cinétique est plus rapide à partir de solutions plus concentrées cependant, il n'a pas été observé d'effet de la concentration sur l'organisation des domaines anisotropes. De manière intéressante, ces motifs biréfringents présentent une répétabilité à grande échelle (mm) dans un réseau de plots modèle. La perturbation de ce réseau en modifiant l'agencement du réseau de plots a induit un désordre dans l'organisation des molécules de collagène. Ce modèle plus biomimétique d'un point de vue structural a permis de mettre en avant le désordre potentiel dans les organisations organiques du tissu osseux.

Nous avons été capables de minéraliser nos matrices comme les matrices obtenues précédemment au laboratoire sur de plus grands volumes (Wang *et al.* 2012). L'étude des clichés 2D SAXS nous a permis de déterminer la distance interfibrillaire dans nos matrices en accord avec des échantillons d'os partiellement décalcifiés et les ordres de grandeurs établis dans la littérature (Lee et Glimcher 1991). L'anisotropie de diffusion a également montré un alignement du collagène à grande distance. Compte-tenu des résultats obtenus précédemment avec des matrices hybrides denses au laboratoire, le minéral semble co-aligné avec l'axe principal des fibrilles de collagène. Cependant, il nous faudrait confirmer cela par une analyse couplée SAXS-WAXS. Il serait intéressant d'étudier l'effet du minéral à différentes forces ioniques, l'apatite modifie les propriétés mécaniques et la mobilité du collagène, ce qui devrait ralentir la formation des phases cristal-liquides.

Les observations en PolScope et en MEB des matrices de collagène ont permis de mettre en avant la présence de défauts topologiques d'organisations aux points d'ancrage du collagène à la surface des chambres. Ces défauts sont le fruit d'incompatibilités d'orientations fibrillaires différentes. En parallèle, le même type de défaut a pu être observé dans des échantillons d'os décalcifiés. Cette observation conforte l'hypothèse d'Yves Bouligand sur l'existence de domaines cristal-liquides dans les tissus biologiques (Bouligand 1978 ; Bouligand et Giraud-Guille 1985) et il en découle une question quant à la période de formation de ces défauts puisqu'ils semblent être répartis dans l'ensemble du tissu : apparaissent-ils lors de l'ostéogénèse ou sont-ils formés (plus localement) lors du remodelage osseux ? Il serait intéressant d'observer des coupes histologiques de tissus osseux sains de différentes espèces à différents âges afin d'infirmer ou de confirmer ces hypothèses.

Ces modèles microfluidiques biomimétiques nous ont permis d'étudier l'influence de différents facteurs physico-chimiques. De futures études sur ces modèles nécessiteraient de pouvoir fixer avec précision la température, l'humidité et la pression afin que la cinétique soit contrôlée. Du fait des problèmes techniques liés au modèle initialement envisagé, le flux ici est « statique », il serait donc intéressant d'observer ce système en appliquant un écoulement continu de la solution de collagène afin d'étudier le régime d'écoulement des fluides au sein de la chambre (laminaire ? turbulent ?). L'ancrage des molécules devrait être favorisé par un régime laminaire (contact avec les parois plus marqué car vitesse plus faible du flux).

De plus, il serait intéressant de développer un modèle théorique des différents phénomènes physico-chimiques observés (ancrage des cristaux-liquides lyotropes, défauts topologiques) afin de pouvoir faire le parallèle avec des observations de pathologies telles que l'ostéoporose.

Références bibliographiques

Amis, E. J., C. J. Carriere, J. D. Ferry, et A. Veis. 1985. « Effect of pH on collagen flexibility determined from dilute solution viscoelastic measurements ». *International Journal of Biological Macromolecules* 7 (3): 130-34.

Ascenzi, A., et E. Bonucci. 1968. « The compressive properties of single osteons ». *The Anatomical Record* 161 (3): 377-91.

Belamie, E., G. Mosser, F. Gobeaux, et M. M. Giraud-Guille. « Possible transient liquid crystal phase during the laying out of connective tissues: α-chitin and collagen as models ». *Journal of Physics: Condensed Matter* 18: S115–S129.

Bersini, S., J. S. Jeon, G. Dubini, C. Arrigoni, S. Chung, J. L. Charest, M. Moretti, et R. D. Kamm. 2014. « A microfluidic 3d in vitro model for specificity of breast cancer metastasis to bone ». *Biomaterials* 35, 8: 2454-61.

Blin, A., A. Le Goff, A. Magniez, S. Poirault-Chassac, B. Teste, G. Sicot, K. A. Nguyen, F. S. Hamdi, M. Reyssat, et D. Baruch. 2016. « Microfluidic model of the platelet-generating organ: beyond bone marrow biomimetics ». *Scientific Reports* 6 (1): 21700.

Boyde, A., et M. H. Hobdell. 1968. « Scanning electron microscopy of lamellar bone ». *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie* 93 (2): 213-31.

Bouligand Y. 1978. « Liquid crystals and their analogs in biological systems ». *Solid state physics, supplement* 14.

Bouligand, Y., et M.-M. Giraud-Guille. 1985. « Spatial organization of collagen fibrils in skeletal tissues: analogies with liquid crystals ». In *Biology of Invertebrate and Lower Vertebrate Collagens*, édité par A. Bairati et R. Garrone, 115-34. NATO ASI Series. Boston, MA: Springer US.

Cabodi, M., N. Won Choi, J. P. Gleghorn, C. S. D. Lee, L. J. Bonassar, et A. D. Stroock. 2005. « A microfluidic biomaterial ». *Journal of the American Chemical Society* 127, 40: 13788-89.

Cedola, A., M. Mastrogiacomo, S. Lagomarsino, R. Cancedda, C. Giannini, A. Guagliardi, M. Ladisa, M. Burghammer, F. Rustichelli, et V. Komlev. 2007. « Orientation of mineral crystals by collagen fibers during *in vivo* bone engineering: an x-ray diffraction imaging study ». *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, A Collection of Papers Presented at the 18th International Congress on X-Ray Optics and Microanalysis (ICXOM 2005), 62 (6): 642-47.

Cherpak, V., V. F. Korolovych, R. Geryak, T. Turiv, D. Nepal, J. Kelly, T. J. Bunning, O. D. Lavrentovich, W. T. Heller, et V. V. Tsukruk. 2008. « Robust chiral organization of cellulose nanocrystals in capillary confinement ». *Nano Letters* 18: 6770-77.

Domachuk, P., K. Tsioris, F. G. Omenetto, et D. L. Kaplan. 2010. « Bio-microfluidics: biomaterials and biomimetic designs ». *Advanced Materials* 22, 2: 249-60.

Engel, M. B., et H. R. Catchpole. 1970. « Thermal effects on birefringence of tendon with aging ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 133 (1): 260-63.

Fratzl, P., S. Schreiber, et K. Klaushofer. 1996. « Bone mineralization as studied by small-angle X-Ray scattering ». *Connective Tissue Research* 34 (4): 247-54.

Fratzl, P., H. S. Gupta, E. P. Paschalis, et P. Roschger. 2004. « Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone ». *Journal of Materials Chemistry* 14 (14): 2115-23.

Fratzl, P. 2012. « A composite matter of alignment ». *Science* 335 (6065): 177-78.

Georgiadis, M., M. Guizar-Sicairos, O. Gschwend, P. Hangartner, O. Bunk, R. Müller, et P. Schneider. 2016. « Ultrastructure organization of human trabeculae assessed by 3D SSAXS and relation to bone microarchitecture ». *PLOS ONE* 11 (8): e0159838.

Giraud-Guille, M. M. 1988. « Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons ». *Calcified Tissue International* 42, 3: 167-80.

Giraud-Guille, M-M. 1989. « Liquid crystalline phases of sonicated type in collagen ». *Biology of the Cell* 67 (1): 97-101.

Giraud-Guille M-M., et Besseau L. 1998. « Banded patterns in liquid crystalline phases of type I collagen: relationship with crimp morphology in connective tissue architecture ». *Connective Tissue Research* 37 (3-4): 183-93.

Giraud Guille M.M., Mosser G., Helary C., et Eglin D. 2005. « Bone matrix like assemblies of collagen: From liquid crystals to gels and biomimetic materials ». *Micron* 36: 602-8.

Glimcher, M. J., H. Muir, A. Miller, D. C. Phillips, et R. J. P. Williams. 1984. « Recent studies of the mineral phase in bone and its possible linkage to the organic matrix by protein-bound phosphate bonds ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 304 (1121): 479-508.

Gobeaux, F., E. Belamie, G. Mosser, P. Davidson, P. Panine, et M.-M. Giraud-Guille. 2007. « Cooperative ordering of collagen triple helices in the dense state ». *Langmuir* 23 (11): 6411-17.

Gobeaux, F., G. Mosser, A. Anglo, P. Panine, P. Davidson, M. -M. Giraud-Guille, et E. Belamie. 2008. « Fibrillogenesis in dense collagen solutions: A physicochemical study ». *Journal of Molecular Biology* 376: 1509-22.

Gupta, H. S., J. Seto, W. Wagermaier, P. Zaslansky, P. Boesecke, et P. Fratzl. 2006. « Cooperative Deformation of Mineral and Collagen in Bone at the Nanoscale ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (47): 17741-46.

Granke, M., A. Gourrier, F. Rupin, K. Raum, F. Peyrin, M. Burghammer, A. Saïed, et P. Laugier. 2013. « Microfibril orientation dominates the microelastic properties of human bone tissue at the lamellar length scale ». *PLOS ONE* 8 (3): e58043.

Grayson, A. C. Richards, I. S. Choi, B. M. Tyler, P. P. Wang, H. Brem, M. J. Cima, et R.Langer. 2003. « Multi-pulse drug delivery from a resorbable polymeric microchip device ». *Nature Materials* 2, 11: 767-72.

Grünewald, T. A., M. Liebi, N. K. Wittig, A. Johannes, T. Sikjaer, L. Rejnmark, Z. Gao, et al. 2020. « Mapping the 3D orientation of nanocrystals and nanostructures in human bone: indications of novel structural features ». *Science Advances* 6 (24): eaba4171.

Guo, C., et L. J. Kaufman. 2007. « Flow and magnetic field induced collagen alignment ». *Biomaterials* 28 (6): 1105-14.

Hung, L.-H., et A. Phillip Lee. 2007. « Microfluidic devices for the synthesis of nanoparticles and biomaterials ». *J. Med. Biol. Eng.* 27: 7.

Jastrzebska, E., A. Zuchowska, S. Flis, P. Sokolowska, M. Bulka, A. Dybko, et Z. Brzozka. 2018. « Biological characterization of the modified poly(dimethylsiloxane) surfaces based on cell attachment and toxicity assays ». *Biomicrofluidics* 12 (4): 044105.

Jusoh, N., S. Oh, S. Kim, J. Kim, et N. L. Jeon. 2015. « Microfluidic vascularized bone tissue model with hydroxyapatite-incorporated extracellular matrix ». *Lab on a Chip* 15: 3984-88.

Kawaguchi, K., R. Kageyama, et M. Sano. 2017. « Topological defects control collective dynamics in neural progenitor cell cultures ». *Nature* 545: 327-31.

Kim, D. S., S. Čopar, U.Tkalec, et D. Ki Yoon. 2018. « Mosaics of topological defects in micropatterned liquid crystal textures ». *Science Advances* 4, (11): 8064.

Kleman, M., et J. Friedel. 1969. « Lignes de dislocation dans les cholestériques ». *Le Journal de Physique Colloques* 30 (C4): C4-43-C4-53.

Lama M., F. M. Fernandes, A. Marcellan, J. Peltzer, M. Trouillas, S. Banzet, M. Grosbot, et al. 2020. « Self-assembled collagen microparticles by aerosol as a versatile platform for injectable anisotropic materials ». *Small* 16 (4): 1902224.

Landis, W. J., J. Moradian-oldak, et S. Weiner. 1991. « Topographic imaging of mineral and collagen in the calcifying turkey tendon ». *Connective Tissue Research* 25 (3-4): 181-96.

Lanfer, B., U. Freudenberg, R. Zimmermann, D. Stamov, V. Körber, et C. Werner. 2008. « Aligned fibrillar collagen matrices obtained by shear flow deposition ». *Biomaterials* 29 (28): 3888-95.

Lee D.D. et M.J. Glimcher. 1991. « Three-dimensional spatial relationship between the collagen fibrils and the inorganic calcium phosphate crystals of pickerel (Americanus americanus) and herring (Clupea harengus) bone ». *Journal of Molecular Biology* 217 (3): 487-501.

Lee, J.-H., Y. Gu, H. Wang, et W. Y. Lee. 2012. « Microfluidic 3D bone tissue model for high-throughput evaluation of wound-healing and infection-preventing biomaterials ». *Biomaterials* 33: 999-1006.

Lee P., R. Lin, J. Moon et L. P. Lee. 2006. « Microfluidic alignment of collagen fibers for *in vitro* cell culture ». *Biomed Microdevices* 8 :35-41.

LeGeros, R. Z., G. Bonel, et R. Legros. 1978. « Types of "H_2O" in human enamel and in precipitated apatites ». *Calcified Tissue Research* 26 (1): 111-18.

Lovelady, H. H., S. Shashidhara, et W. G. Matthews. 2014. « Solvent specific persistence length of molecular type I collagen ». *Biopolymers* 101 (4): 329-35.

Nassif, N., F. Gobeaux, J. Seto, E. Belamie, P. Davidson, P. Panine, G. Mosser, P. Fratzl, et M.-M. Giraud Guille. 2010. « Self-assembled collagen−apatite matrix with bone-like hierarchy ». *Chemistry of Materials* 22 (11): 3307-9.

Opathalage, A., M. M. Norton, M. P. N. Juniper, B. Langeslay, S. Ali Aghvami, S. Fraden, et Z. Dogic. 2019. « Self-organized dynamics and the transition to turbulence of confined active nematics ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116: 4788-97.

Oswald, P., et Pieranski P. 2000. « Les cristaux liquides : concepts et propriétés physiques illustrés des expériences, Tome 1 ». *Gordon and Breach Science Publishers*.

Paguirigan, A., et D. J. Beebe. 2006. « Gelatin based microfluidic devices for cell culture ». *Lab on a Chip* 6: 407-13

Pazzaglia, U. E., T. Congiu, M. Marchese, F. Spagnuolo, et D. Quacci. 2012. « Morphometry and patterns of lamellar bone in human haversian systems ». *The Anatomical Record* 295 (9): 1421-29.

Puleo M., C., W. McIntosh Ambrose, T. Takezawa, J. Elisseeff, et T.-H. Wang. 2009. « Integration and application of vitrified collagen in multilayered microfluidic devices for corneal microtissue culture ». *Lab on a Chip* 9: 3221-27.

Reznikov, N., R. Shahar, et S. Weiner. 2014. « Three-dimensional structure of human lamellar bone: the presence of two different materials and new insights into the hierarchical organization ». *Bone* 59: 93-104.

Rinnerthaler, S., P. Roschger, H. F. Jakob, A. Nader, K. Klaushofer, et P. Fratzl. 1999. « Scanning small angle X-Ray scattering analysis of human bone sections ». *Calcified Tissue International* 64 (5): 422-29.

Salameh C., F. Salviat, E. Bessot, M., J.-M. Chassot, E. Moulongui, Y. Wang, et al. 2020. « Origin of transparency in scattering biomimetic collagen materials ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (22): 11947-53.

Saw, T. B., A. Doostmohammadi, V. Nier, L. Kocgozlu, S. Thampi, Y. Toyama, P.Marcq, C. Teck Lim, J. M. Yeomans, et B. Ladoux. 2017. « Topological defects in epithelia govern cell death and extrusion ». *Nature* 544: 212-16.

Seidel, R., A. Gourrier, M. Kerschnitzki, M. Burghammer, P. Fratzl, H. Shikhar Gupta, et W. Wagermaier. 2012. « Synchrotron 3D SAXS analysis of bone nanostructure ». *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials* 1 (2): 123-31.

Skedros, J. G., S. D. Mendenhall, C. J. Kiser, et H. Winet. 2009. « Interpreting cortical bone adaptation and load history by quantifying osteon morphotypes in circularly polarized light images ». *Bone* 44 (3): 392-403.

Skedros, J. G., A. N. Knight, G. C. Clark, C. M. Crowder, V. M. Dominguez, S. Qiu, D. M. Mulhern, S. W. Donahue, B. Busse, B. I. Hulsey, M. Zedda et S. M. Sorenson. 2013. « Scaling of haversian canal surface area to secondary osteon bone volume in ribs and limb bones ». *American Journal of Physical Anthropology* 151 (2): 230-44.

Skedros, J. G., M. S. Doutré, et D. J. Weaver. 2016. « Proximate mechanisms involved in the formation of secondary osteon morphotypes ». *Osteologie* 25 (2): 101-12.

Skedros, J. G., D. J. Weaver, et M. S. Doutré. 2016. « Osteocyte size, shape, orientation, and population density ». *Osteologie* 25 (2): 92-100.

Stone, H. A., et S. Kim. 2001. « Microfluidics: basic issues, applications, and challenges ». *AIChE Journal* 47: 1250-54.

Sun, Y.-L., Z.-P. Luo, A. Fertala, et K.-N. An. 2002. « Direct quantification of the flexibility of type I collagen monomer ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295 (2): 382-86.

Tan, W., et T. A. Desai. 2004. « Layer-by-layer microfluidics for biomimetic three-dimensional structures ». *Biomaterials* 25: 1355-64.

Toepke, M. W., et D. J. Beebe. 2006. « PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications ». *Lab on a Chip* 6 (12): 1484-86.

Wang Y., T. Azaïs, M. Robin, A. Vallée, C. Catania, P. Legriel, G. Pehau-Arnaudet, F. Babonneau, M.-M. Giraud-Guille, et N. Nassif. 2012. « The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite ». *Nature Materials* 11 (8): 724-33.

Wang Y., J. Silvent, M. Robin, F. Babonneau, A. Meddahi-Pellé, N. Nassif, et M. M. Giraud Guille. 2011. « Controlled collagen assembly to build dense tissue-like materials for tissue engineering ». *Soft Matter* 7 (20): 9659-64.

Weiner, S., W. Traub, et H. D. Wagner. 1999. « Lamellar bone: structure–function relations ». *Journal of Structural Biology* 126 (3): 241-55.

Weiner, S., et W. Traub. 1986. « Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils ». *FEBS Letters* 206 (2): 262-66.

White, S. W., D. J. S. Hulmes, A. Miller, et P. A. Timmins. 1977. « Collagen–mineral axial relationship in calcified turkey leg tendon by X-Ray and neutron diffraction ». *Nature* 266 (5601): 421-25.

Chapitre 4 : Mésophases de collagène à porosité contrôlée

Tables des matières du Chapitre 4

Chapitre 4 : Mésophases de collagène à porosité contrôlée..... 179

I. Vers l'os trabéculaire par un procédé d'émulsion ou d'agents porogènes 186

1. Procédé « foaming » : Carbonates d'ammonium $(NH_4)_2CO_3$ 187
2. Réplique de matériaux macroporeux 189
3. Procédés d'émulsion collagène-huile ou ségrégation de phases 192
    1. Ségrégation de phases collagène/glycérol..... 193
    2. Emulsion collagène-coprah..... 195
4. Templating par utilisation d'agents porogènes..... 199

II. Conclusion..... 203

Références bibliographiques..... 205

Dans la littérature, différents travaux portent sur la synthèse de matériaux visant à reproduire la porosité de l'os trabéculaire qui le plus souvent appartiennent au domaine des biomatériaux. On peut distinguer 4 catégories de ces matériaux en fonction de leur nature chimique : céramiques, polymères synthétiques, polymères naturels et composites (O'Brien 2011 ; Giannoudis *et al.* 2005 ; Moore *et al.* 2001). Les procédés de synthèse de ces matériaux sont variés, allant du frittage au freeze-casting en passant par la calcination et mènent à des domaines de taille de pores qui ne sont pas toujours dans la gamme de celles qui sont observées dans l'os. Je vais présenter ici quelques-uns de ces matériaux acellulaires pour illustrer leur diversité.

La bibliographie dédiée aux **céramiques** frittées à base d'hydroxyapatite (*Figure 1A, B et C*) ou de phosphate tricalcique (TCP) (*Figure 1D et E*) (Tancred *et al.* 1998 ; Landi *et al.* 2003 ; Seebach *et al.* 2010 ; Buckley et O'Kelly 2010) est conséquente. Ces matériaux sont commercialisés compte tenu de leur faible coût lié à la nature des composants non-immunogènes et très facilement stérilisables sans dénaturation. Ces biomatériaux possèdent de très bonnes propriétés mécaniques avec une rigidité mécanique élevée (module de Young), et permettent une différenciation cellulaire des ostéoblastes (Ambrosio *et al.* 2002). Ils sont décrits comme ostéoconducteurs. Cependant, même si ces matériaux sont proches en termes de composition de la phase minérale du tissu osseux, leur fragilité (ils présentent une faible élasticité et une surface cassante) et leur faible taux de dégradation par les cellules ne permettent pas d'induire une ostéoinduction (Tancred *et al.* 1998 ; Conz *et al.* 2005). Notons que les hydroxyapatites sont de par le procédé de synthèse (traitement thermique) très cristallisées ce qui peut expliquer leur faible résorption laquelle est favorisée par le TCP (forte solubilisation). La nature intrinsèque de la céramique implique la présence de porosités afin que l'implant puisse s'intégrer dans le défaut en étant colonisé par les cellules. Néanmoins, plus la céramique est poreuse, moins ses propriétés mécaniques sont bonnes (elle devient plus fragile) mais plus la colonisation cellulaire est favorisée. L'inverse (plus la matrice est dense, plus les propriétés mécaniques sont bonnes et plus la colonisation cellulaire est faible) est également vrai ce qui explique une gamme de macroporosités de ces matériaux (*Figure 1*). Ceci constitue une grande différence avec l'os autologue, matériau de référence ou « gold standard » (Bauer *et al.* 2000), prélevé de la crête iliaque et dont les fragments denses ne nécessitent aucune macroporosité pour être résorbés (hormis celle formée par leur assemblage au sein du défaut). De nouvelles céramiques à basse température possédant une meilleure réactivité sont en développement (Denry et Holloway 2014 ; Chevalier et Gremillard 2009).

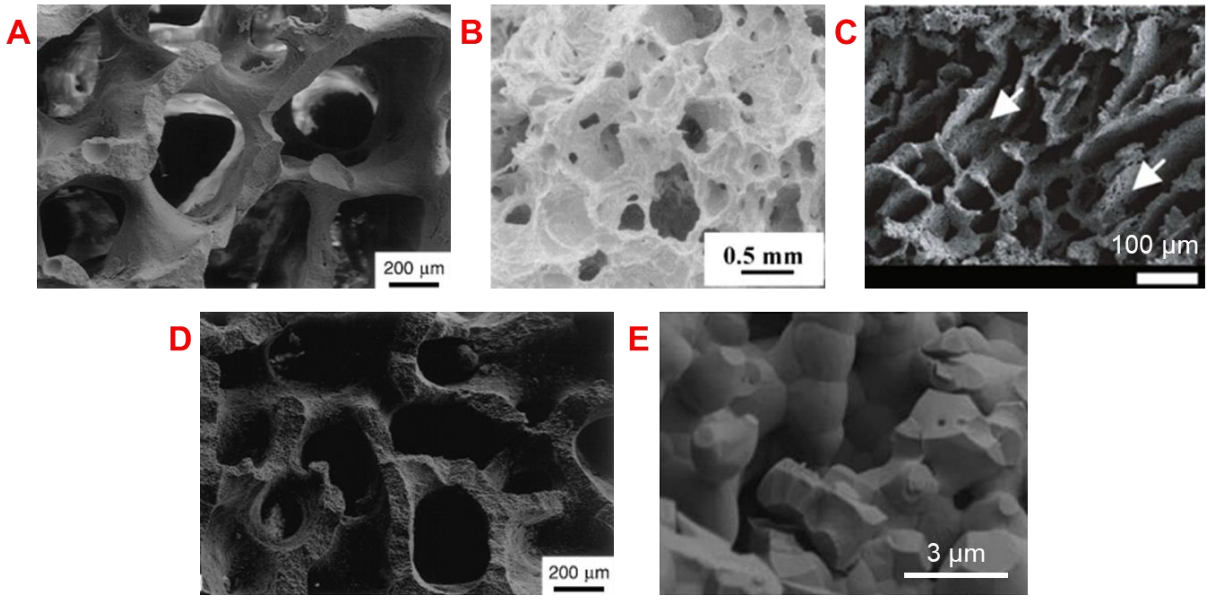


Figure 1 : Clichés en MEB de céramiques macroporeuses synthétisées à partir d'HA (A)(B)(C) et de β-TCP. La porosité des céramiques varie entre 100-200 µm. (A)(D) reproduits de Tancred et al. 1998 ; (B) reproduit de Landi et al. 2003 ; (C) reproduit de Buckley et O'Kelly 2010 et (E) reproduit de Seebach et al. 2010.

Les **polymères synthétiques** sont proposés pour combler les défauts osseux lors de fractures (Carson et Bostrom 2007). Ils présentent l'avantage d'être facilement stérilisables (pas de dénaturation) et ont un faible coût (Haugen *et al.* 2019). On peut retrouver le polyuréthane (PU) (*Figure 2A*) (Gorna et Gogolewski 2003/2006 ; Spaans *et al.* 1998), le polystyrène (PS) (*Figure 2B*) (Bokhari *et al.* 2007), l'acide polyglycolique (PGA), le polyméthylacrylate (PMMA) (*Figure 2C*) (Han *et al.* 2011), le polycaprolactone (PCL) (*Figure 2D*) (Scaffaro *et al.* 2016 ; Salerno *et al.* 2009) et le poly-L-lactide (PLA) (*Figure 2E*) (Coombes et Heckman 1991 ; Bolland *et al.* 2008 ; Scaffaro *et al.* 2016). Ils présentent également l'avantage de pouvoir adopter des architectures particulières car ils sont aisément manipulables (par impression 3D par exemple) (Murphy et Atala 2014). Par contre, ils ne sont pas, ou très peu, résorbables menant souvent à une réaction inflammatoire (Babensee *et al.* 1998 ; Eglin *et al.* 2009 ; Baker *et al.* 2015). Le défaut est donc difficilement comblé par du nouveau tissu (Glowacki *et al.* 1986). Ils ne présentent également pas d'interactions biologiques avec les cellules environnantes. On entend ici par interactions biologiques, la capacité d'un matériau à ne pas être le plus inerte possible mais qu'il fasse réagir le tissu vivant de l'hôte de façon appropriée afin qu'il puisse faciliter les interactions. Enfin, la nature chimique des traitements, très loin d'une approche biomimétique était pour nous à écarter.

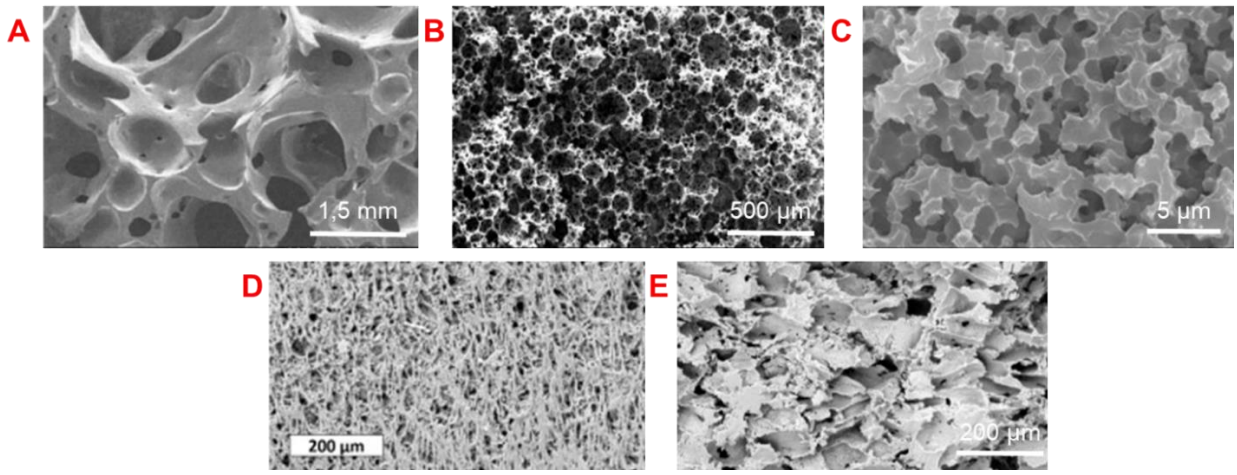


Figure 2 : Clichés en MEB de matrices poreuses de polymères synthétiques. (A) polyuréthane, reproduit de Gorna et Gogolewski 2003 ; (B) polystyrène, reproduit de Bokhari et al. 2007 ; (C) PMMA, reproduit de Han et al. 2011 ; (D) et (E) PCL et PLA, reproduits de Scaffaro et al. 2016.

Les **biopolymères** quant à eux présentent l'avantage d'être bioactifs et de promouvoir la différenciation et croissance cellulaires. Ils sont résorbables par l'organisme et permettent donc de promouvoir la formation du nouveau tissu. Les biopolymères généralement utilisés sont la gélatine (*Figure 3A*) (Wu *et al.* 2010), l'alginate (*Figure 3B*) (Venkatesan *et al.* 2015 ; Sun et Tan 2013), le chitosane (*Figure 3C*) (Madihally et Matthew 1999 ; Saravanan *et al.* 2016 ; Shamekhi *et al.* 2017), la cellulose (*Figure 3D*) (Zaborowska *et al.* 2010 ; Petrauskaite *et al.* 2013) et les protéoglycanes. Cependant, ces matériaux sont peu organisés.

Des matériaux à base de collagène ont également été synthétisés (*Figure 3E et F*) (Chen *et al.* 2017 ; Callegari *et al.* 2007 ; Zitnay *et al.* 2018). La porosité de ces matériaux formée par compression ou ice-templating est proche de la porosité de l'os trabéculaire. Cependant, la densité dans les travées et la structure de ces matériaux ne sont pas biomimétiques du tissu osseux, les propriétés mécaniques résultantes ne sont donc pas semblables. On ne retrouve pas l'organisation en contre-plaqué torsadé de la matrice organique.

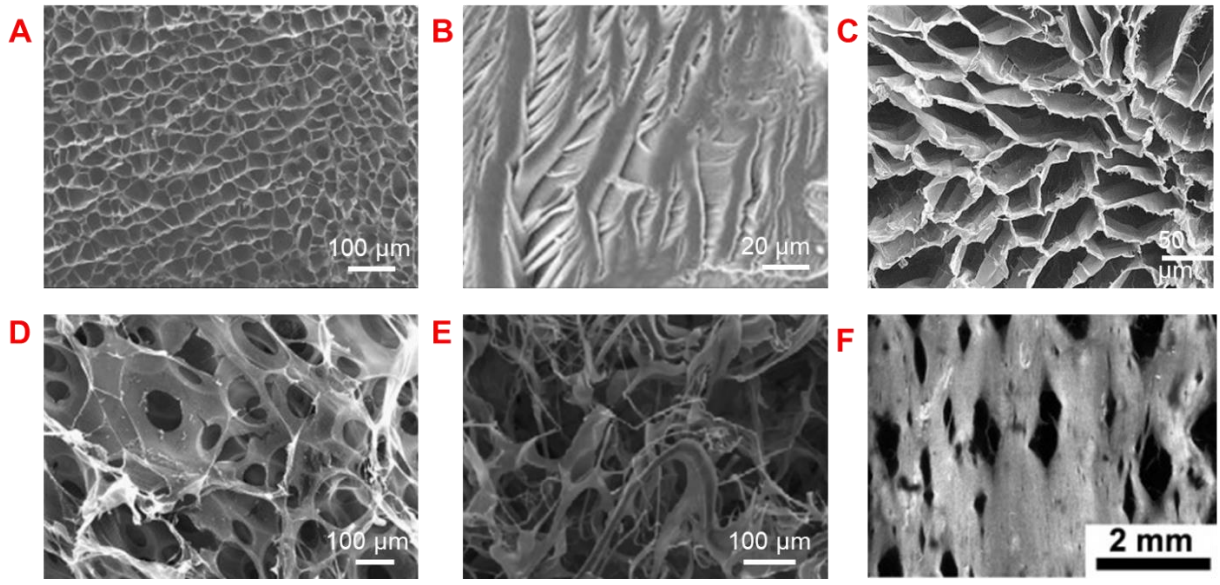


Figure 3 : Clichés en MEB de matériaux macroporeux à base de polymères naturels. (A) gélatine, Wu et al. 2010 ; (B) alginate, Moshaverinia et al. 2012 ; (C) chitosane, Madihally et Matthew 1999 ; (D) cellulose, Zaborowska et al. 2010 ; (E) (F) collagène, Callegari et al. 2007 et Zitnay et al. 2018.

Afin d'améliorer la formation d'une interface biomatériau-tissu (*vs.* encapsulation du biomatériau), des matériaux composites ont été développés (Damien et Parsons 1991) dans l'idée de concilier les avantages des deux matériaux. Ces composites sont généralement des céramiques/polymères synthétiques (*Figure 4A*) (Cao et Kuboyama 2010 ; Xie *et al.* 2012), polymères synthétiques/naturels (*Figure 4B*) (Chen *et al.* 2001 ; Ngiam *et al.* 2009), biopolymère/minéraux (*Figure 4C et D*) (Hatton *et al.* 2019 ; Yokohama *et al.* 2005 ; Pek *et al.* 2008), biopolymères de nature différente (*Figure 4E et F*) (O'Brien *et al.* 2004 ; Tan *et al.* 2009). Cependant, ici encore, ces matériaux ne sont pas biomimétiques en termes d'organisation tridimensionnelle et de propriétés mécaniques notamment car l'organisation de la matrice organique du tissu osseux trabéculaire n'est pas reproduite.

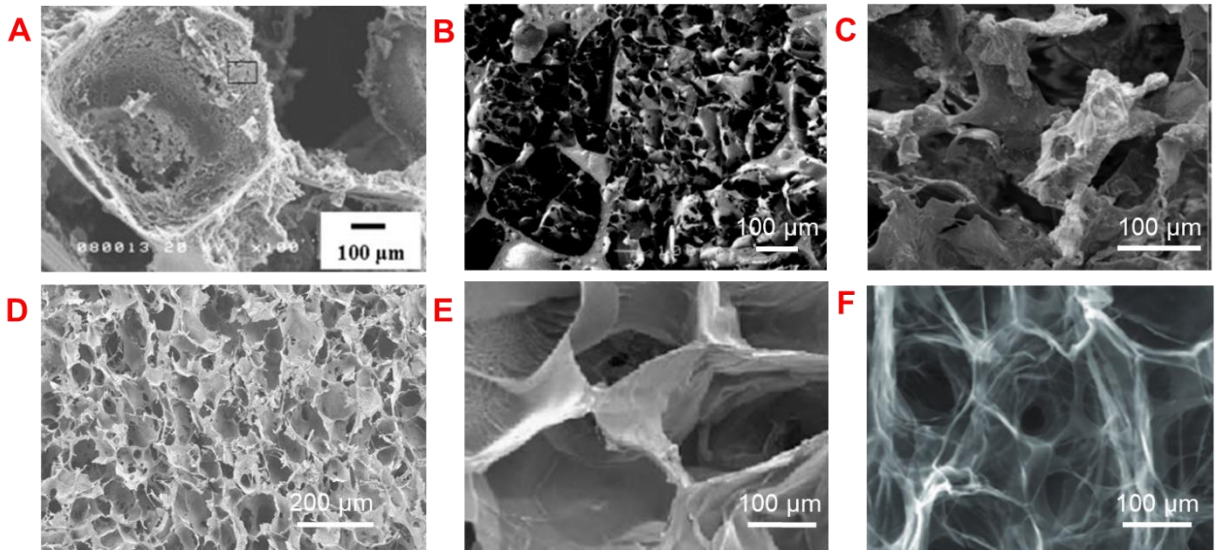


Figure 4 : Clichés en MEB de matériaux poreux composites. (A) PGA- β-TCP, Cao et Kuboyama 2010 ; (B) PLGA-collagène, Chen et al. 2001 ; (C) alginate-bioactive glass, Hatton et al. 2019 ; (D) collagène-CaP, Yokohama et al. 2015 ; (E) gélatine-chitosane-hyaluronane, Tan et al. 2009 ; (F) collagène-GAG, O'Brien et al. 2004.

La microstructure du tissu osseux joue un rôle majeur dans les propriétés notamment pour la différenciation cellulaire (Murphy *et al.* 2014). De plus, il a été montré que des matrices diluées de collagène possédant une forte charge en minéral, possédaient un module élastique du même ordre que des matrices de collagène non minéralisées mais dont l'organisation fibrillaire mimait localement celle trouvée dans l'os (~ 1 GPa) (Nassif *et al.* 2010). Ces résultats ont mis en valeur que l'assemblage suprafibrillaire de la matrice organique conditionnait les propriétés mécaniques du matériau.

La plupart des matériaux poreux synthétiques ne parviennent pas à remplir ces critères. Les recherches associées se focalisent sur la reproduction de la macrostructure de l'os trabéculaire car ils sont bien souvent constitués de composants non-résorbables comme décrit précédemment.

Ainsi, puisque les propriétés du tissu sont directement liées à la structure, nous faisons l'hypothèse que **si l'on reproduit les mêmes architectures organiques tridimensionnelles avec la même composition (fibrilles de collagène de taille homogène, cristaux d'hydroxyapatite carbonatée, eau) que celles du tissu biologique visé, ici le tissu osseux trabéculaire, alors nous serons en mesure d'obtenir les mêmes réponses notamment en terme de comportements cellulaires (*e.g.* colonisation, différenciation, croissance). Ceci constitue en l'absence d'additifs (facteurs de croissance et/ou cellules) pour nous le seul moyen de mettre en place des matériaux ostéoinducteurs compétitifs à la greffe autologue.**

L'objectif est ici d'appliquer *in vitro* des contraintes géométriques sur les mésophases du collagène afin de reproduire l'organisation suprafibrillaire hiérarchique de l'os à l'échelle du tissu trabéculaire en induisant ici aussi du confinement et, ainsi, également d'un point de vue fondamental d'identifier les paramètres physico-chimiques impliqués dans la morphogénèse de ce tissu. Les contraintes imposées visent à contrôler l'arrangement 3D des domaines en contre-plaqués torsadés autour de macropores, que l'on retrouve *in vivo* alignés le long des trabécules osseuses (*Figure 5 Chapitre 2*). Ils suivent un arrangement concentrique dans le tissu compact comme vu dans le chapitre précédent (**Chapitre 3**).

Dans cette démarche bioinspirée, nous avons imaginé plusieurs stratégies de synthèse (foaming, émulsion, ségrégation de phases, microparticules) visant à reproduire la porosité de l'os trabéculaire en mimant l'interaction os trabéculaire-moelle osseuse. Nous avons pour cela dû établir préalablement les caractéristiques de l'os trabéculaire tels que la taille des trabécules osseuses et le diamètre moyen des macropores, (*Tableau 1* **Chapitre 2**). Puis, choisir le procédé et par ce biais le composant permettant de générer des macropores aux dimensions fixées au sein de notre matrice de collagène. Ces procédés me semblent plus complexes que celui établi pour l'os cortical car une nouvelle contrainte est rajoutée : créer de la porosité interconnectée.

I. Vers l'os trabéculaire par un procédé d'émulsion ou d'agents porogènes

Comme décrit dans le **Chapitre 1**, l'os trabéculaire est formé d'un réseau tridimensionnel de travées osseuses délimitant des macropores interconnectés. La moelle osseuse est retrouvée à l'intérieur des macropores (Farhi 2009). On distingue la moelle osseuse rouge, riche en cellules mésenchymateuses, de la moelle osseuse jaune, riche en adipocytes. L'interaction entre le tissu et la moelle osseuse dans la morphogénèse des tissus osseux est encore méconnue dans la littérature (Hoffman *et al.* 2019 ; Fazzi *et al.* 2002).

Les connaissances et le savoir-faire relatif au collagène au laboratoire ont permis de réaliser des matrices denses de collagène mimant l'organisation locale en contre-plaqué torsadé de la matrice organique du tissu osseux (Wang *et al.* 2011 et 2012). Afin de créer de la porosité au sein d'une matrice de collagène, nous allons présenter plusieurs stratégies qui ont été mises en place : (i) un procédé de type « foaming » avec le dégagement gazeux de dioxyde de carbone par la décomposition thermique de carbonate d'ammonium, (ii) la réplique de matériaux macroporeux, (iii) l'émulsion hydrophile/hydrophobe et (iv) l'utilisation d'agents porogènes. Les préparations et les traitements de toutes les matrices sont résumés dans le *Tableau* dans le chapitre **Matériels et Méthodes**.

1. Procédé « foaming »: Carbonates d'ammonium $(NH_4)_2CO_3$

Le carbonate d'ammonium $(NH_4)_2CO_3$ est un sel d'ammonium NH_4^+ et de carbonate CO_3^{2-}. Il se décompose thermiquement entièrement à 58°C en $NH_{3(g)}$ et $CO_{2(g)}$. L'idée ici a été d'utiliser cette décomposition thermique partielle à TA afin d'introduire du $CO_{2(g)}$ au sein d'une solution de collagène concentrée pour faciliter la formation de bulles et de $NH_{3(g)}$ afin de fixer cette structure. En effet, il n'était pour nous pas envisageable de chauffer afin d'éviter la dénaturation irréversible du collagène en gélatine.

Des matrices denses de collagène (> 250 mg/mL) ont été synthétisées par le procédé de dialyse inverse/injection continue (Wang *et al.* 2011) à partir d'une solution acide de collagène peu concentrée (1 mg/mL). L'ajout de carbonate d'ammonium a été effectué dans une seconde seringue reliée au moule d'injection lors du temps d'équilibre du gradient formé au sein du moule (*Figure 5*).

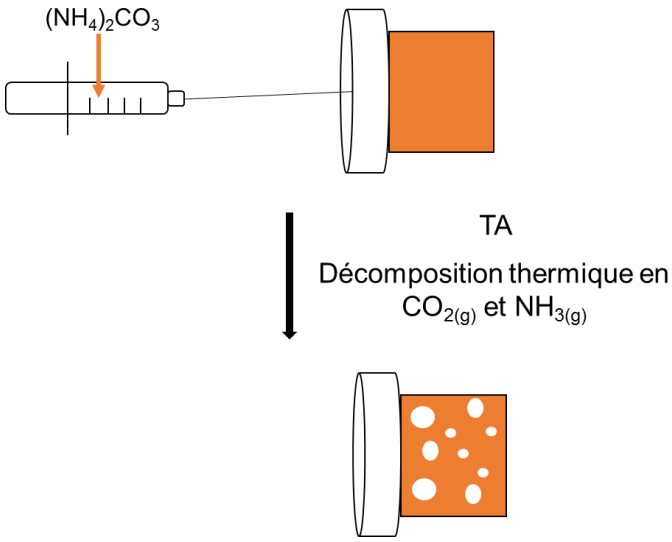


Figure 5 : Schéma illustrant où le carbonate d'ammonium a été utilisé dans les matrices de collagène.

Dans le cas de ces matrices denses de collagène synthétisées en présence de carbonates d'ammonium au sein d'une autre seringue relié au même moule d'injection, on peut observer à l'œil nu que les matrices ne semblent pas présenter de porosités (*Figure 6*).

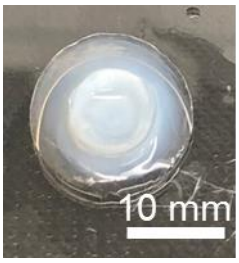


Figure 6 : Photo d'une matrice dense de collagène synthétisée en présence de carbonates.

L'observation de ces matrices en MEB met en évidence des matériaux denses en collagène présentant une organisation anisotrope sur une dizaine de micromètres (*Figure 7A, B et C*). On observe à la surface de la matrice des irrégularités, de l'ordre du micron (*Figure 7D*), qui pourraient être dues à la formation de gaz par la décomposition thermique du carbonate d'ammonium. La formation de porosités au sein de la matrice de collagène aurait notamment nécessité une plus forte pression de gaz. De plus, l'échelle des irrégularités n'est pas la même que celle observée dans le tissu biologique. Ce procédé n'était donc pas adapté en l'état à notre objectif et était trop contraignant à mettre en place.

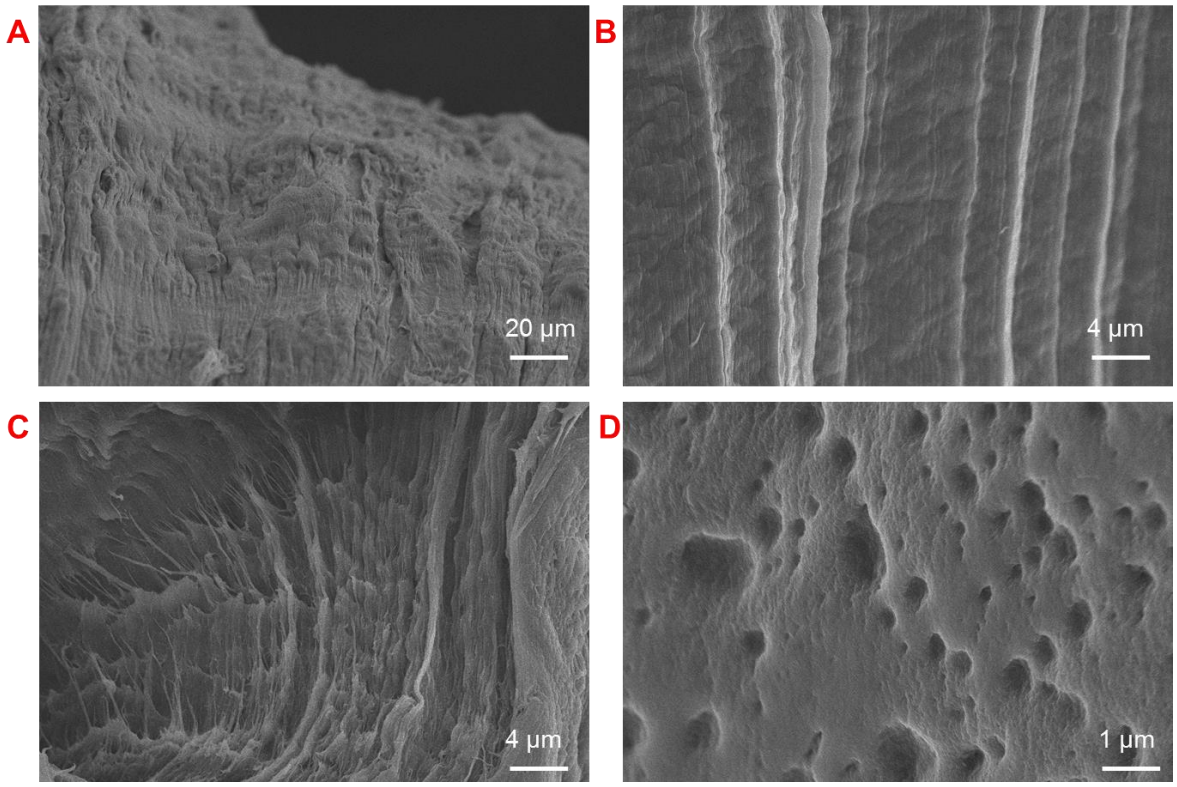


Figure 7 : Clichés en MEB d'une matrice de collagène préparée par injection continue/dialyse inverse en présence de carbonates. (A), (B) et (C) la matrice est dense et des domaines anisotropes sont observés ; (D) des petites porosités ouvertes sont observées en surface de la matrice.

2. Réplique de matériaux macroporeux

Le principe ici a été de faire des répliques de matériaux présentant une macroporosité rappelant celle de l'os trabéculaire. Pour cela, nous avons répliqué un morceau de sucre à l'aide d'une résine élastomère. Le concept est illustré dans la *Figure 8*. Ce modèle simple de sucre a été choisi pour différentes raisons : 1) le sucre est soluble dans l'eau en vue de son élimination, 2) un réseau macroporeux interconnecté est présent entre les microcristaux de sucre, et 3) le sucre est un produit accessible dans le commerce. L'idée a été ensuite d'injecter la solution de collagène au sein de la réplique du sucre.

Une résine polymère (PDMS) est versée sur le sucre, qui est ensuite placé dans une étuve à 60°C pendant 48 h afin de réticuler le PDMS. Le sucre est ensuite éliminé de la résine élastomère par H_2O. Ces modèles sont ensuite placés au sein du moule d'injection. Le collagène a été injecté selon le même procédé décrit dans le chapitre **Matériels et Méthodes** (Partie III – 2). La matrice résultante est exposée aux vapeurs d'ammoniac dans un dessiccateur pendant 48 h après injection/équilibre afin d'induire la précipitation des fibrilles de collagène.

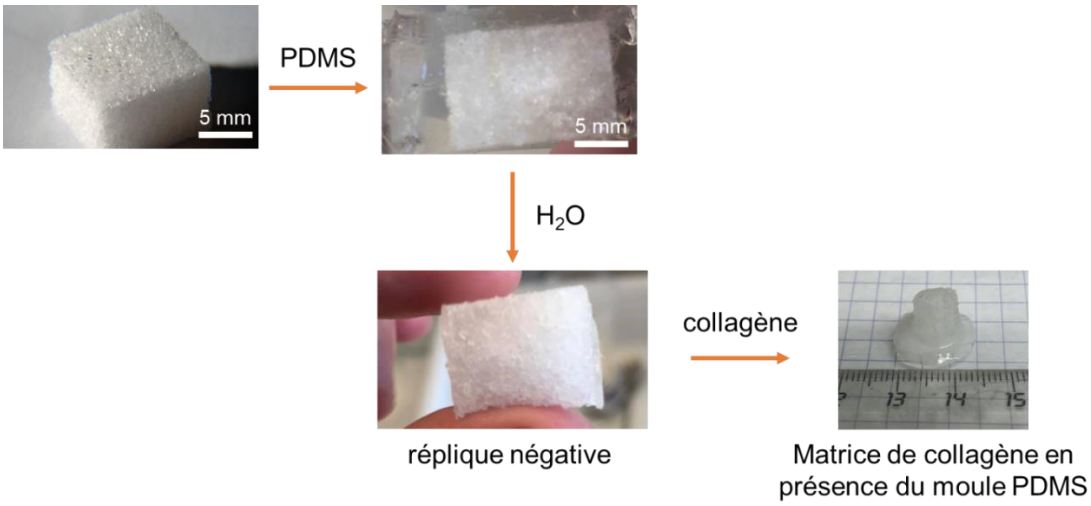


Figure 8 : Principe de la réplique de la porosité du sucre et matrice de collagène obtenue.

La macroporosité de la réplique du modèle de sucre a été comparée à celle du tissu biologique par MEB. On observe que cette macroporosité est semblable avec des diamètres de pores qui sont proches de ceux que l'on souhaitait reproduire, c'est-à-dire environ 200 µm (*Figure 9*). Une étude par porosité Hg aurait permis de caractériser la distribution poreuse et de déterminer avec précision le diamètre moyen des pores formés. Il aurait également pu être intéressant d'effectuer une imprégnation sous-vide afin de pouvoir observer si toute la porosité peut être moulée.

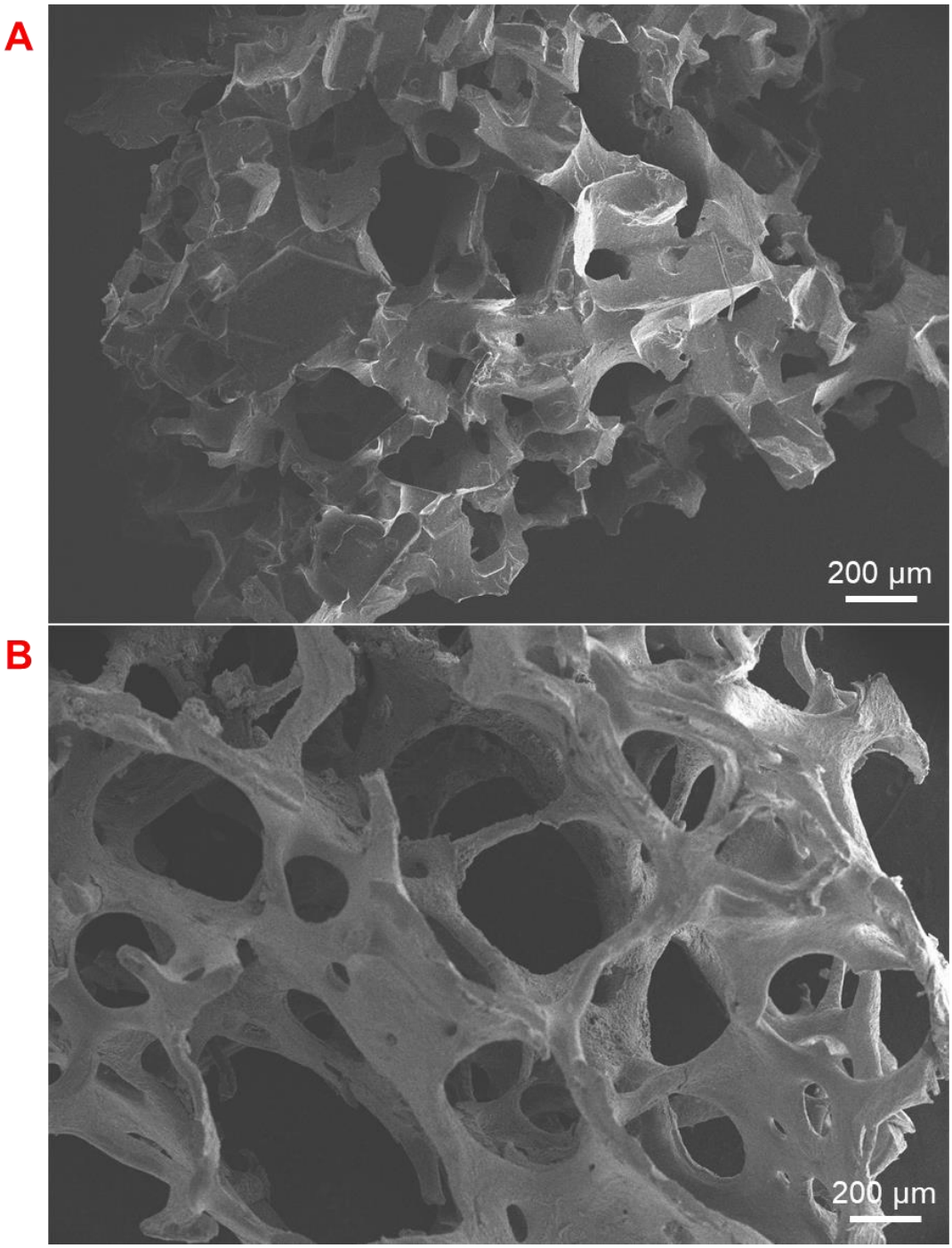


Figure 9 : Clichés en MEB du (A) moule PDMS-sucre et (B) d'un os trabéculaire de brebis décalcifié à l'EDTA.

Après injection de la solution de collagène par le biais du procédé de dialyse inverse/injection continue, on observe à l'œil nu que le moule est bien implanté au sein de la matrice (*Figure 10*). Cependant, il n'est pas possible de faire la distinction entre le collagène et le PDMS. Or, le PDMS étant un polymère chimiquement résistant, il n'a pas été possible de l'éliminer sans dénaturer le collagène ou sans abimer la structure 3D du matériau. Nous avons donc décidé de ne pas poursuivre les caractérisations de ce matériau et l'utilisation de ce procédé.

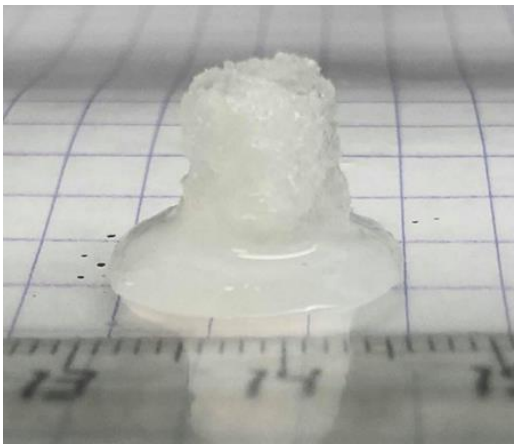


Figure 10 : Photo d'une matrice de collagène préparée par injection continue/dialyse inverse en présence du moule PDMS-sucre.

3. Procédés d'émulsion collagène-huile ou ségrégation de phases

Pour les deux procédés, des rapports 50/50 produit/solution de collagène en volume ont été préparés dans des Eppendorfs, puis soniqués et vortexés afin de faciliter la diffusion des composés au sein de la solution concentrée de collagène. Une goutte d'indicateur coloré universel a été ajouté afin de pouvoir suivre l'évolution du pH lors de la diffusion de vapeurs d'ammoniac pendant 96 h pour induire la précipitation des fibrilles de collagène. La phase est ensuite « éliminée » en plaçant la matrice dans une étuve à 37°C pendant plusieurs jours (*Figure 11*).

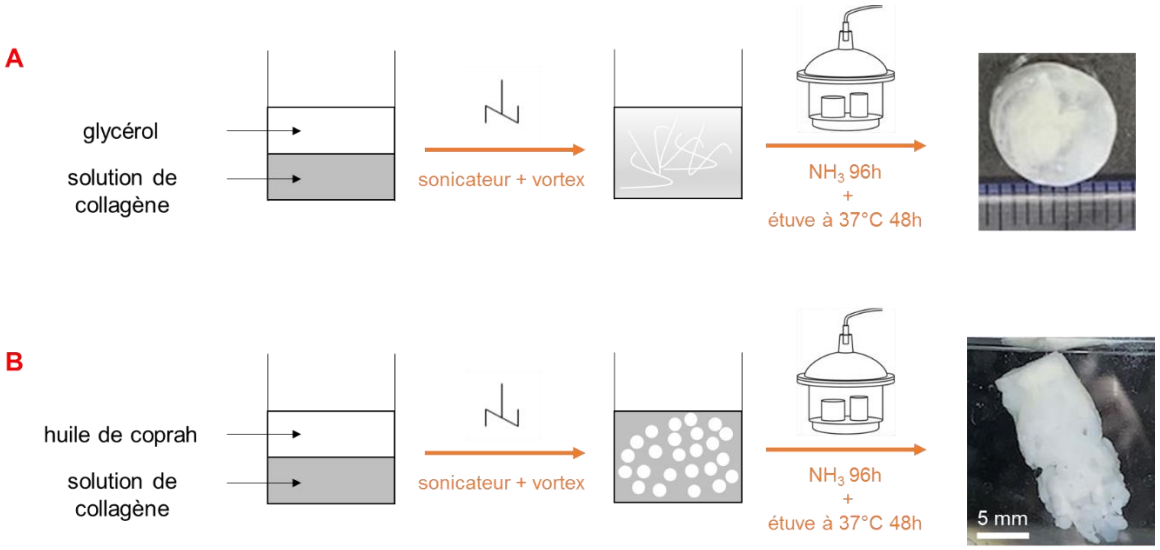


Figure 11 : Schémas illustrant les procédés de ségrégation de phases (A) et d'émulsion (B).

1) Ségrégation de phases collagène/glycérol

Dans le cas d'une ségrégation de phases, nous avons utilisé un composé : le glycérol. Le glycérol est un composé dont les interactions avec le collagène ont été étudiées dans la littérature pour ses propriétés de stabilisation de la triple hélice (Penkova *et al.* 1999). Sa viscosité (Segur et Oberstar 1951) lui donne des propriétés intéressantes dans notre étude. De plus, il est utilisé dans la littérature pour générer des scaffolds 3D par freeze-casting (Fu *et al.* 2007 ; Porter *et al.* 2013)

Le schéma du procédé est présenté dans la *Figure 11A*. Ici, l'idée était de mélanger la solution acido-soluble de collagène et le glycérol à grande vitesse afin d'induire une dispersion du collagène dans le glycérol. Sous vapeurs d'ammoniaque, les molécules de collagène précipitent tandis que le glycérol non. Le glycérol a été ensuite éliminé par des nettoyages successifs dans des bains de tampon phosphate (PBS). Ce procédé de ségrégation de phases nous a permis d'observer au sein de la matrice formée des différences de densité qui semblent indiquer la présence de porosités fermées (*) (*Figure 12*).

*Figure 12 : Photo de la matrice collagène-glycérol 50/50 (40 mg/mL). La présence d'agglomérats est notée par une *.*

.

En effet, les observations par MEB de la matrice permettent de mettre en évidence des hétérogénéités de structure. La présence de feuillets semble délimiter de larges macropores (*Figure 13A*). Cette structure rappelle l'observation de la porosité de l'os trabéculaire non décalcifié de brebis (*Figure 13B*) mais est différente de celle observée en *Figure 9A*. L'organisation des fibrilles de collagène dans les feuillets met en évidence des domaines d'alignements (*Figure 13C*) et des strates (*Figure 13D*) indiquant que ce procédé est prometteur pour l'objectif visé.

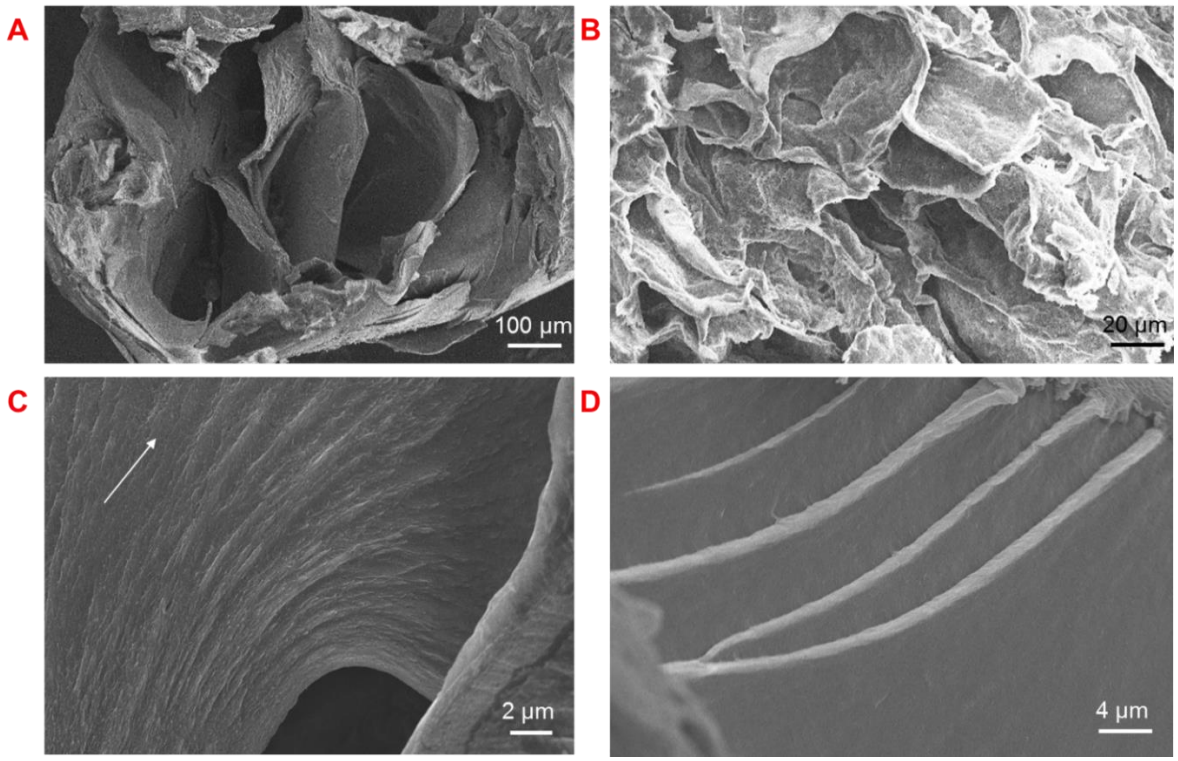


Figure 13 : Clichés en MEB de (A) la matrice collagène-glycérol 50-50 et (B) de l'os trabéculaire non décalcifié de brebis. Des organisations tridimensionnelles du collagène au sein de (A) sont observées avec des domaines (C) d'alignements et (D) de strates.

Ce procédé permet de créer de la porosité au sein de la matrice de collagène, cependant il reste à prouver d'une part, la présence d'interconnectivité entre les pores et à en déterminer la morphologie (*e.g.* cylindres, feuillets) et d'autre part, d'effectuer des caractérisations en MET sur des coupes ultrafines et en MOLP sur des coupes histologiques afin de pouvoir conclure quant au caractère biomimétique des structures fibrillaires.

2) Emulsion collagène-coprah

L'émulsion a été effectuée avec deux liquides non miscibles qui ont été dans notre cas : (1) une solution acido-soluble de collagène, concentrée soit par évaporation soit par mise en solution des microparticules de collagène dans l'acide acétique, à 40 ou 65 mg/mL, et (2) de l'huile de coprah. L'huile de coprah est un composé hydrophobe riche en acides gras saturés dont la température de fusion est comprise entre 23 et 30°c selon son hydrogénation. L'utilisation de cette huile nous a permis de créer une émulsion collagène-coprah. Le coprah présente aussi l'avantage de pouvoir être facilement éliminée de la matrice de collagène à 35-37°C sans dénaturer le collagène. Le processus est illustré dans la *Figure 11B.*

On a observé à l'œil nu, après élimination de l'excédent d'huile dans une étuve à 37°C pendant 48 h, la présence de porosités au sein de la matrice (*Figure 14*).

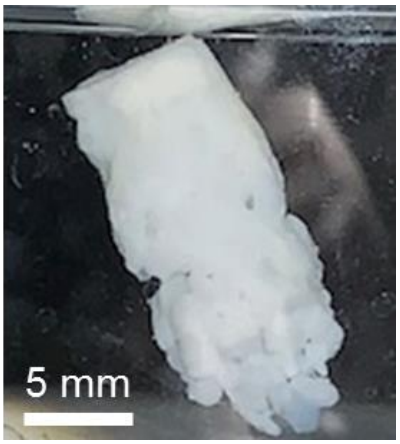


Figure 14 : Photo de la matrice de collagène-coprah synthétisée par émulsion (40 mg/mL) après 48 h dans une étuve à 37°C.

Nous avons ensuite observé par MEB la matrice afin de mettre en évidence la présence de cette porosité (*Figure 15A*). Les murs de la matrice sont denses et semblent homogènes en taille de fibrilles. On distingue la présence de porosités à la surface de la matrice lesquelles semblent présenter parfois une interconnectivité (*). L'ensemble des observations semblent indiquer un diamètre de pores variant entre 30 et 200 µm (*Figure 15B*), ce qui correspond à une échelle de valeurs satisfaisante par rapport à celle établie dans le **Chapitre 2**.

A plus fort grandissement, on observe une texture des fibrilles particulière (*Figure 15C*). Ceci peut s'expliquer par la présence résiduelle de coprah lors de l'étape de fibrillogénèse. Il est en effet difficile d'éliminer l'intégralité de l'huile. Sans autre caractérisations, il est difficile de conclure quant à la présence d'organisations cholestériques des fibrilles sur les lamelles délimitant les pores.

Bien que prometteur, ce procédé ne nous a pas permis de reproduire l'architecture tridimensionnelle de l'os trabéculaire. Ce procédé pourrait être amélioré en utilisant un solvant miscible avec l'huile de coprah ne dénaturant pas le collagène. Il aurait été aussi intéressant de pouvoir agiter l'émulsion à très grande vitesse tout en induisant la fibrillogénèse en même temps afin de figer l'émulsion.

Il serait nécessaire de vérifier si la totalité de l'huile de coprah est éliminée par ATG ou RMN. Afin de caractériser la macroporosité, il faudrait ici encore effectuer des études par porosimétrie Hg. De plus, l'observation de coupes histologiques de nos matériaux en lumière polarisée permettrait d'étudier les organisations anisotropes.

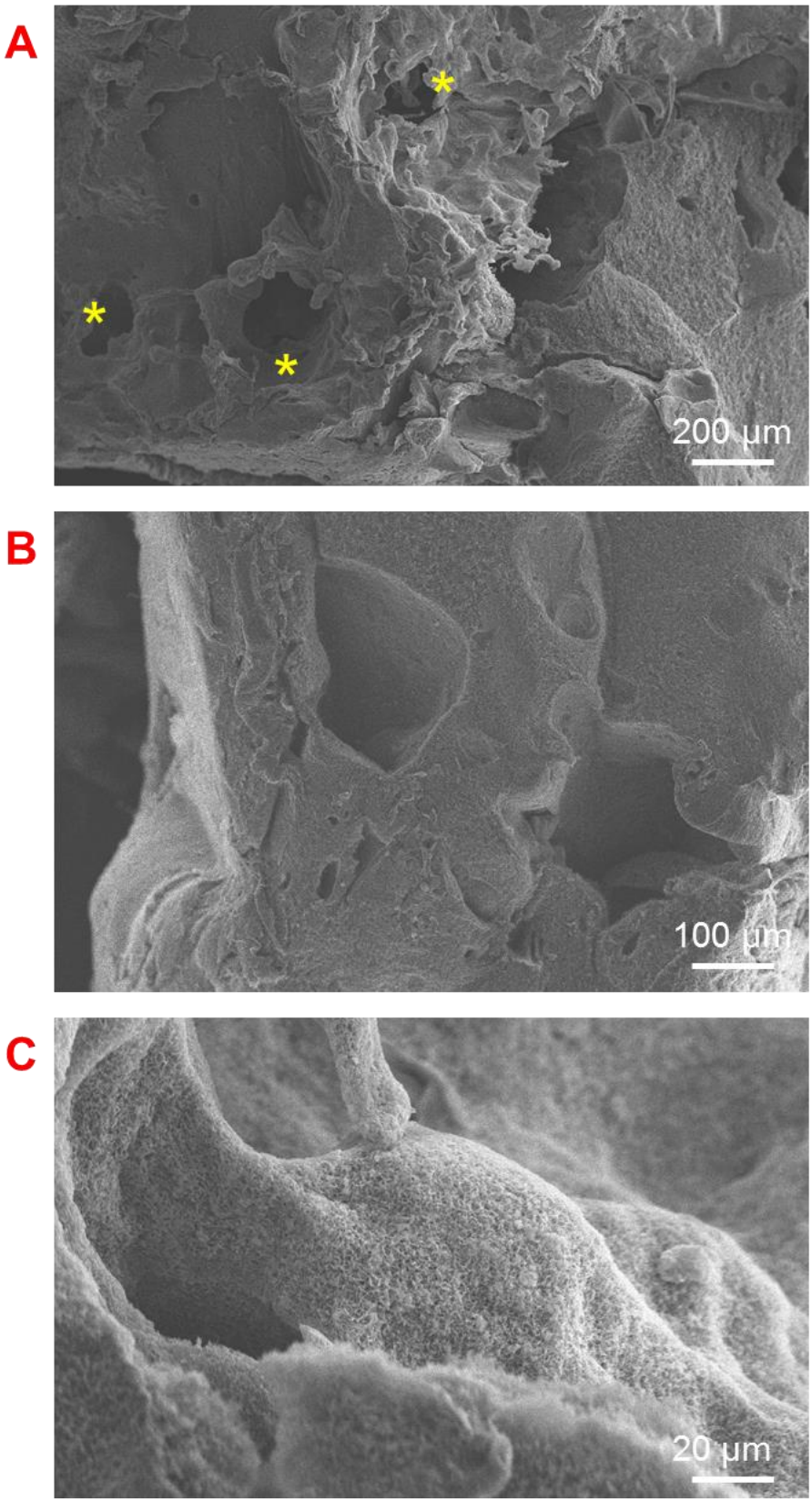


Figure 15 : Clichés en MEB d'une matrice collagène-coprah 50-50 (40 mg/mL). La présence de porosité ouverte est observée (A) (B). A plus fort grandissement, on observe un aspect fibrillaire particulier (C).

4. Templating par utilisation d'agents porogènes

Pour les mêmes raisons évoquées que précédemment, des microparticules d'huile de coprah ont été utilisées comme agents porogènes. Elles ont été synthétisées à l'aide d'une unité d'encapsulation. Le procédé est illustré dans la *Figure 16A*. L'huile de coprah est atomisée par flux d'air, les microparticules sont immédiatement figées dans de l'azote liquide. Différents rapports collagène-microparticules en volume ont été étudiés afin de favoriser la présence des microparticules pour générer de la porosité interconnectée (**Matériels et Méthodes**). Le mélange coprah-collagène est maintenu dans un bain de glace afin de figer l'huile, puis placé dans un dessiccateur sous vapeurs d'ammoniaque pendant 96 h afin d'induire la fibrillogénèse. La porosité est révélée en plaçant l'échantillon dans une étuve à 37°C pendant 48 h (*Figure 16B*), qui varie macroscopiquement de 50 à 300 µm.

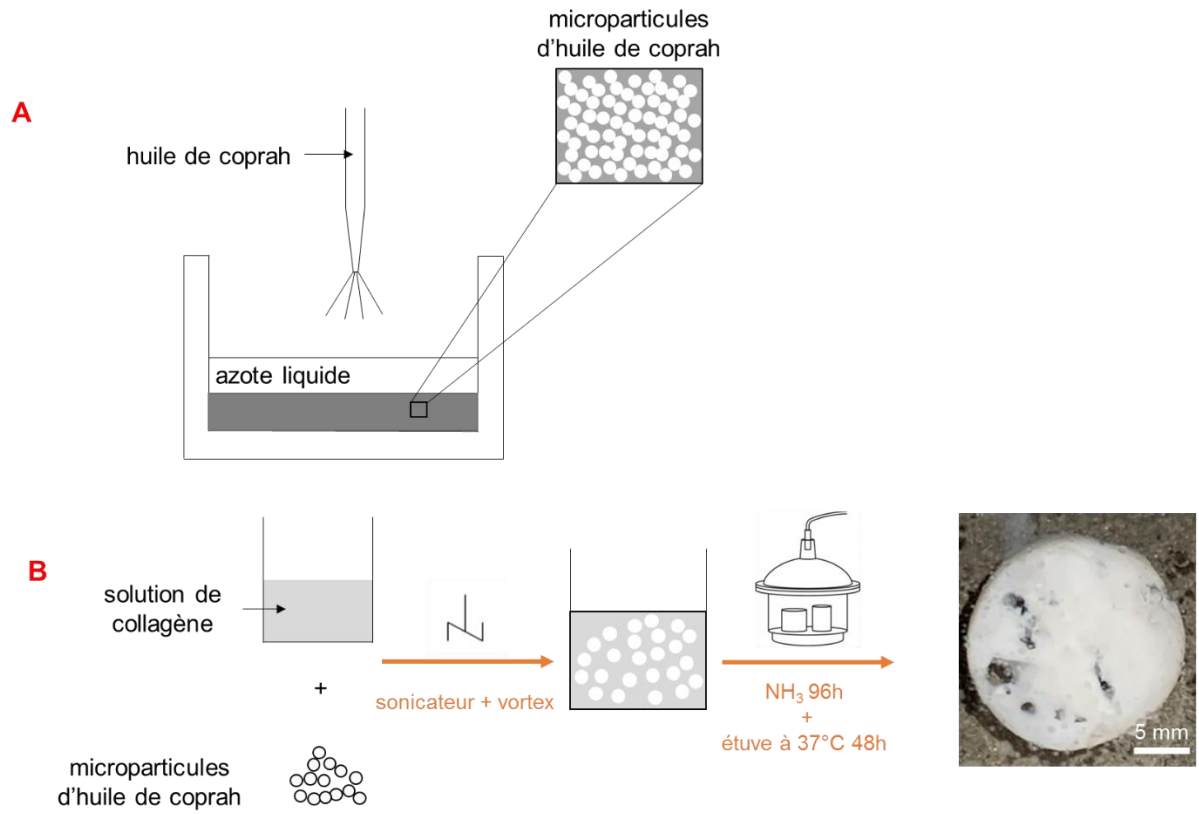


Figure 16 : Schéma illustrant le procédé de synthèse des microparticules d'huile de coprah (A) et de préparation de la matrice de collagène en présence des microparticules de coprah (B).

Etant donné, la température de fusion de l'huile de coprah, il n'a pas été possible de caractériser la taille de ces microparticules par les techniques mises à notre disposition au laboratoire. Cette information a été déduite par la dimension des pores dans nos matrices à l'œil nu et par MEB.

Le procédé d'encapsulation nous a permis d'obtenir une poudre de microparticules d'huile de coprah. La vitesse et la pression d'injection sont fixées (cf. **Matériels et Méthodes, V- 2**).

Il est à noter que lors de nos expériences, un facteur de rapidité d'exécution des tâches a dû être pris en compte étant donné que les microparticules sont directement figées dans de l'azote liquide. Il est nécessaire d'élaborer les mélanges microparticules/collagène rapidement afin que les microparticules de coprah ne fondent pas.

Les observations en MEB des matrices obtenues suivant différents rapport collagène/microparticules en volume ont permis d'évaluer la formation de macroporosités au sein des matériaux. Les matrices sont homogènes et denses en fibrilles de collagène dans les murs.

Pour des rapports 70/30 et 50/50 (*Figure 17A et B*), on a pu constater que la présence de macroporosités au sein de la matrice de collagène est relativement faible avec un diamètre moyen respectif de 100 et 20 µm (*Figure 17A' et B'*).

Pour un rapport 30/70 (*Figure 17C*), la présence de macroporosités est favorisée par l'augmentation du volume de microparticules de coprah. Ce rapport collagène/coprah est donc le plus adapté pour observer une interconnectivité des macropores.

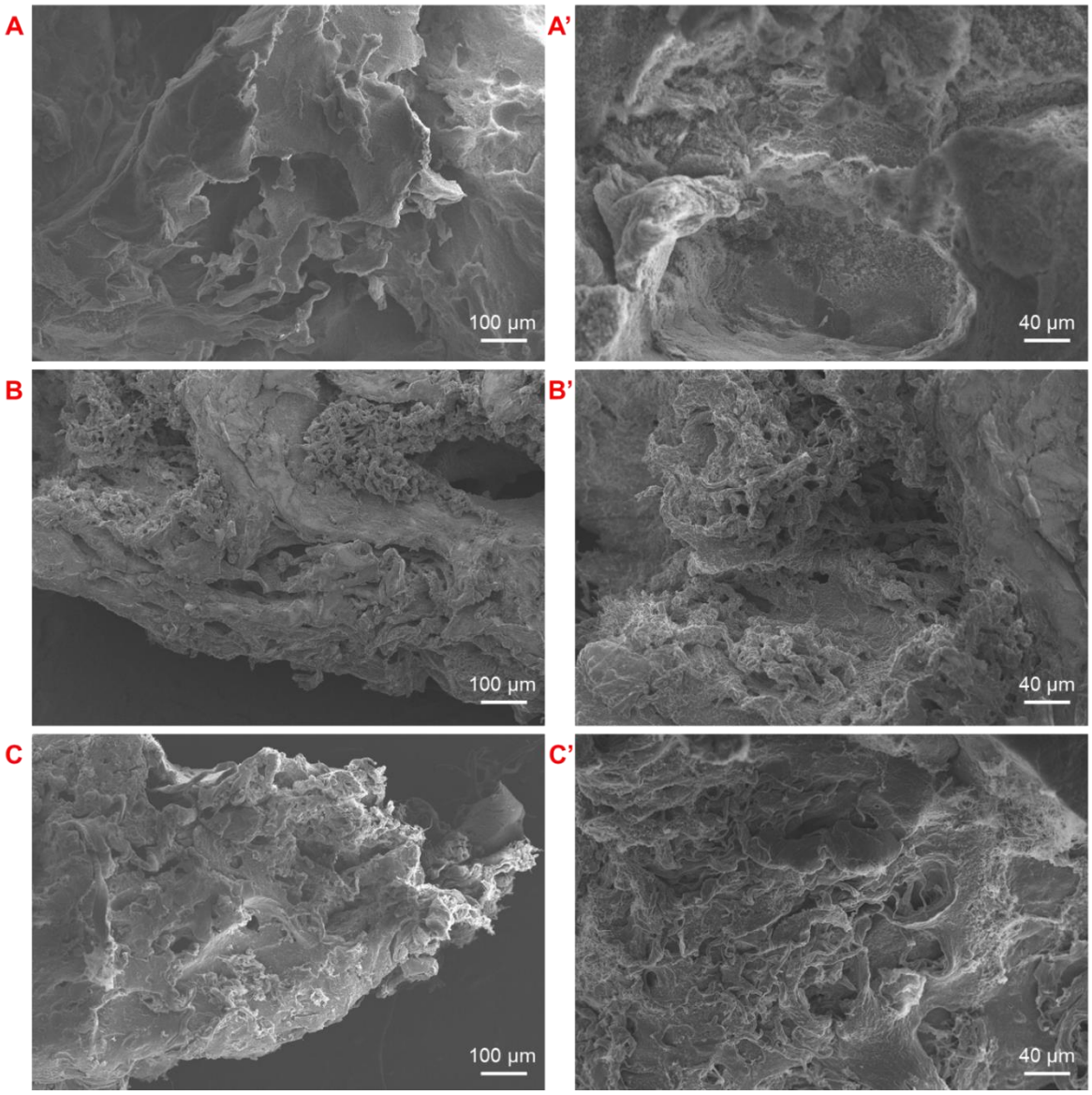


Figure 17 : Clichés par MEB des matrices de collagène synthétisées en présence de microparticules de coprah à différents rapports collagène/microparticules en volume : (A) 70/30 ; (B) 50/50 et (C) 30/70. Des clichés à plus fort grandissement (A'), (B') et (C') ont été faits de (A), (B) et (C) pour observer la macroporosité.

Les observations par MEB d'une matrice 30/70 en volume montrent la présence de pores sur une large partie de l'échantillon avec un diamètre moyen d'environ 50 µm (*Figure 18A*), ce qui correspond à une échelle basse de la gamme de porosités établie pour l'os trabéculaire (**Chapitre 2**). De la porosité interconnectée est également observée au sein de la matrice (*) (*Figure 18B*). En ce qui concerne le réseau fibrillaire, de larges domaines d'alignements sont observés à plus fort grandissement (flèches blanches) (*Figure 18C*).

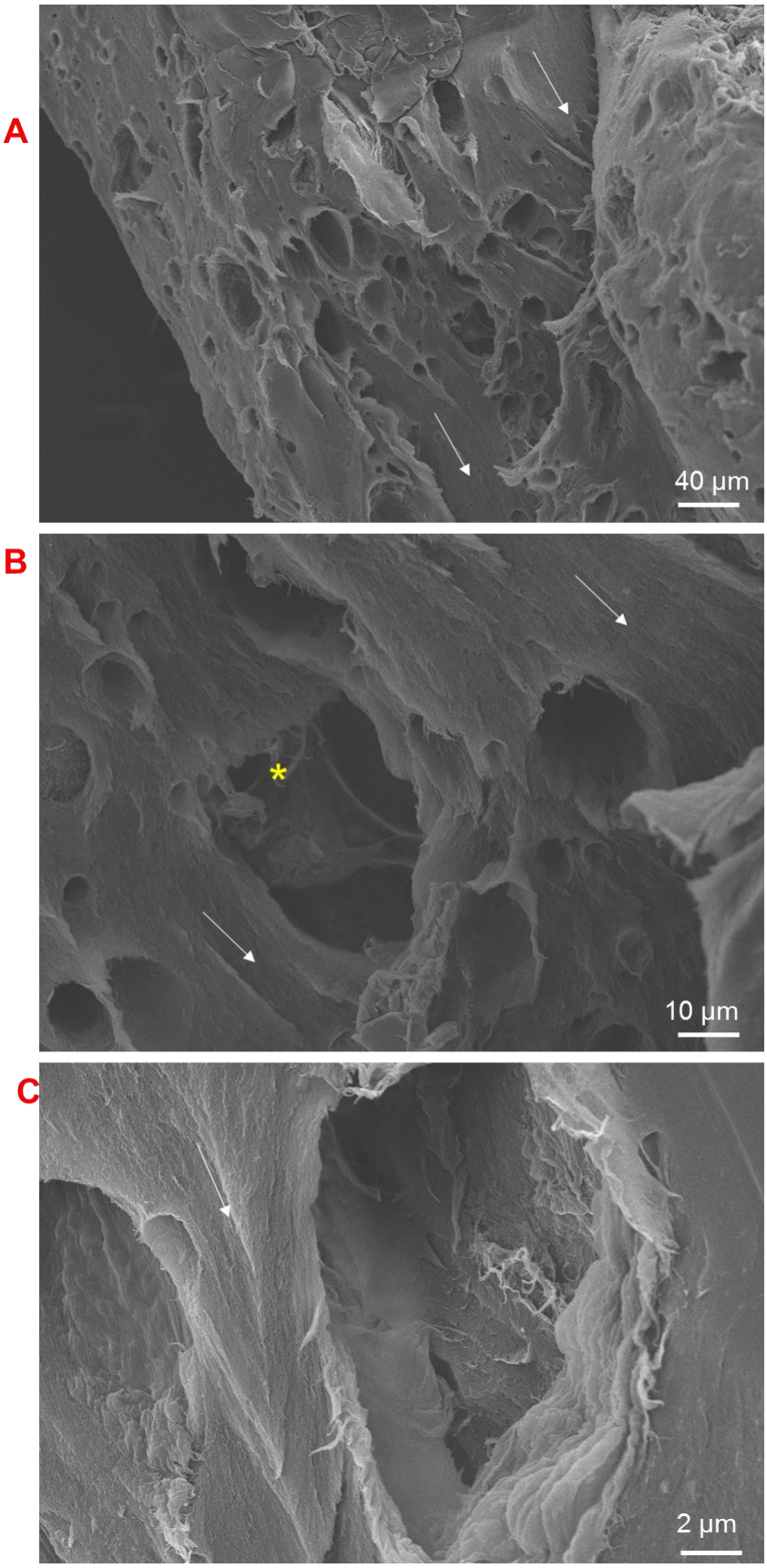


*Figure 18 : Clichés en MEB de la matrice collagène-coprah (30/70 en volume) (40 mg/mL). La diamètre moyen observé des pores est de 50 µm (A). Des pores interconnectés sont observés par une * (B)(C). Les domaines d'alignements sont indiqués par des flèches blanches.*

L'utilisation des microparticules de coprah en tant qu'agents porogènes permet, sans dénaturation du collagène, d'obtenir une porosité homogène qui semble. En comparaison avec les travaux de la littérature. La microporosité du tissu trabéculaire a été reproduite mais en travaillant sur des rapports coprah/collagène où le coprah est en fort excès, nous pourrions observer des tailles de pores plus importantes. L'organisation fibrillaire de l'os trabéculaire ne semble pas atteinte car nous n'avons pu observer la présence de domaines cholestériques sur nos matrices, cependant en l'absence de caractérisations en MET, il est difficile de pouvoir réellement conclure sur l'organisation suprafibrillaire qui résulte de la formation de porosité au sein de la matrice de collagène. Il aurait également été intéressant de pouvoir visualiser le réseau formé par la porosité intrinsèque de notre matériau en 3D par tomographie RX mais également d'effectuer des coupes fines par faisceau d'ions focalisés FIB et les observer par MEB

II. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons proposé des voies de synthèse variées et originales pour reproduire l'organisation de l'os trabéculaire à l'échelle suprafibrillaire. Ces approches comprennent le procédé « foaming », la réplication à partir d'un moule, la séparation de phases, le templating par émulsion ou par un agent porogène. Certaines d'entre elles n'ont pas abouti. D'autres approches ont permis de reproduire la microporosité de l'os trabéculaire sans dénaturation du collagène. L'approche la plus prometteuse consiste à utiliser l'huile de coprah comme template. J'ai constaté que les interactions collagène/huile (hydrophile/hydrophobe) influencent l'aspect des fibrilles ; il faudra donc améliorer le procédé d'extraction de l'huile de coprah, qui est également un problème identifié récurrent dans les émulsions. J'ai pu identifier que l'immiscibilité entre l'huile et le collagène pouvait mener à la formation de porosités interconnectées similaires à celles observées dans le tissu biologique. Cependant, le réseau de macropores interconnectés et l'organisation en contre-plaqué torsadé n'ont pu être reproduits dans nos matrices. Ces procédés n'excluent cependant pas l'implication d'un rôle de la moelle osseuse dans la formation du tissu osseux trabéculaire et de l'effet du confinement dans la formation de ces porosités *in vivo*.

En parallèle, l'utilisation du glycérol a permis d'élaborer des matériaux avec une texture en feuillets qui n'est pas la structure visée mais qui peut être intéressante pour la suite.

Je n'ai néanmoins pas pu davantage caractériser l'organisation tridimensionnelle de l'os trabéculaire à l'échelle suprafibrillaire et du réseau poreux. Des investigations en MET sur coupes ultrafines et MOLP sur coupes histologiques devraient nous renseigner sur une possible organisation en contre-plaqué au sein de nos modèles et du caractère mimétique ou pas de la macroporosité sur l'agencement spatial du collagène.

Références bibliographiques

Ambrosio, A. M. A., J. S. Sahota, Y. Khan, et C. T. Laurencin. 2001. « A novel amorphous calcium phosphate polymer ceramic for bone repair: synthesis and characterization ». *Journal of Biomedical Materials Research* 58 (3): 295-301.

Babensee, J. E., J. M. Anderson, L. V. McIntire, et A. G. Mikos. 1998. « Host response to tissue engineered devices ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Tissue Engineering, 33 (1): 111-39.

Baker, K. C., T. Maerz, H. Saad, P. Shaheen, et R. M. Kannan. 2015. « *In vivo* bone formation by and inflammatory response to resorbable polymer-nanoclay constructs ». *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 11 (8): 1871-81.

Bauer, T3 W., et G. F. Muschler. 2000. « Bone graft materials: an overview of the basic science ». *Clinical Orthopaedics and Related Research*® 371: 10–27.

Bokhari, M., R. J. Carnachan, S. A. Przyborski, et N. R. Cameron. 2007. « Emulsion-templated porous polymers as scaffolds for three-dimensional cell culture: effect of synthesis parameters on scaffold formation and homogeneity ». *Journal of Materials Chemistry* 17 (38): 4088-94.

Bolland, B. J. R. F., J. M. Kanczler, P. J. Ginty, S. M. Howdle, K. M. Shakesheff, D. G. Dunlop, et R. O. C. Oreffo. 2008. « The application of human bone marrow stromal cells and poly(Dl-Lactic Acid) as a biological bone graft extender in impaction bone grafting ». *Biomaterials* 29 (22): 3221-27.

Buckley, C. T., et K. Unai O'Kelly. 2010. « Fabrication and characterization of a porous multidomain hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering investigations ». *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 93B (2): 459-67.

Buckley, C. T., et K. Unai O'Kelly. 2010. « Maintaining cell depth viability: on the efficacy of a trimodalscaffold pore architecture and dynamic rotational culturing ». Journal of Materials Science: Materials in Medecine 21:1731-1738.

Callegari, A., S. Bollini, L. Iop, A. Chiavegato, G. Torregrossa, M. Pozzobon, G. Gerosa, P. De Coppi, N. Elvassore, et S. Sartore. 2007. « Neovascularization induced by porous collagen scaffold implanted on intact and cryoinjured rat hearts ». *Biomaterials* 28 (36): 5449-61.

Cao, H., et N. Kuboyama. 2010. « A biodegradable porous composite scaffold of PGA/β-TCP for bone tissue engineering ». *Bone* 46 (2): 386-95.

Carson, J.a S., et M. P. G. Bostrom. 2007. « Synthetic bone scaffolds and fracture repair ». *Injury, Scientific basis of fracture healing: an update*, 38 (1, Supplement): S33-37.

Chen, G., T. Ushida, et T. Tateishi. 2001. « Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering ». *Materials Science and Engineering* 17 (1): 63-69.

Chen, J., et K. Park. 2000. « Synthesis and characterization of superporous hydrogel composites ». *Journal of Controlled Release* 65 (1): 73-82.

Chen, S., N. Kawazoe, et G. Chen. 2017. « Biomimetic assembly of vascular endothelial cells and muscle cells in microgrooved collagen porous scaffolds ». *Tissue Engineering Part C: Methods* 23 (6): 367-76.

Chevalier J. et L. Gremillard. 2009. « Ceramics for medical application: a picture for the next 20 years ». *Journal for the European Ceramic Society* 29 (7): 1245-55.

Conz, M. B., J. M. Granjeiro, et G. de Almeida Soares. 2005. « Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical-dental applications as bone graft ». *Journal of Applied Oral Science* 13 (2): 136-40.

Coombes, A. G. A., et J. D. Heckman. 1992. « Gel casting of resorbable polymers: 2. *In vitro* degradation of bone graft substitutes ». *Biomaterials* 13 (5): 297-307.

Coombes, A. G. A., et M. C. Meikle. 1994. « Resorbable synthetic polymers s replacements for bone graft ». *Clinical Materials* 17 (1): 35-67.

Costa-Pinto, A. R., R. L. Reis, et N. M. Neves. 2011. « Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan ». *Tissue Engineering Part B: Reviews* 17 (5): 331-47.

Damien, C. J., et J. R. Parsons. 1991. « Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications ». *Journal of Applied Biomaterials* 2 (3): 187-208.

Denry I., et J. A. Holloway. 2014. « Low temperature sintering of fluorapatite glass-ceramics ». *Dental Materials* 30 (2): 112-121.

Eglin, D., D. Mortisen, et M. Alini. 2009. « Degradation of synthetic polymeric scaffolds for bone and cartilage tissue repairs ». *Soft Matter* 5 (5): 938-47.

Farhi D.C. 2009. *Pathology of Bone Marrow and Blood Cells*, Seconde Edition. Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, PA.

Fazzi, R., S. Galimberti, R. Testi, S. Pacini, S. Trasciatti, S. Rosini, et M. Petrini. 2002. « Bone and bone marrow interactions: hematological activity of osteoblastic growth peptide (OGP)-derived carboxy-terminal pentapeptide: ii. action on human hematopoietic stem cells ». *Leukemia Research* 26 (9): 839-48.

Fu, Q., M. N. Rahaman, F. Dogan, et B. S. Bal. 2008. « Freeze casting of porous hydroxyapatite scaffolds. I. processing and general microstructure ». *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 86B (1): 125-35.

Giannoudis, P. V., H.s Dinopoulos, et E. Tsiridis. 2005. « Bone substitutes: an update ». *Injury, Proceedings from the 1st European Clinical Symposium on Bone and Tissue Regeneration* 36 (3, Supplement): S20-27.

Glowacki, J., M. Jasty, et S. Goldring. 1986. « Comparison of multinucleated cells elicited in rats by particulate bone, polyethylene, or polymethylmethacrylate ». *Journal of Bone and Mineral Research* 1 (4): 327-31.

Gorna, K., et S. Gogolewski. 2003. « Preparation, degradation, and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes ». *Journal of Biomedical Materials Research* Part A 67A (3): 813-27.

Gorna, K., et S. Gogolewski. 2006. « biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration ». *Journal of Biomedical Materials Research* Part A 79A (1): 128-38.

Grinberg, O., I. Binderman, H. Bahar, et M. Zilberman. 2010. « highly porous bioresorbable scaffolds with controlled release of bioactive agents for tissue-regeneration applications ». *Acta Biomaterialia* 6 (4): 1278-87.

Han, J., G. Ma, et J. Nie. 2011. « A facile fabrication of porous PMMA as a potential bone substitute ». *Materials Science and Engineering*: C 31 (7): 1278-84.

Hatton, J., G. R. Davis, A.-H. I. Mourad, N. Cherupurakal, R. G. Hill, et S. Mohsin. 2019. « Fabrication of porous bone scaffolds using alginate and bioactive glass ». *Journal of Functional Biomaterials* 10 (1): 15.

Haugen, H. J., S. P. Lyngstadaas, F. Rossi, et G. Perale. 2019. « Bone grafts: which is the ideal biomaterial ? » *Journal of Clinical Periodontology* 46 (S21): 92-102.

Hoffman, C. M., J. Han, et L. M. Calvi. 2019. « Impact of aging on bone, marrow and their interactions ». *Bone*, Bone and Hematopoiesis, 119: 1-7.

Janik, H., et M. Marzec. 2015. « A review: fabrication of porous polyurethane scaffolds ». *Materials Science and Engineering* 48: 586-91.

Kumar, P., B. Vinitha, et G. Fathima. 2013. « Bone grafts in dentistry ». *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 5 (Suppl 1): S125-27.

Landi, E., G. Celotti, G. Logroscino, et A. Tampieri. 2003. « Carbonated hydroxyapatite as bone substitute ». *Journal of the European Ceramic Society*, Ceramic and Metal Interfaces, 23 (15): 2931-37.

Laurencin, C., Y. Khan, et S. F. El-Amin. 2006. « Bone graft substitutes ». *Expert Review of Medical Devices* 3 (1): 49-57.

Lee, J.-Y., S.-H. Nam, S.-Y. Im, Y.-J. Park, Y.-M. Lee, Y.-J. Seol, C.-P. Chung, et S.-J. Lee. 2002. « Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials ». *Journal of Controlled Release, Proceedings on the Tenth International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems*, 78 (1): 187-97.

Li, X., Q. Feng, Y. Jiao, et F. Cui. 2005. « Collagen-based scaffolds reinforced by chitosan fibres for bone tissue engineering ». *Polymer International* 54 (7): 1034-40.

Madihally, S. V., et H. W. T. Matthew. 1999. « Porous chitosan scaffolds for tissue engineering ». *Biomaterials* 20 (12): 1133-42.

Moore, W. R., S. E. Graves, et G. I. Bain. 2001. « Synthetic bone graft substitutes ». *ANZ Journal of Surgery* 71 (6): 354-61.

Moshaverinia A., C. Chen, K. Akiyama, S. Ansari, X. Xu, W. W. Chee, S. R. Schricker et S. Shi. 2012. « Alginate hydrogel as a promising scaffold for dental-derived stemcells: an *in vitro* study » *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23:3041-3051.

Murphy W. L., T. C. McDevitt et A. J. Engler, 2014. « Materials as stem cell regulators ». *Nature Materials* 13:547-557.

Murphy, S. V., et A. Atala. 2014. « 3D bioprinting of tissues and organs ». *Nature Biotechnology* 32 (8): 773-85.

Nakanishi, K., et N. Tanaka. 2007. « Sol–gel with phase separation. hierarchically porous materials optimized for high-performance liquid chromatography separations ». *Accounts of Chemical Research* 40 (9): 863-73.

Nassif, N., F. Gobeaux, J. Seto, E. Belamie, P. Davidson, P. Panine, G. Mosser, P. Fratzl, et M.-M. Giraud Guille. 2010. « Self-assembled collagen−apatite matrix with bone-like hierarchy ». *Chemistry of Materials* 22 (11): 3307-9.

Ngiam, M., S. Liao, A. J. Patil, Z. Cheng, F. Yang, M. J. Gubler, S. Ramakrishna, et C. K. Chan. 2008. « Fabrication of mineralized polymeric nanofibrous composites for bone graft materials ». *Tissue Engineering Part A* 15 (3): 535-46.

O'Brien, F. J., B. A. Harley, I. V. Yannas, et L. J. Gibson. 2005. « The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds ». *Biomaterials* 26 (4): 433-41.

O'Brien, Fergal J. 2011. « Biomaterials & scaffolds for tissue engineering ». *Materials Today* 14 (3): 88-95.

O'Brien, F. J., B. A. Harley, I. V. Yannas, et L. Gibson. 2004. « Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds ». *Biomaterials* 25 (6): 1077-86.

Passuti N., Daculsi G, Rogez Jm, Martin S, et Bainvel Jv. 1989. « Macroporous calcium phosphate ceramic performance in human spine fusion ». *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n° 248: 169-76.

Pek, Y. S., S. Gao, M. S. Mohamed Arshad, K.-J. Leck, et J. Y. Ying. 2008. « Porous collagen-apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds ». *Biomaterials* 29 (32): 4300-4305.

Petite, H., V. Viateau, W. Bensaïd, A. Meunier, C. de Pollak, M. Bourguignon, K. Oudina, L. Sedel, et G. Guillemin. 2000. « Tissue-engineered bone regeneration ». *Nature Biotechnology* 18 (9): 959-63.

Petrauskaite, O., P. de Sousa Gomes, M. H. Fernandes, G. Juodzbalys, A. Stumbras, J. Maminskas, J. Liesiene, et M. Cicciù. 2013. « Biomimetic mineralization on a macroporous cellulose-based matrix for bone regeneration ». *BioMed Research International*.

Pihlajamäki, H., J. Kinnunen, et O. Böstman. 1997. « *In vivo* monitoring of the degradation process of bioresorbable polymeric implants using magnetic resonance imaging ». *Biomaterials* 18 (19): 1311-15.

Porter, M. M., J. Mckittrick, et M. A. Meyers. 2013. « Biomimetic materials by freeze casting ». *JOM* 65 (6): 720-27.

Salerno A., M. Oliviero, E. Di Maio, S. Iannace et P. A. Netti. 2009. « Design of porous polymeric scaffolds by gas foaming of heterogeneous blends ». *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20:2043-2051.

Saravanan, S., R. S. Leena, et N. Selvamurugan. 2016. « Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering ». *International Journal of Biological Macromolecules, Biological Macromolecules for Tissue Regeneration* 93: 1354-65.

Scaffaro, R., F. Lopresti, L. Botta, S. Rigogliuso, et G. Ghersi. 2016. « Integration of PCL and PLA in a monolithic porous scaffold for interface tissue engineering ». *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 63: 303-13.

Seebach, C., J. Schultheiss, K. Wilhelm, J. Frank, et D. Henrich. 2010. « Comparison of six bone-graft substitutes regarding to cell seeding efficiency, metabolism and growth behaviour of human mesenchymal stem cells (MSC) *in vitro* ». *Injury* 41 (7): 731-38.

Segur, J. B., et H. E. Oberstar. 1951. « Viscosity of glycerol and its aqueous solutions ». I*ndustrial & Engineering Chemistry 43* (9): 2117-2120.

Senatov, F. S., K. V. Niaza, M. Yu. Zadorozhnyy, A. V. Maksimkin, S. D. Kaloshkin, et Y. Z. Estrin. 2016. « Mechanical properties and shape memory effect of 3D-printed PLA-based porous scaffolds ». *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 57: 139-48.

Shamekhi, M. A., A. Rabiee, H. Mirzadeh, H. Mahdavi, D. Mohebbi-Kalhori, et M. Baghaban Eslaminejad. 2017. « Fabrication and characterization of hydrothermal cross-linked chitosan porous scaffolds for cartilage tissue engineering applications ». *Materials Science and Engineering: C* 80: 532-42.

Spaans, C. J., J. H. De groot, V. W. Belgraver, et A. J. Pennings. 1998. « A new biomedical polyurethane with a high modulus based on 1,4-butanediisocyanate and ε-caprolactone ». *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 9 (12): 675-78.

Sun, J., et H. Tan. 2013. « Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications ». *Materials* 6 (4): 1285-1309.

Tan, H., J. Wu, L. Lao, et C. Gao. 2009. « Gelatin/Chitosan/Hyaluronan scaffold integrated with PLGA microspheres for cartilage tissue engineering ». *Acta Biomaterialia* 5 (1): 328-37.

Tancred, D. C., B. A. O. McCormack, et A. J. Carr. 1998. « A synthetic bone implant macroscopically identical to cancellous bone ». *Biomaterials* 19 (24): 2303-11.

Venkatesan, J., Ira B., P. Manivasagan, K.-H. Kang, et S.-K. Kim. 2015. « Alginate composites for bone tissue engineering: a review ». *International Journal of Biological Macromolecules* 72:269-81.

Wang Y., J. Silvent, M. Robin, F. Babonneau, A. Meddahi-Pellé, N. Nassif, et M. M. Giraud Guille. 2011. « Controlled collagen assembly to build dense tissue-like materials for tissue engineering ». *Soft Matter* 7 (20): 9659-64.

Wu, X., Y. Liu, X. Li, P. Wen, Y. Zhang, Y. Long, X. Wang, Y. Guo, F. Xing, et J. Gao. 2010. « Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method ». *Acta Biomaterialia* 6 (3): 1167-77.

Wu, Yi Jhen, Ting Chen, I-Fen Chen, Shyh Ming Kuo, et Chin Wen Chuang. 2018. « Developing highly porous collagen scaffolds by using alginate microsphere porogens for stem cell cultures ». Materials Letters 223: 120-23.

Xie, X.-H., X.-L. Wang, G. Zhang, Y.-X. He, Y. Leng, T.-T. Tang, X. Pan, et L. Qin. 2015. « Biofabrication of a PLGA–TCP-based porous bioactive bone substitute with sustained release of icaritin ». *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 9 (8): 961-72.

Yang, S., K.-F. Leong, Z. Du, et C.-K. Chua. 2001. « The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. traditional factors ». *Tissue Engineering* 7 (6): 679-89.

Yokoyama, A., M. Gelinsky, T. Kawasaki, T. Kohgo, U. König, W. Pompe, et F. Watari. 2005. « Biomimetic porous scaffolds with high elasticity made from mineralized collagen—an animal study ». *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 75B (2): 464-72.

Zaborowska, M., A. Bodin, H. Bäckdahl, J. Popp, A. Goldstein, et P. Gatenholm. 2010. « Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration ». *Acta Biomaterialia* 6 (7): 2540-47.

Zhang, Q., H. Lu, N. Kawazoe, et G. Chen. 2013. « Preparation of collagen porous scaffolds with a gradient pore size structure using ice particulates ». *Materials Letters* 107: 280-83.

Zhang, Q., H. Lu, N. Kawazoe, et G. Chen. 2014. « Pore size effect of collagen scaffolds on cartilage regeneration ». *Acta Biomaterialia* 10 (5): 2005-13.

Zipfel, G. J., B. H. Guiot, et R. G. Fessler. 2003. « Bone grafting ». *Neurosurgical Focus* 14 (2): 1-8.

Zitnay, J. L., S. P. Reese, G. Tran, N. Farhang, R. D. Bowles, et J. A. Weiss. 2018. « Fabrication of dense anisotropic collagen scaffolds using biaxial compression ». *Acta Biomaterialia* 65: 76-87.

Matériel et Méthodes

Table des matières de Matériels et Méthodes

I. Liste des réactifs et des solutions 218
II. Préparation des solutions de collagène 219
1. Extraction et purification du collagène de type I 219
1. Prélèvement des tendons 219
2. Lavage des tendons 220
3. Mise en solution du collagène 220
4. Purification du collagène 221
2. Dosage de l'hydroxyproline 222
1. Hydrolyse du collagène 222
2. Dosage de l'hydroxyproline 223
3. Calcul de la concentration en collagène 224
4. Conditionnement et conservation des échantillons 226
III. Concentration des solutions de collagène et synthèse des apatites 226
1. Concentration du collagène par évaporation ($[coll_{finale}] \leq 40$ mg/mL) 226
2. Concentration du collagène par dialyse inverse couplée à l'injection continue ($[coll_{finale}] \geq 40$ mg/mL) 227
3. Synthèse des matrices hybrides collagène/apatite (co-précipitation du collagène avec l'apatite) : CollCHA 231
4. Synthèse de matrices denses de collagène à partir de microparticules de collagène 233
5. Synthèse des apatites biomimétiques par diffusion de vapeur 234
IV. Fabrication des chambres microfluidiques texturées 235
V. Formation de porosités au sein des matrices denses de collagène 240
1. Emulsion collagène/ huile de coprah 241
2. Huile de coprah et agents porogènes 242
VI. Techniques de caractérisations 245
1. Etude de la microstructure : préparation des échantillons et observations 245
1. Microscopie électronique à balayage (MEB) 245
2. Microscopie électronique à balayage aux ions hélium (MIH) 247
3. Microscopie électronique à transmission (MET) 247
4. Microscopie optique à lumière polarisée (MOLP) 251
5. Microscopie optique à lumière polarisée à mesures PolScope (PolScope) 252
6. Histologie 253
2. Etude la phase organique et de la phase minérale 255

1. Analyses thermogravimétriques (ATG)..... 255
2. Diffraction des rayons X (DRX)..... 256
3. Résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'état solide..... 257

Références bibliographiques de Matériels et Méthodes..... 260

I. Liste des réactifs et des solutions

Réactifs	**Nom**	**Pureté**
$CaCl_2.2H_2O$	Chlorure de calcium dihydraté	≥ 99%
NaCl	Chlorure de sodium	≥ 99%
$NaH_2PO_4.H_2O$	Dihydrogénophospate de sodium monohydraté	≥ 99%
$Na_2HPO_4.12H_2O$	Hydrogénophosphate de sodium dodécahydraté	≥ 99%
$NaHCO_3$	Bicarbonate de sodium	≥ 99%
KCl	Chlorure de potassium	
Solutions	**Composition chimique**	
CH_3COOH 0,5 M	CH_3COOH Purex 29 mL ; H_2O distillée 2 L	
PBS (Phosphate Buffer Saline) x10	NaCl 80 g ; KCl 2 g ; $Na_2HPO_4.12H_2O$ 28,9 g ; $NaH_2PO_4.H_2O$ 2,027 g ; H_2O distillée 1 L	
PBS x1	PBS x10 dilué 10 fois	

II. Préparation des solutions de collagène

1. Extraction et purification du collagène de type I

Solutions utilisées :

CH_3COOH 0,5 M	CH_3COOH Purex 29 mL ; H_2O 1 L
PBS (Phosphate Buffer Saline) x10	NaCl 80 g ; KCl 2 g ; $Na_2HPO_4.12H_2O$ 28,9 g ; $NaH_2PO_4.H2O$ 2,027 g ; H_2O distillée 1 L
PBS (Phosphate Buffer Saline) x1	PBS x10 dilué au 1/10 ; H_2O distillée 1 L
NaCl 4 M	NaCl 233,8 g ; H_2O 1 L
NaCl 4 M / CH_3COOH 0,5 M	NaCl 233,8 g ; CH_3COOH 0,5 M 1 L

Tableau 1 : Composition des solutions utilisées pendant l'extraction du collagène.

Le protocole d'extraction et de purification du collagène de type I est un procédé de routine effectué au laboratoire. Ce protocole nécessite de travailler en conditions stériles : toutes les solutions et le matériel sont stérilisés, soit par filtration soit par autoclave, et les manipulations se font sous hotte à flux laminaire dans une pièce climatisée à 20°C ± 4°C. Toutes les centrifugations ont été réalisées au laboratoire sur une centrifugeuse Avanti J-26 XP.

1. Prélèvement des tendons

L'extraction de collagène de type I est réalisée à partir de tendons de queues de rat de laboratoire de type Wistar âgés de 5 à 8 mois maximum n'ayant subi aucun traitement particulier (rats témoins). De manière générale, chaque lot de collagène a été préparé à partir d'une trentaine de queues de rats et mène à un volume final de collagène d'environ 1 L concentré à 2-5 mg/mL.

Sous hotte à flux laminaire (PSM), les tendons sont prélevés à l'aide d'une pince coupe-ongles en serrant à 1 cm de l'extrémité fine de la queue puis en cassant la vertèbre par rotation ce qui permet de tirer une partie du tendon formant une sorte de « fil ». Les tendons recueillis sont ensuite placés dans du PBS x1 et l'opération est répétée tous les centimètres tout au long de la queue. On évitera les derniers centimètres qui sont trop vascularisés (*Figure 1*).

Figure 1 : Extraction des tendons de queues de rat.

2. Lavage des tendons

Les tendons sont lavés dans du PBS x1 puis sont centrifugés à 4°C à 4400 r.p.m pendant 5 min. L'opération est répétée jusqu'à ce que le surnageant soit limpide et incolore, signe indiquant l'absence de sang résiduel. Les tendons sont ensuite placés dans une solution aqueuse de NaCl 4M permettant la lyse des cellules par choc osmotique et la précipitation éventuelle de protéines de haut poids moléculaires. Une nouvelle fois les tendons sont lavés dans du PBS x1 et centrifugés à 4°C à 4400 r.p.m pendant 5 min, le surnageant doit être de nouveau limpide et incolore à la fin de l'opération et le culot exempt de vaisseaux sanguins et déchets cellulaires résiduels.

3. Mise en solution du collagène

Les culots de tendons sont placés dans une solution aqueuse de CH_3COOH 0,5 M stérile et le tout est mis sous agitation pendant 24 h à 20°C sous hotte à flux laminaire jusqu'à dissolution totale des tendons. Une solution visqueuse est récupérée dans laquelle peuvent subsister quelques agrégats.

4. Purification du collagène

Cette solution de collagène est alors centrifugée à 4°C à 21000 r.p.m pendant 2 h afin d'éliminer ces agrégats résiduels. Le surnageant des tubes est récupéré et est dilué avec une solution de NaCl 4 M CH_3COOH 0,5 M de sorte que la concentration finale en sels soit de 300 mmol/L. Ceci permet la précipitation d'éventuels contaminants (protéines plasmiques, sang) encore présents et leur élimination par centrifugation à 4°C à 21000 r.p.m pendant 3 h.

Le surnageant est récupéré et cette fois-ci c'est le collagène qui est précipité en ajoutant une solution de NaCl 4 M CH_3COOH 0,5 M de façon à obtenir une concentration finale en sels de 700 mmol/L, le tout mis sous agitation pendant 24 h. Le collagène précipité est alors centrifugé à 10°C à 4400 r.p.m pendant 45 min.

Les culots sont rassemblés et resolubilisés dans une solution aqueuse de CH_3COOH 0,5 M stérile sous agitation pendant une nuit.

Afin d'éliminer le sel, quatre dialyses successives sont effectuées contre une solution CH_3COOH 0,5 M. Il faut environ 10 volumes de CH_3COOH pour 1 volume de collagène. Des membranes de dialyse de 12-14 kDa (Spectra/Por®) sont utilisées (*Figure 2*). Les solutions de CH_3COOH seront changées 2 fois par jour afin que les dialyses s'effectuent plus rapidement. Une dernière centrifugation sera effectuée afin d'éliminer les derniers agrégats non dissouts à 4°C à 21000 r.p.m pendant 4 h.

La solution de collagène purifiée est conservée dans une bouteille stérile à 4°C. La concentration de la solution est déterminée par le dosage de l'hydroxyproline.

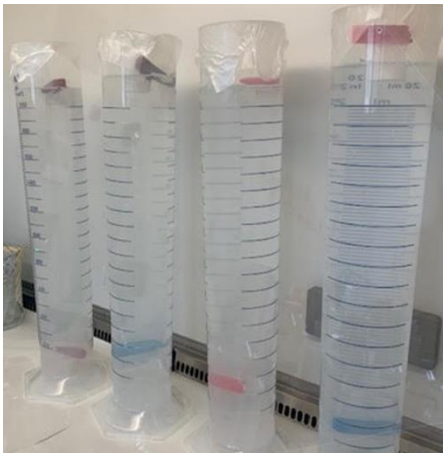


Figure 2 : Dialyse du collagène contre l'acide acétique 0,5 M.

2. Dosage de l'hydroxyproline

Comme rappelé dans le **Chapitre 1**, la molécule de collagène est une triple hélice droite composée de 3 chaînes polypeptidiques. Chaque chaîne comporte un millier d'acides aminés (Woodhead-Galloway 1982) dont la séquence est un motif répétitif Gly-X-Y. La composition en acides aminés varie selon le tissu où le collagène est prélevé. Dans le cas des tendons de queues de rats, Y représente 13% d'hydroxyproline (Eastoe 1955 ; Ignat'eva *et al.* 2007). La concentration en collagène des solutions et des matrices peut donc être déterminée par un dosage de l'hydroxyproline.

Solutions utilisées :

Tampon de dosage (solution conservée à 4°C)	6,25 g d'acide citrique monohydraté (0,25 M) 17,5 g d'acétate de sodium trihydraté (1 M) 4,25 g d'hydroxyde de sodium (0,85 M) 1,5 mL d'acide acétique Purex 125 mL H_2O Ajuster le pH à 6 avec de l'acide acétique Purex
Acide perchlorique 3,15 M (solution conservée à 4°C)	30 mL d'acide perchlorique 65% (10,39 M) 70 mL H_2O distillée
Hydroxyproline standard (20 µg/mL)	Solution mère : 20 mg d'hydroxy-L-proline 100 mL H_2O Solution de dosage : solution mère diluée au 1/10
Chloramine T	400 mg de chloramine T 5 mL H_2O distillée 7,5 mL de méthyl Cellosolve (éther monoéthylique de l'éthylène glycol) ou Acétone 12,5 mL de tampon dosage
DMBA	1 g de DMBA (diméthylamino-4-benzaldéhyde) ou Acétone 5 mL de méthyl Cellosolve

Tableau 2 : Composition des solutions utilisées pour le dosage de l'hydroxyproline.

1. Hydrolyse du collagène

Lorsque la concentration en collagène d'une solution ou d'un gel est supérieure à 20 mg/mL, l'échantillon doit être dilué à l'aide d'une solution d'acide acétique à 0,5 M afin d'atteindre une concentration expérimentale adéquate soit entre 1 et 5 mg/mL. L'aide d'un bain à ultrasons peut accélérer la dissolution.

Un volume de la solution de collagène (50 µL) est prélevé auquel est ajouté un volume d'une solution d'acide chlorhydrique HCl (35%, 50 µL). Le tout est vortexé puis hermétiquement fermé dans une eppendorf à 100°C pendant une nuit. En milieu acide, les molécules de collagène sont hydrolysées. Cela permet la libération des résidus d'hydroxyproline. Le mélange est enfin séché, eppendorf ouvert, à 100°C afin d'évaporer le liquide restant.

Pour les matrices denses de collagène (avec ou sans minéral), il faut prélever entre 30 et 50 mg de la matrice. L'eau de surface est éliminée entre deux papiers Kimtech afin de ne pas fausser la mesure de la pesée. Un volume en large excès d'une solution d'HCl (35%, 200 µL) est introduit afin de faciliter la libération des résidus d'hydroxyproline de la matrice. Le reste du protocole reste le même.

2. Dosage de l'hydroxyproline

Les échantillons secs sont repris dans un volume d'eau distillée (1 mL) puis vortexés. Ensuite, selon les proportions indiquées dans le *Tableau 3* ci-dessous, des aliquotes des échantillons sont prélevés et dilués dans de l'eau et oxydés par une solution de chloramine T (200 µL). Deux aliquotes de 40 µL seront prélevés au lieu des 10, 20 et 40 µL habituels, la valeur d'hydroxyproline lue à 10 µL étant trop peu reproductible car le volume prélevé est trop faible. En parallèle une gamme étalon d'hydroxyproline est également préparée (*Figure 3*).

La réaction d'oxydation de l'hydroxyproline est arrêtée par l'ajout d'une solution d'acide perchlorique (3,15 M, 200 µL) et un complexe coloré est formé par l'ajout final d'une solution de DMBA (200 µL). Ce complexe formé entre le DMBA et l'hydroxyproline est détectable par spectroscopie UV-visible à 557 nm.

Le dosage de l'hydroxyproline est un dosage complexe. Sa reproductibilité n'est pas évidente. En effet, il est nécessaire d'utiliser des solvants « neufs » à chaque série de dosage. Dans la littérature (Gobeaux 2008), il est indiqué que le redissolution du collagène dans l'acide est partielle, la chloramine ne peut donc oxyder toutes les molécules de collagène. De plus, sa reproductibilité est également manipulateur-dépendant. Quand une meilleure précision est nécessaire, la concentration en collagène d'une matrice sera préférentiellement déterminée par analyse thermogravimétrique (ATG).

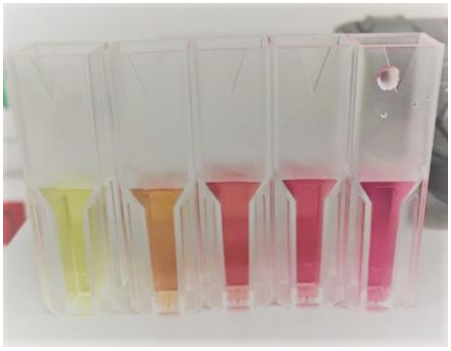


Figure 3 : Gamme d'étalonnage d'hydroxyproline.

	Gamme d'hydroxyproline à partir d'une solution mère de 20 µg/mL					Echantillon collagène		
Aliquotes (µL)	0	40	80	100	140	20	40	40
H_2O (µL)	400	360	320	300	260	380	360	360
Dilution						1/20	1/10	1/10
Chloramine T	200 µL à TA pendant 20 min, puis vortexer.							
Acide perchlorique 3,15 M	200 µL à TA pendant 5 min, puis vortexer.							
DMBA	200 µL à 60°C au bain marie pendant 20 min, puis vortexer.							

Tableau 3 : Composition des solutions utilisées pendant le dosage de l'hydroxyproline.

3. Calcul de la concentration en collagène

La concentration en collagène de la solution initiale est déduite à partir de la courbe étalon de la concentration d'hydroxyproline mesurée par spectroscopie UV-Visible (*Figure 4*). Rappelons que l'hydroxyproline représente 13% en masse du collagène dans le cas des tendons de queues de rat, et que la masse volumique du collagène est assimilée à celle de l'eau (1 mg/mL), il est donc possible de remonter à une concentration massique en mg/mL.

Dans le cas de solutions, il faudra tenir compte du volume prélevé V_p des aliquotes, de la reprise du collagène sec dans 1 mL d'H_2O distillée et de la quantité initiale de collagène hydrolysé (50 µL). La concentration de collagène peut être alors calculée par la formule A ci-dessous.

Dans le cas de matrices de collagène, il faudra tenir compte des mêmes facteurs mais il faudra aussi considérer les différentes dilutions éventuelles ayant été réalisées car les matrices étant très concentrées (40 à 200 mg/mL), il a été nécessaire de diluer les solutions après réaction pour respecter la gamme de tolérance de la loi de Beer-Lambert. La concentration de collagène peut être alors calculée par la formule B ci-dessous.

Formule A : $C_{coll} = Q_{hyd} / V_p * 1000 / V_{échantillon} * 7,7$

Formule B : $C_{coll} = Q_{hyd}*X / V_p * 1000 / V_{échantillon} * 7,7$

Où :

C_{coll} : concentration de collagène en mg/mL

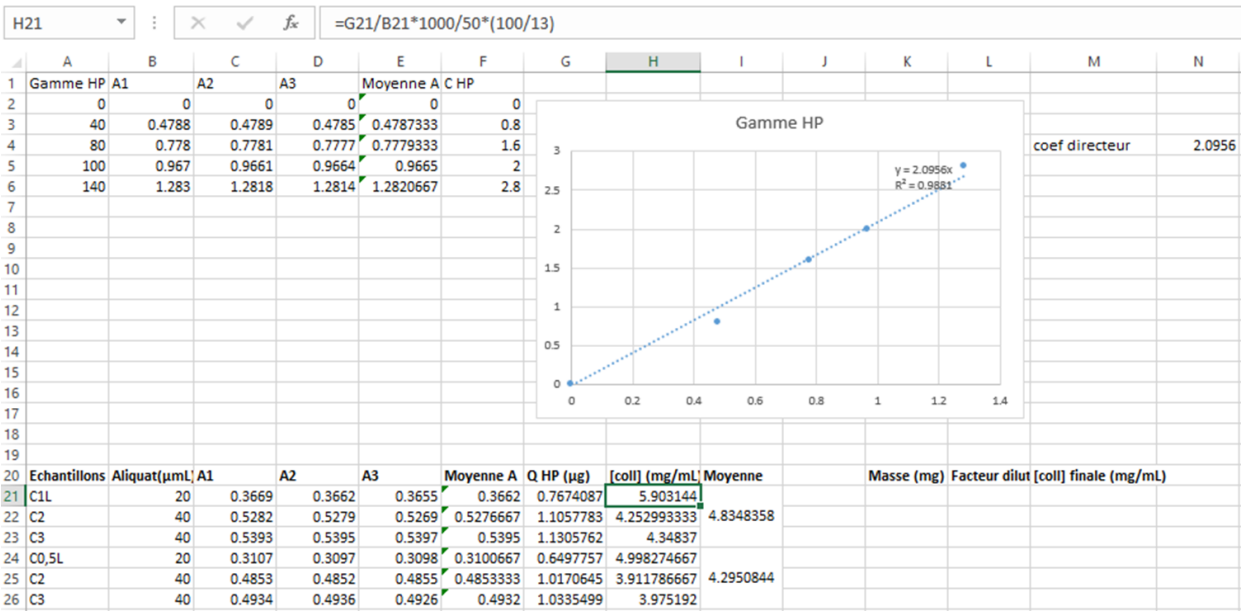
Q_{hyd} : quantité d'hydroxyproline par molécule de collagène (µg)

V_p : aliquote après reprise dans 1 mL d'H_2O distillée en µL

$V_{échantillon}$: quantité initiale de collagène prélevée en µL

X : facteur de dilution appliqué

7,7 : inverse du pourcentage d'hydroxyproline dans une molécule de collagène



Gamme HP	A1	A2	A3	Moyenne A	C HP
0	0	0	0	0	0
40	0.4788	0.4789	0.4785	0.4787333	0.8
80	0.778	0.7781	0.7777	0.7779333	1.6
100	0.967	0.9661	0.9664	0.9665	2
140	1.283	1.2818	1.2814	1.2820667	2.8

Echantillons	Aliquat(µmL)	A1	A2	A3	Moyenne A	Q HP (µg)	[coll] (mg/mL)	Moyenne	Masse (mg)	Facteur dilut	[coll] finale (mg/mL)
C1L	20	0.3669	0.3662	0.3655	0.3662	0.7674087	5.903144				
C2	40	0.5282	0.5279	0.5269	0.5276667	1.1057783	4.252993333	4.8348358			
C3	40	0.5393	0.5395	0.5397	0.5395	1.1305762	4.34837				
C0,5L	20	0.3107	0.3097	0.3098	0.3100667	0.6497757	4.998274667				
C2	40	0.4853	0.4852	0.4855	0.4853333	1.0170645	3.911786667	4.2950844			
C3	40	0.4934	0.4936	0.4926	0.4932	1.0335499	3.975192				

Figure 4 : Feuille de calcul pour déterminer la concentration de collagène.

4. Conditionnement et conservation des échantillons

Toutes les solutions de collagène sont conservées dans des contenants étanches et stériles à 4°C afin d'éviter : (i) la dénaturation du collagène en gélatine par la chaleur, (ii) l'évaporation des solvants qui augmenterait la concentration de la solution et (iii) une éventuelle contamination par des microorganismes.

Les matrices sont quant à elles également conservés à 4°C pour les mêmes raisons évoquées que précédemment dans des tubes (type Falcon®) et du PBS x1 stérile. Certaines matrices ont été conservées dans l'eau distillée stérile afin d'éviter un effet du tampon phosphate sur la taille des fibrilles.

III. Concentration des solutions de collagène et synthèse des apatites

Comme décrit dans le **Chapitre 1**, il existe différents procédés proposés dans la littérature permettant de concentrer une solution acido-soluble de collagène afin de former une matrice dense. Ici seront exposées les méthodes de concentration par évaporation et par dialyse inverse couplée à l'injection continue, ainsi que le procédé d'aérosol, qui ont été utilisées dans ces travaux de thèse.

1. Concentration du collagène par évaporation ($[coll_{finale}] \leq 40$ mg/mL)

Ce procédé est le plus simple pour obtenir une solution acido-soluble de collagène concentrée. Le principe est de laisser s'évaporer le solvant de la solution de collagène, ici l'acide acétique, sous hotte à flux laminaire de sorte d'en augmenter la concentration. Ce procédé bien que rapide et peu contraignant présente néanmoins l'inconvénient de mener à un gradient de concentration dans la solution si l'ensemble n'est pas agité. Ce phénomène devenant plus important au fur et à mesure que la concentration en surface augmente, la viscosité augmente également, ralentissant l'évaporation. La concentration est suivie en observant la diminution de la masse totale, menant à des concentrations de collagène à des valeurs de 40 mg/mL au maximum pour les raisons pratiques énoncées précédemment.

Par exemple, quand on part d'un volume de 100 mL d'une solution de collagène concentrée à 3 mg/mL, il faut 7 jours pour obtenir une solution à 40 mg/mL.

Cette méthode de concentration de collagène a été utilisé dans différentes parties de cette thèse : (i) dans les études préliminaires avec les billes de verre, (ii) dans les essais préliminaires avec l'huile de copra. Les matrices de collagène sont respectivement nommées C-X et CollCocoX (*Tableau 4*).

Nom échantillon	Source collagène	$[coll]_{initiale}$ (mg/mL)	Temps de précipitation sous NH_3 (h)
C1	Grade clinique	39,2	24
C2	Grade clinique	39,2	24
CollCoco1	Grade clinique	37,4	48
CollCoco2	Grade clinique	37,4	48
CollCoco3	Grade clinique	37,4	48
CollCoco4	Grade clinique	37,4	48

Tableau 4 : Résumé des différents échantillons préparés par évaporation.

2. Concentration du collagène par dialyse inverse couplée à l'injection continue ($[coll_{finale}] \geq 40$ mg/mL)

Ce procédé, développé au laboratoire (Wang *et al.* 2011 et 2012), combine deux procédés de concentration du collagène que sont la dialyse inverse et l'injection continue. Le système nécessite d'être hermétique afin d'éviter d'éventuelles fuites, il se compose d'une seringue stérile contenant la solution acido-soluble de collagène dilué (généralement 1 ou 3 mg/mL) dans l'acide acétique 0,5 M et reliée à un capillaire en téflon (30 cm de long, 1 mm de diamètre) à l'aide d'un cône percé. Le tout est actionné à l'aide d'un pousse-seringue à l'aide duquel la solution de collagène est conduite dans le capillaire qui est relié à son autre extrémité à un bouchon de dialyse (QuixSep®, 1 mL) équipé d'une membrane de dialyse (Spectra/Por®, taille d'exclusion moléculaire de 3,5 kDa) maintenus ensemble par un clip cylindrique. L'étanchéité du montage est assurée par de la cire fondue au niveau des jonctions bouchon/capillaire et capillaire/cône (*Figure 5*).

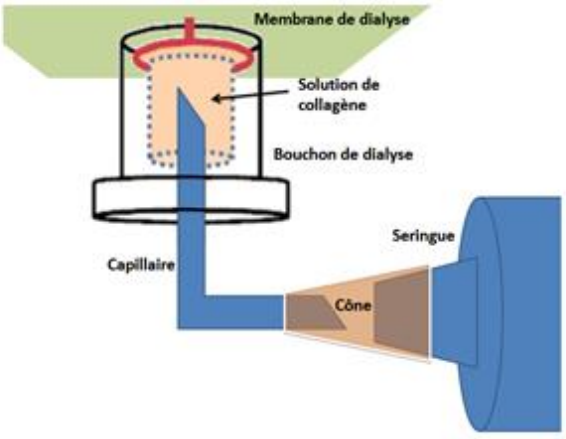


Figure 5 : Schéma du montage de remplissage du bouchon de dialyse. Reproduit de la thèse de Yan Wang 2012.

Le bouchon est immergé au niveau de la membrane de dialyse dans un bécher, sous agitation continue, contenant une solution de polyéthylène glycol à 300 mg/mL (PEG, Fluka, 35 kDa) dans une solution d'acide acétique 0,5 M (*Figure 6*). Le PEG étant introduit en large excès, impose à la solution de collagène une pression osmotique qui entraîne le passage de petites molécules (eau, acide acétique, sels) diffusant à travers la membrane de dialyse pour équilibrer la concentration des différents éléments de part et d'autre de la membrane. La concentration en PEG détermine ainsi la concentration finale du collagène, nous avons en théorie un rapport 1 : 1, mais en pratique la concentration de PEG est 1,5 fois supérieure à celle souhaitée en collagène (*Figure 7*).

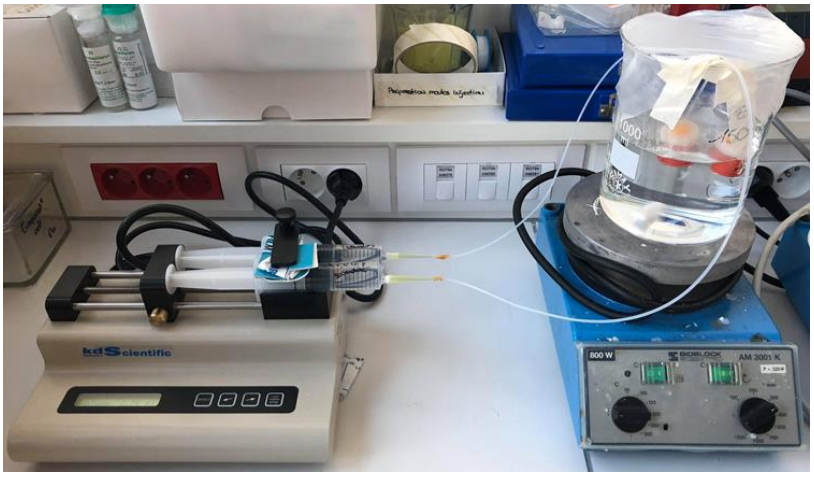


Figure 6 : Photo du montage du procédé de dialyse inverse couplée à l'injection continue. A gauche, la solution acido-soluble de collagène à 1 mg/mL est injectée dans le capillaire sous l'action du pousse-seringue. A droite, le capillaire est relié au moule fermé hermétiquement par une membrane de dialyse. Le moule est plongé dans une solution acide de PEG à 300 mg/mL.

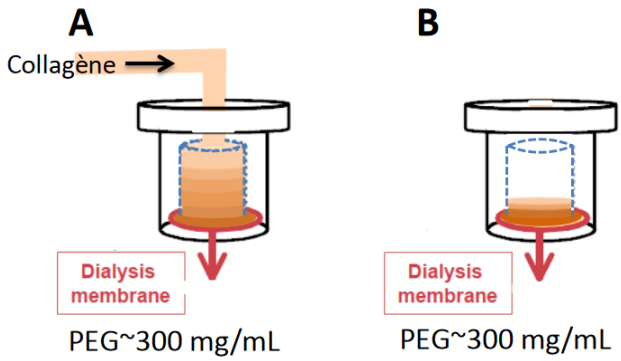


Figure 7 : Schéma du procédé de concentration du collagène par la méthode de dialyse inverse couplée à l'injection continue. A) Le bouchon de dialyse est plongé dans une solution acide de PEG sous agitation. La solution de collagène diluée est injectée par le capillaire grâce au pousse-seringue dans le moule fermé hermétiquement. B) Stabilisation du gradient de concentration de la solution de collagène après injection continue. Reproduit de la thèse de Yan Wang 2012.

La solution de collagène est injectée en continu dans le bouchon de dialyse à l'aide du pousse-seringue dont le débit d'injection est fixé afin d'éviter une différence de pression de part et d'autre de la membrane de dialyse. La vitesse d'injection est diminuée au fur et à mesure de la dialyse, la solution de collagène devenant plus visqueuse, la diffusion diminuant tandis que la concentration augmente.

Après avoir injecté la solution de collagène dilué (18 mL à 1 mg/mL), l'injection est stoppée mais le bouchon de dialyse et le capillaire, uniquement « déconnectés » de la seringue, sont laissés dans le PEG une semaine afin de diminuer le gradient de concentration au sein du bouchon de dialyse pour permettre l'obtention d'une matrice de concentration homogène.

Après l'équilibre le bouchon de dialyse, sans capillaire, est placé dans un dessiccateur au contact d'un bécher contenant une solution aqueuse d'ammoniaque (8 mL, 30%). Les vapeurs d'ammoniac induisent une remontée de pH au sein de la matrice de collagène qui permettent d'induire la précipitation des molécules de collagène en fibrilles. Ce procédé se déroulant dans un système hermétique à pH basique permet d'éviter toute contamination bactérienne. Différents temps d'exposition aux vapeurs d'ammoniac ont été effectués selon les échantillons afin de déterminer le temps d'exposition optimal mais la différence de fibrillogénèse selon ces temps ne sera pas décrite dans ce manuscrit.

Après exposition aux vapeurs d'ammoniac la matrice de collagène est délicatement retirée du bouchon de dialyse et rincée avec du PBS x1 jusqu'à obtention d'un pH neutre des solutions de rinçage sous PSM. Elles ont la forme d'un disque d'environ 1 cm de diamètre et 3~4 mm d'épaisseur (*Figure 8*). Elles sont conservées dans du PBS x1 à 4°C dans des tubes (Falcon®).

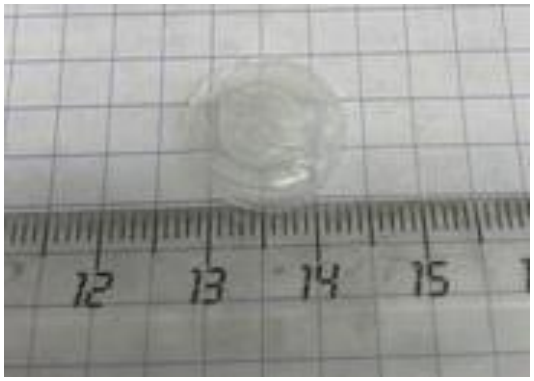


Figure 8 : Photo macro de la matrice CollBAD7. La matrice forme un disque d'environ 1 cm de diamètre.

Cette méthode de concentration de collagène a été utilisée dans différentes parties de cette thèse : (i) dans les études préliminaires en présence de billes de verre, (ii) dans les études préliminaires en présence de fibres de nylon, ainsi que (iii) pour les moules de matériaux macroporeux. Les matrices de collagène sont respectivement nommées CollGlassX, CollBADX et CollSUCX dans le *Tableau 5*.

Dans le cas des billes de verre, les billes ont été placées directement au sein du moule lors du montage (*Figure 9A*). Les billes ont été préalablement nettoyées à l'éthanol absolu et stérilisées par exposition aux UV.

Dans le cas des fibres de nylon (FN), les fibres ont été fixées dans une épaisseur de PDMS, puis nettoyées à l'éthanol absolu et stérilisées sous UV. Elles sont ensuite placées dans le moule parallèlement ou perpendiculairement à l'arrivée de la solution de collagène (*Figure 9B*). La difficulté a été d'assurer un maintien des FN au sein des matrices de collagène.

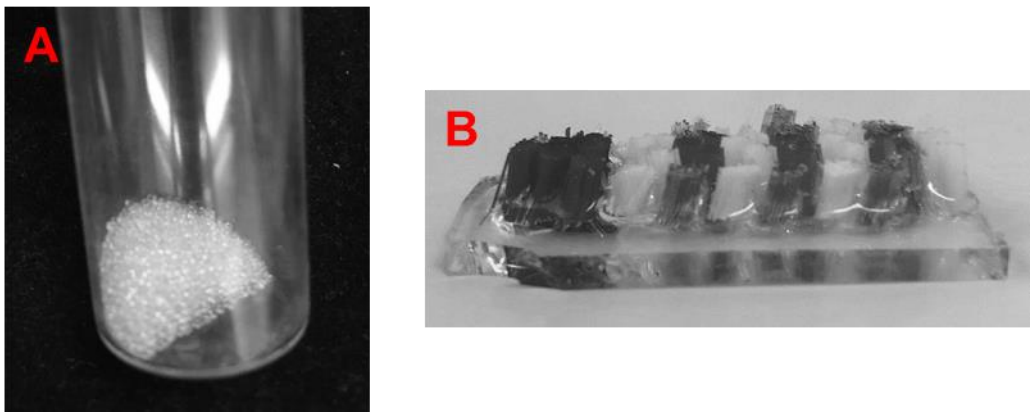


Figure 9 : (A) Billes de verre (diamètre moyen d'une bille ~ 0,5 mm). (B) Fibres de nylon dans PDMS (diamètre moyen d'un poil ~ 70 µm).

Nom échantillon	Source collagène	Volume injecté (mL)	$[coll]_{initiale}$ (mg/mL)	Temps de précipitation sous NH_3 (h)	Commentaires
CollGlass1	Rat	15	1,5	4	
CollGlass2	Rat	15	1,5	4	
CollGlass3	Rat	9	3	4	
CollGlass4	Rat	9	3	4	
CollGlassCHA1	Rat	9	3	4	
CollGlassCHA2	Rat	9	3	4	
CollBAD1	Rat	15	1	24	parallèle
CollBAD2	Rat	15	1	24	perpendiculaire
CollSUC1	Rat	15	1	48	

Tableau 5 : Résumé des différents échantillons préparés par le procédé de dialyse inverse/injection continue.

3. Synthèse des matrices hybrides collagène/apatite (co-précipitation du collagène avec l'apatite) : CollCHA

Le procédé de synthèse des matrices hybrides collagène-apatite, correspondant à une co-précipitation des molécules de collagène et des précurseurs d'hydroxyapatite, est le même que celui évoqué dans la partie précédente : une dialyse inverse couplée à une injection continue.

Les deux seules différences par rapport au protocole précédent sont : (i) la présence de précurseurs ioniques de la phase minérale au sein de la solution initiale de collagène acido-soluble avant l'injection, et (ii) la présence de ces mêmes précurseurs ioniques dans la solution acide de PEG à la même concentration que dans la solution de collagène afin que de part et d'autre de la membrane la concentration en ions soit la même.

La force ionique de la solution acide initiale est identique à celle du plasma sanguin (Kokubo 1987) (*Tableau 6*). Ici, une seule composition de sels est utilisée et la concentration des sels dans la solution initiale de collagène acido-soluble (1 mg/mL), basée sur la synthèse d'apatites carbonatées par diffusion de vapeurs d'ammoniac (Nassif *et al.* 2010), est indiquée dans le tableau suivant :

Concentration (mM)	$CaCl_2.2H_2O$	NaH_2PO_4	$NaHCO_3$	Acide acétique	Force ionique (mM)
CollCHA	46,1	13,8	13,8	500	165,9

Tableau 6 : Concentration des ions présents dans les solutions mères acides de collagène

Etant donné que la masse des sels à dissoudre est très petite (~ 10 mg) dans la solution acido-soluble de collagène à 1 mg/mL, les pesées ne peuvent être faites correctement. Afin d'assurer une bonne reproductibilité de la concentration en sels, deux solutions mères sont préparées au préalables : une solution stock de collagène à 3 mg/mL et une solution contenant les précurseurs ioniques (CHA) dont la concentration sera 1,5 fois plus élevée que celle indiquée dans le tableau précédent. Un rapport ⅓ de solution de collagène et ⅔ de solution de précurseurs ioniques sera respecté lors du mélange afin d'obtenir les valeurs choisies.

Cette méthode de concentration de collagène en présence des précurseurs minéraux a été utilisée dans les études préliminaires avec les fibres de nylon. Les matrices de collagène minéralisées sont nommées CollCHABADX (*Tableau 7*).

Nom échantillon	Source collagène	Volume injecté (mL)	$[coll]_{initiale}$ (mg/mL)	Temps de précipitation sous NH_3 (h)
CollCHABAD1	Rat	15	1	5
CollCHABAD2	Rat	15	1	5

Tableau 7 : Résumé des différents échantillons en présence des précurseurs minéraux préparés par le procédé de dialyse inverse/injection continue.

4. Synthèse de matrices denses de collagène à partir de microparticules de collagène

Le procédé de synthèse de matrices denses de collagène à partir de microparticules de collagène (Lama *et al.* 2020) permet d'obtenir des matrices à des concentrations précises en collagène.

L'obtention des microparticules de collagène se fait par atomisation d'une solution acido-soluble de collagène (Brevet WO2011151587A3). Un aérosol Büchi B290 est utilisé pour l'atomisation. Il est nécessaire que l'aérosol soit placé sous hotte, et que la température initiale du flux d'air soit maintenue en-dessous de 37°C afin d'éviter toute dénaturation ou condensation du collagène lors du process (*Figure 10*). La solution acido-soluble de collagène (1-5 mg/mL) est aspirée dans l'aérosol. Deux flux d'air distincts (1) cisaillent la solution sous forme de fines gouttelettes, puis (2) les sèchent. Les microparticules sèches sont récupérées dans le collecteur.

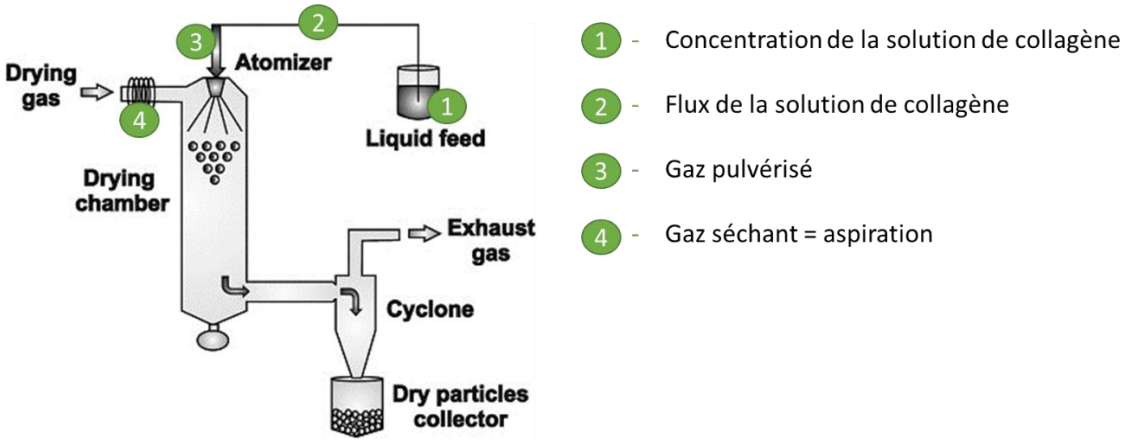


Figure 10 : Schéma du fonctionnement du procédé de formations de microparticules de collagène par atomisation. Reproduit de Sosnik et al. 2015.

En vue de maximiser le rendement de microparticules de collagène dans le collecteur, les paramètres d'atomisation sont réglés au préalable sur l'appareil en fonction de la concentration en collagène de la solution initiale (*Tableau 8*).

Concentration	Flux solution	Flux air	Vitesse d'aspiration	Température Inlet (établie)	Température Inlet (mesurée)	Température Outlet (mesurée)
1 mg/mL	5% (1,5 mL/min)	35 (414 L/h)	50% (20 m^3/h)	30°C	34-35°C	19-25°C

Tableau 8 : Exemple de paramètres d'atomisation en fonction de la concentration initiale de la solution de collagène.

5. Synthèse des apatites biomimétiques par diffusion de vapeur

Cette synthèse établie au laboratoire est effectuée par diffusion de vapeurs d'ammoniac (Nassif *et al.* 2010). Les solutions de sels de calcium et de phosphate sont préparées dans une solution aqueuse d'acide acétique 0,5 M à température ambiante. Une solution est préparée : CHA1 avec 46,1 mM de $CaCl_2.2H_2O$; 13,8 mM de $NaHCO_3$ et $NaH_2PO_4.H_2O$. Le rapport molaire Ca/(P+C) est égal à 1,67.

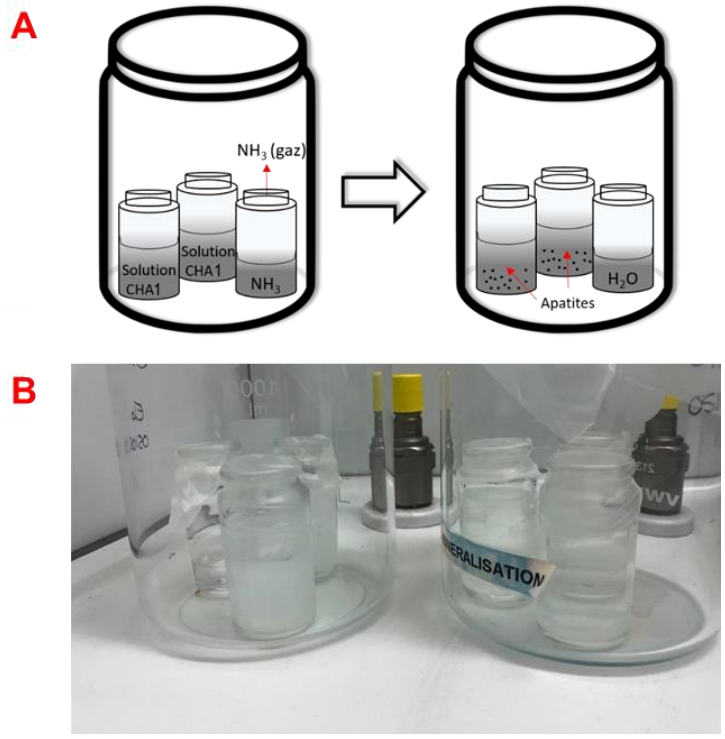


Figure 11 : (A) Schéma du montage pour la synthèse d'apatites par la méthode de diffusion de vapeurs d'après Nassif et al. 2010. (B) Photo de la précipitation des apatites biomimétiques par diffusion de vapeur.

Trois flacons (30 mL, h = 50 mm) sont placés dans un bécher de 1L fermé hermétiquement. Deux des flacons contiennent un volume de la solution de sels de calcium et de phosphate (20 mL) et le troisième contient un volume d'une solution aqueuse d'ammoniaque (8 mL, 30%). Les trois flacons sont recouverts de parafilm, lequel est percé de quelques trous à l'aide d'une aiguille afin de ralentir la diffusion de vapeur d'ammoniac. Le bécher est placé sous hotte à température ambiante (*Figure 11A*).

Suite à la diffusion de vapeur d'ammoniac, le pH des solutions augmente et la précipitation des ions est observable au bout d'une heure au sein des flacons (*Figure 11B*). Après 6 jours, le pH des solutions mesuré est 10-11. Les précipités sont récupérés par centrifugation à 6000 rpm pendant 10 minutes à 5°C, lavés ensuite avec 20 mL d'eau doublement distillée. Cette étape de centrifugation-lavage est répétée plusieurs fois jusqu'à ce que l'eau de lavage soit neutre (environ 3 ou 4 lavages en moyenne). Une dernière étape de centrifugation est réalisée avec de l'éthanol absolu. La poudre est ensuite séchée à 37°C dans une étuve pendant une semaine. Une fois sèche, elle est broyée dans un mortier et stockée dans un tube (type Falcon®) avant caractérisations.

IV. Fabrication des chambres microfluidiques texturées

L'utilisation de chambres microfluidiques texturées a été un des dispositifs essentiels dans ce travail. Cette partie de l'étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec Franck Artzner et Arnaud Bardouil à l'Institut de Physique de Rennes (IPR).

Les chambres microfluidiques sont faites en polydiméthylsiloxane (PDMS), et la texturation réalisée dessus prend la forme d'un réseau de plots circulaires répartis de manière régulière à la surface de la chambre. Les plots sont espacés d'une distance variant entre 75 et 240 µm (bord à bord) suivant la chambre et ont un diamètre de 100 µm. La hauteur de la chambre microfluidique est d'environ 50 µm. Les caractéristiques des différentes chambres utilisées dans ce manuscrit sont détaillées dans le *Tableau 9*.

Numéro chambre	Distance inter-plots (µm)	Diamètre plots (µm)	Hauteur plots (µm)	Réseau plots
1	75	100	50	Carré
2	120	100	50	Carré
3	200	100	50	Carré
4	240	100	50	Carré
5	70-240	100	50	Pavage de Penrose

Tableau 9 : Caractéristiques des différents paramètres des chambres microfluidiques utilisées.

Ces plots ont pour but de simuler la distribution des canaux de Havers des ostéons, l'idée étant d'étudier s'il est possible de pouvoir reproduire l'organisation cholestérique concentrique du collagène autour de ces plots.

- Fabrication des moules

Les chambres microfluidiques texturées sont faites en PDMS à partir de moules réalisés en résine SU-8 sur des wafers de silicium par photolithographie (*Figure 12*) (Algaba 2016).

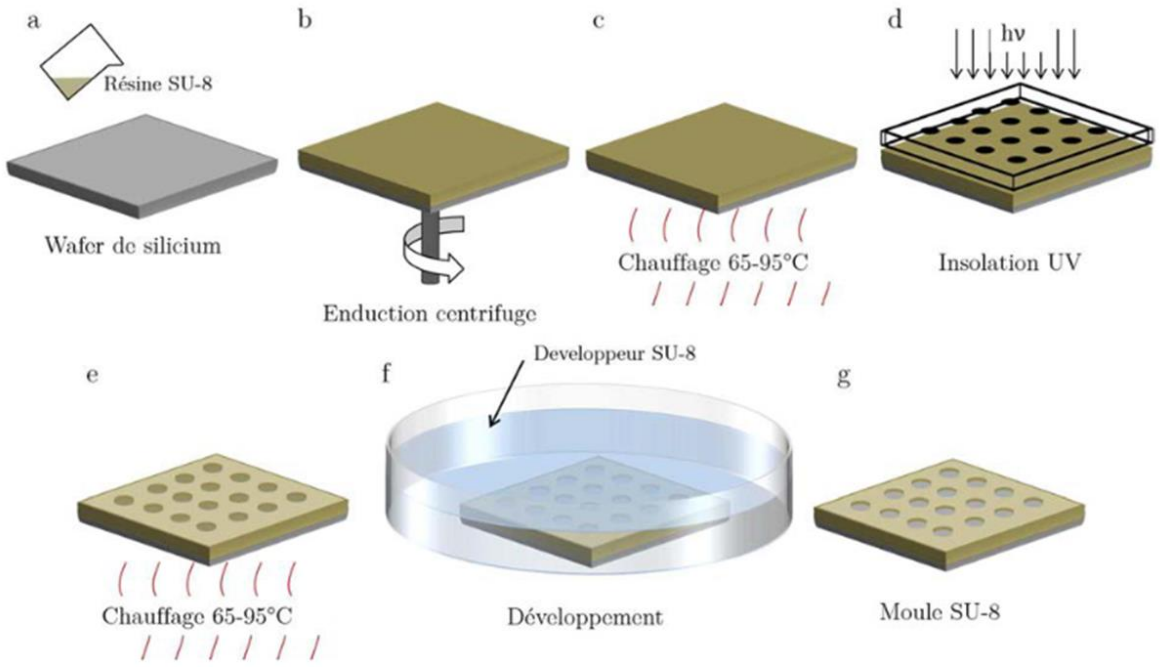


Figure 12 : Etapes successives de la photolithographie de la résine SU-8. a) Dépôt de la résine sur le wafer de silicium b) Etalement de la résine par spin-coating c) Chauffages de pré-exposition successifs à 65 et 95°C d) Exposition aux UV e) Chauffages de post-exposition successifs à 65 et 95°C f) Développement g) Moule texturé final. Reproduit de la thèse de H. Algaba 2016.

La résine est déposée sur un wafer de silicium (a), puis spin-coatée à une vitesse définie qui détermine l'épaisseur finale (ici 50 µm) de la chambre microfluidique (b). Un traitement thermique est effectué sur plaque chauffante à 65°C pendant 2 minutes et à 95°C pendant 7 minutes (c).

Le substrat est ensuite exposé aux UV pour réticulation. Un masque est posé entre la surface du wafer et la source lumineuse. Le motif de la chambre microfluidique est imprimé sur le masque de telle sorte que les plots soient formés selon un schéma prédéfini (d). Les différents masques utilisés ont été réalisés sur le logiciel CleWin3® à l'IPR.

Un deuxième traitement thermique est appliqué au wafer sur plaque chauffante à 65°C pendant 1 minute 30 et à 95°C pendant 6 minutes (e). La partie n'ayant pas été exposée aux UV sous le masque va être retirée lors de l'étape du développement (f). Le moule, une fois nettoyé et séché, peut être utilisé pour le moulage du PDMS (g).

- Moulage en PDMS

Le PDMS possède de nombreuses propriétés intéressantes qui font de lui un matériau de choix pour une utilisation en microfluidique (McDonald *et al.* 2000). Il est transparent, ce qui permet de pouvoir observer facilement aux différents microscopes optiques l'évolution du système. Il est très souple et permet donc de mouler des objets de l'ordre micrométrique facilement. Dans le cadre de ce travail, le PDMS utilisé (Sylgard 184) est fourni sous la forme d'un gel visqueux et d'un agent réticulant.

Un mélange PDMS-réticulant (9 : 1) est préparé et mis sous vide afin de dégazer les bulles d'air présentes. Le mélange est ensuite versé sur le moule dans une boîte de Pétri, le tout est remis sous vide pour un deuxième dégazage. La boite de Pétri est ensuite placée à l'étuve à 65°C afin d'accélérer la réticulation. Il est ensuite possible de découper la couche polymère et de décoller la chambre microfluidique ouverte sur un côté.

- Etude de la concentration de la solution de collagène au sein de la chambre

La mise en place du système de l'organisation du collagène au sein de la chambre microfluidique texturée est la suivante (*Figure 13*). On dépose une goutte de la solution de collagène concentrée à x mg/mL sur une lame de verre préalablement nettoyée, puis la chambre microfluidique est déposée par-dessus. On exerce une pression homogène sur la chambre afin d'assurer un contact entre les plots et la lame de verre. Dans notre cas, nous ne scellons pas les chambres microfluidiques avec de la colle industrielle afin de pouvoir récupérer les films pour les études structurales.

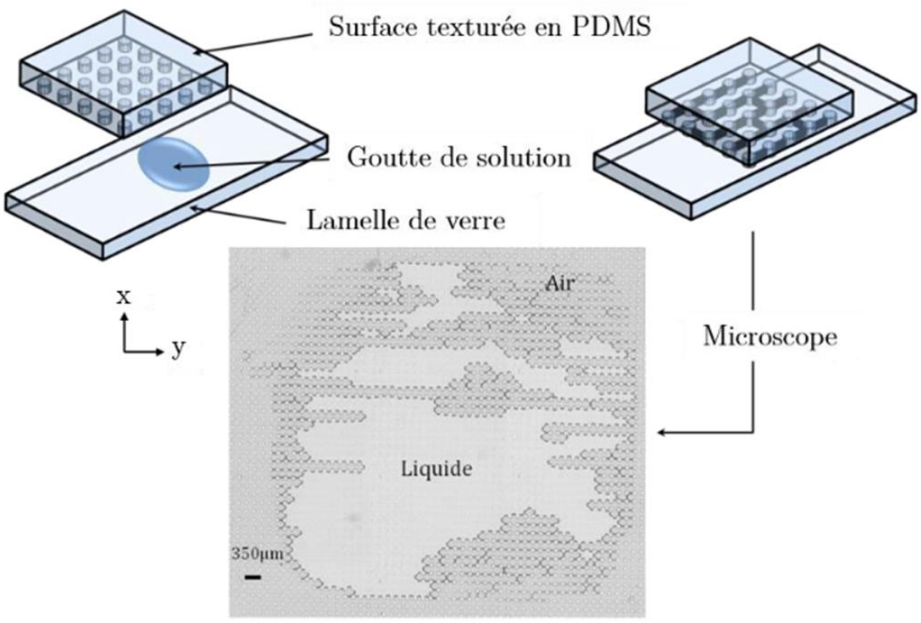


Figure 13 : Principe de la concentration de la solution de collagène au sein de la chambre microfluidique texturée. Une goutte de la solution est déposée entre la lame de verre et la partie texturée de la chambre. On observe l'évolution du système par MOLP ou par PolScope. Reproduit de la thèse de H. Algaba 2016.

Le processus de concentration de la solution de collagène s'effectue par diffusion des solvants (eau, acide) à travers le PDMS. En effet, le PDMS est un matériau très peu perméable à l'eau. De ce fait, l'évaporation des solvants au sein de la chambre sera lente.

Le suivi du système est fait par observations en lumière polarisée à différents temps dans une période de 3 à 6 jours à température ambiante (18-20°C). Les échantillons sont néanmoins conservés la nuit à 4°C.

Le montage lame de verre-chambre microfluidique est placé sous vapeurs d'ammoniac dans un dessiccateur pendant 96 h, afin de précipiter les molécules de collagène sous forme de fibrilles. Après précipitation, la chambre est délicatement retirée de la lame de verre, puis la matrice de collagène fibrillaire de la lame de la chambre. La matrice est nettoyée au PBS x1 jusqu'à obtention d'un pH neutre de la solution de rinçage. Il est ensuite stocké dans une boîte de culture cellulaire dans du PBS x1 à 4°C.

Les chambres sont soigneusement nettoyées dans de l'éthanol et mises dans un bain à ultrasons afin d'éliminer tous les débris. Nous avons observé une opacification de la chambre microfluidique au fur et à mesure de nos observations due à l'évaporation des solvants, notamment l'acide acétique. Il a donc été décidé, entre chaque session d'observations, de les mettre à l'étuve à 40°C afin de faire évaporer le restant de solvant « piégé » dans le PDMS.

- Cas de l'étude de l'état de surface

Dans le cas de l'étude de l'organisation tridimensionnelle du collagène autour des plots en fonction de l'état de surface, les chambres microfluidiques ont préalablement été traitées au plasma O_2 (PDC-32G-2 HARRICK PLASMA) pendant 2 minutes avant la mise en contact avec la lame de verre. L'étude par traitement plasma n'a pas été réalisée sur la chambre 75 µm, nous l'avons écartée par rapport à son trop grand écart par rapport à la distance moyenne entre deux ostéons (200 µm). La chambre penrose n'a également pas été sélectionnée dans cette étude. Deux concentrations de collagène ont été étudiées : 40 et 65 mg/mL, afin de ne pas multiplier la quantité d'échantillons.

- Cas de l'étude de la force ionique

Dans le cas de l'étude de l'effet de la force ionique sur l'organisation tridimensionnelle du collagène, les précurseurs ioniques de la phase minérale d'hydroxyapatite ont été dissous au préalable dans la solution de collagène initiale. L'étude de la force ionique n'a pas été faite sur la chambre 75 µm préalablement écartée. Deux concentrations de collagène ont été étudiées : 40 et 65 mg/mL, afin de ne pas multiplier la quantité d'échantillons.

Les matrices de collagène sont nommées Coll/X/Y/Z, où X est la distance inter-plots de la chambre utilisée, Y la concentration de la solution initiale de collagène et Z la présence du plasma (P) ou des précurseurs minéraux (HA), le cas échéant. Le récapitulatif des différents paramètres étudiés est donné dans le *Tableau 10*.

Nom échantillon	Distance inter-plots (µm)	[coll] (mg/mL)	Durée observations (jours)	Temps de précipitation sous NH_3 (h)
75-4%	75	40	3	24 ou 48
75-5%	75	50	3	24 ou 48
75-6,5%	75	65	3	24 ou 48
75-8%	75	80	3	24 ou 48
120-4%	120	40	3 ou 7	48
120-4%-P	120	40	3 ou 7	48
120-4%-HA	120	40	3 ou 7	48
120-5%	120	50	3 ou 7	48
120-6,5%	120	65	3 ou 7	48
120-6,5%-P	120	65	3 ou 7	48
120-6,5%-HA	120	65	3 ou 7	48
120-8%	120	80	3 ou 7	48
200-4%	200	40	3 ou 7	24 ou 48
200-4%-P	200	40	3 ou 7	48
200-4%-HA	200	40	3 ou 7	48
200-5%	200	50	3 ou 7	24 ou 48
200-6,5%	200	65	3 ou 7	24 ou 48
200-6,5%-P	200	65	3 ou 7	48
200-6,5%-HA	200	65	3 ou 7	48
200-8%	200	80	3 ou 7	24 ou 48
240-4%	240	40	3 ou 7	24 ou 48
240-4%-P	240	40	3 ou 7	48
240-4%-HA	240	40	3 ou 7	48
240-5%	240	50	3 ou 7	24 ou 48
240-6,5%	240	65	3 ou 7	24 ou 48
240-6,5%-P	240	65	3 ou 7	48
240-6,5%-HA	240	65	3 ou 7	48
240-8%	240	80	3 ou 7	24 ou 48
Penrose-4%	70-240	40	3 ou 7	48
Penrose-6,5%	70-240	65	3 ou 7	48
Penrose-4%-HA	70-240	40	3 ou 7	48
Penrose-6,5%-HA	70-240	65	3 ou 7	48

Tableau 10 : Résumé des différents paramètres pour l'étude de la concentration du collagène par évaporation dans les chambres microfluidiques.

V. Formation de porosités au sein des matrices denses de collagène

Comme expliqué dans les Chapitres 2 et 4, les approches pour mimer l'organisation tridimensionnelle de l'os trabéculaire ont été : (i) l'émulsion corps gras/corps aqueux et (ii) l'utilisation d'agents porogènes.

Différents composés ont présenté des intérêts par rapport à ces deux approches, mais nous avons choisi de présenter exclusivement les résultats liés à l'huile de coprah. Cette huile est riche en acides gras saturés. Suivant son pourcentage d'hydrogénation, sa température de fusion varie entre 20 et 30°C, ce qui en fait un produit de choix pour une étude avec le collagène sans dénaturation. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes procurés de l'huile de coprah vendue dans la grande distribution.

1. Emulsion collagène/ huile de coprah

La mise en place du système de l'organisation tridimensionnelle du collagène au sein d'une émulsion avec l'huile de coprah est la suivante. Dans une Eppendorf, un volume d'une solution acido-soluble de collagène (0,5 mL), concentrée à 40 mg/mL par évaporation, a été ajouté à un volume d'huile de coprah liquide (0,5 mL). Le mélange a été agité à l'aide d'une spatule, placé dans un bain à ultrason pendant 1 min, puis vortexé pendant 1 min afin de faciliter l'émulsion. Le système a été ensuite figé dans un bain eau-glace afin de solidifier l'huile de coprah. Le mélange a été ensuite placé dans un dessiccateur sous vapeurs d'ammoniac pendant 96 h afin d'induire la précipitation des molécules de collagène en fibrille. La matrice de collagène-coprah a été ensuite nettoyée dans du PBS x1 ou de l'eau distillée. Elle a été ensuite coupée en tranches, puis placée dans une étuve à 37°C afin de faciliter l'élimination de l'huile de coprah qui ne précipite pas. Une matrice présentant quelques porosités à l'œil nu est récupérée comme on peut le voir sur la *Figure 14*.

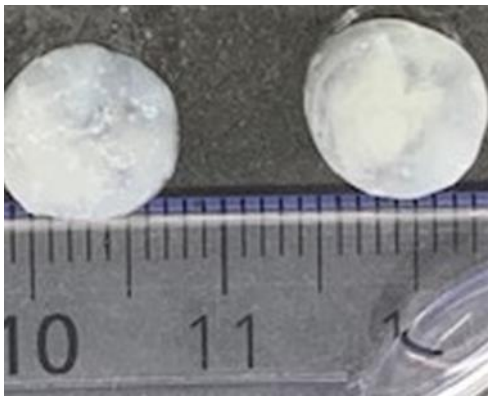


Figure 14 : Photo macro de la matrice CollCocoE50/50-4%. L'huile de coprah semble en partie piégée à l'intérieur de la matrice de collagène.

Néanmoins, ce procédé bien que prometteur en termes de formation de porosités ne permet pas : (i) d'éliminer l'huile de coprah en totalité, la formation d'agrégats est visible à l'œil nu ainsi que (ii) la formation de porosités interconnectées.

Les matrices sont nommées CollCocoE-X/Y-Z où X et Y sont le ratio collagène-coprah introduits dans l'Eppendorf et Z la concentration de la solution acido-soluble de collagène utilisée. Les paramètres des différentes matrices sont résumés dans le *Tableau 11*.

Nom échantillon	Rapport collagène-coprah	[coll] (mg/mL)	Temps de précipitation sous NH_3 (h)
CollCocoE50/50-4%	50/50	40	96
CollCocoE50/50-6,5%	50/50	65	96

Tableau 11 : Résumé des différents paramètres pour le procédé d'émulsion collagène-coprah.

2. Huile de coprah et agents porogènes

Ce procédé consiste à former des microparticules d'huile de coprah qui serviront d'agents porogènes au sein de la matrice de collagène. Les microparticules de coprah ont été formées à l'aide d'une unité d'encapsulation Nisco Var J30 (*Figure 15*). L'huile de coprah liquide est placée dans une seringue sur un pousse-seringue. Le pousse-seringue est relié à l'unité d'encapsulation. Le débit du pousse-seringue est fixé à 0,5 mL/min. Une fois arrivée dans l'unité d'encapsulation, l'huile de coprah est transformée sous forme de fines gouttelettes grâce à un flux d'air, dont la pression est comprise entre 4 et 5 bars. Les gouttelettes sont immédiatement figées dans de l'azote liquide. Une fois l'azote évaporé, les microparticules blanches sont stockées dans un tube (type Falcon®) à -10°C. Etant donné la température de fusion de l'huile de coprah suivant son taux d'hydrogénation (20-34°C), il n'a pas été possible de mesurer avec précision le diamètre moyen des microparticules.

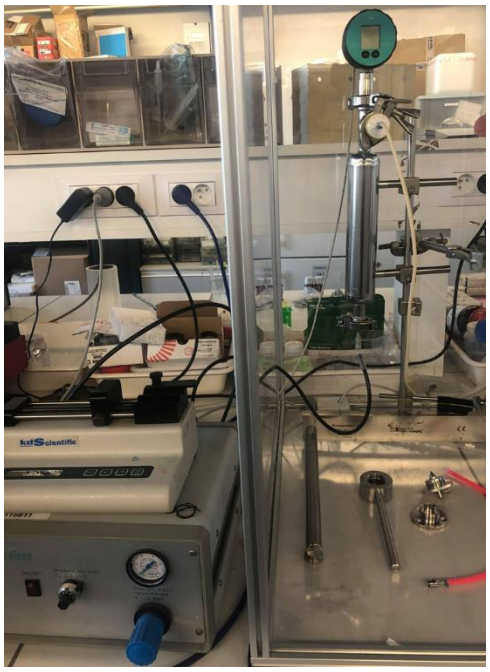


Figure 15 : Montage de l'unité d'encapsulation Nisco Var J30.

Dans un Eppendorf, un volume de microparticules d'huile de coprah (0,3-0,6 mL) est mesuré, puis centrifugé 30 secondes sur une centrifugeuse de paillasse. Un volume de solution acido-soluble de collagène (0,3-0,5 mL), préparée à partir de microparticules de collagène à 40 ou 65 mg/mL, est ajouté. Le tout est mélangé à l'aide d'une spatule, puis de nouveau centrifugé 30 secondes. Un deuxième volume de microparticules d'huile de coprah est ajouté (0,1-0,2 mL), mélangé et centrifugé. Deux ratios de collagène-coprah ont été étudiés dans ce travail : 50/50 et 30/70. Entre chaque étape, l'Eppendorf est placé 5 min dans un bain eau-glace afin d'éviter la fusion des microparticules de coprah.

L'Eppendorf est ensuite mis dans un dessiccateur sous vapeurs d'ammoniac pendant 96 h afin d'induire la précipitation des molécules de collagène en fibrille. La matrice de collagène-coprah a été ensuite nettoyée dans du PBS x1 ou de l'eau distillée. Elle a été ensuite coupée en tranches, puis placée dans une étuve à 37°C afin de faciliter l'élimination de l'huile de coprah qui ne précipite pas. A l'œil nu, la matrice semble présenter de la porosité.

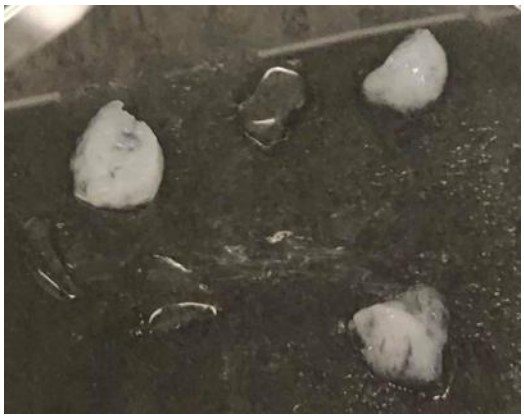


Figure 16 : Photo macro de la matrice CollCocoM-30-70-6,5%. Des pores sont visibles au sein de la matrice.

Néanmoins, nous savons que la totalité de l'huile de coprah n'a pu être parfaitement éliminée également. De plus, nous avons rencontré des difficultés quant à la préparation de ces matrices pour des observations au MEB. En effet, un phénomène de rétractation des matrices, certainement due à une mauvaise préparation, des matrices nous a empêché de pouvoir pleinement observer la porosité des matrices. Pour pallier cette problématique, les précurseurs minéraux de l'hydroxyapatite ont été ajoutés à la solution de collagène afin d'assurer une meilleure tenue de la structure lors de la préparation.

Les matrices sont nommées CollCocoM-X/Y-Z où X et Y sont le ratio collagène-coprah introduits dans l'Eppendorf et Z la concentration de la solution acido-soluble de collagène utilisée. Les paramètres des différentes matrices sont résumés dans le *Tableau 12*.

Nom échantillon	Rapport collagène-coprah	[coll] (mg/mL)	Temps de précipitation sous NH_3 (h)
CollCocoM50/50-4%	50/50	40	96
CollCocoM50/50-6,5%	50/50	65	96
CollCocoM30/70-4%	30/70	40	96
CollCocoM30/70-6,5%	30/70	65	96
CollCocoM30/70-4%-HA	30/70	40	96
CollCocoM30/70-6,5%-HA	30/70	65	96

Tableau 12 : Résumé des différents paramètres pour le procédé des microparticules de coprah.

VI. Techniques de caractérisations

Différentes techniques de caractérisations ont été utilisées au cours de cette thèse pour chaque type d'échantillon (matrice ou film, minéralisé ou non, nanoparticules minérales, billes de collagène) qui pour une même technique de caractérisation peuvent nécessiter une préparation différente.

1. Etude de la microstructure : préparation des échantillons et observations

1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les observations des échantillons au microscope électronique à balayage s'effectuent sous vide, il est donc nécessaire de les traiter afin d'éviter leur rétractation, il faut ainsi éliminer toute présence d'eau pour garantir l'intégrité de leur structure. Pour cela, différentes étapes sont nécessaires comme suit :

Préparation des échantillons

1) Fixation au glutaraldéhyde

Solution de glutaraldéhyde			**1h à 4°C**
Glutaraldéhyde	8%	10 mL	
Tampon cacodylate (pH 7.4)	0,05 M	22 mL	
Solution de lavage			**3 lavages de 10 min chacun**
Tampon cacodylate (pH 7.4)	0,1 M	1 volume	
Saccharose	0,6 M	1 volume	

La fixation au glutaraldéhyde permet le maintien de la structure des échantillons grâce à la réticulation des protéines à l'aide de la création de ponts covalents amides entre les groupements aminés et acides libres. Les bains de lavage au tampon cacodylate permettent d'éliminer l'excédent de glutaraldéhyde.

2) Déshydratation

Bains EtOH	EtOH 30%	**5 min**
	EtOH 50%	**5 min**
	EtOH 70%	**5 min**
	EtOH 80%	**5 min**
	EtOH 90%	**5 min**
	EtOH 95%	**5 min**
	EtOH 100%	**2 x 10 min**

Les échantillons ont ensuite été progressivement déshydratés dans des bains aqueux d'éthanol de concentration croissante. Quand l'ensemble de cette étape ne pouvait pas être réalisé dans la journée, il a été possible de s'arrêter à EtOH 70% (bain de conservation) et de les conserver la nuit à 4°C.

3) Séchage supercritique CO_2

Les échantillons ont ensuite séché au point critique du CO_2 à l'aide soit d'un appareil manuel LEICA CO_2 séchage point critique CPD30 (1ère moitié de ma thèse), soit à l'aide d'un appareil automatique LEICA CO_2 séchage point critique CPD300 (2ème moitié de ma thèse) afin de préserver leur structure tridimensionnelle.

Les échantillons sont placés dans une chambre contenant de l'éthanol absolu. La chambre est refroidie jusqu'à 15°C. Un échange de l'éthanol vers le CO_2 liquide est fait graduellement par cycle d'échanges. Durant ces échanges, la pression au sein de la chambre augmente (environ 70 bars à la fin des échanges). Le nombre de cycles est respectivement de 10 et 22 suivant les appareils afin de s'assurer un échange total de l'éthanol vers le CO_2. Suite à cela, la température de la chambre est augmentée jusqu'à 37°C, le CO_2 atteint donc son état supercritique (*Figure 17*). Le CO_2 gazeux est évacué de la chambre et après refroidissement, les échantillons séchés sont récupérés.

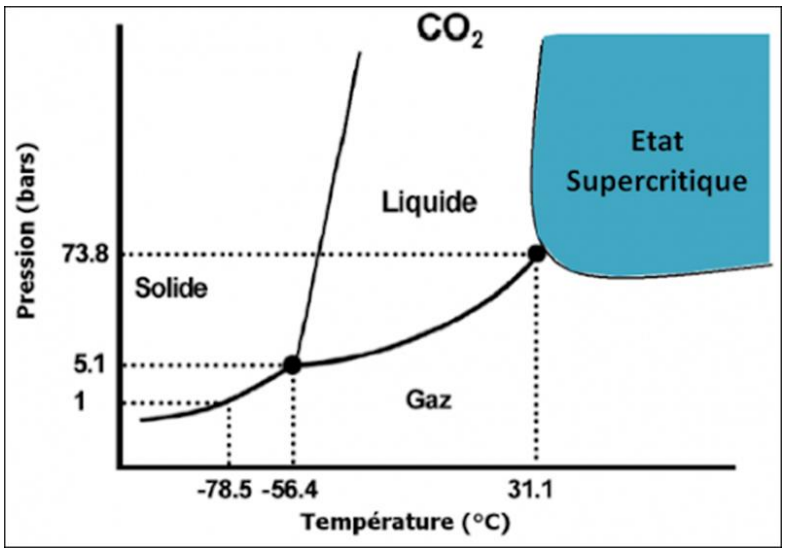


Figure 17 : Diagramme de phase du CO_2.

Cette technique de préparation s'est révélée quelques fois problématique quand certains échantillons se sont rétractés après le point critique, ce qui empêchait de pouvoir observer la porosité dans nos matrices par exemple. Pour pallier à ce problème, les temps des différents bains ont été doublés et nous avons privilégié de plus petits morceaux de matrices à observer.

Observation des échantillons

Les échantillons ont été fracturés à l'aide d'un scalpel et placés sur des adhésifs de carbone conducteur placés eux-mêmes sur des plots métalliques. Les échantillons ont été ensuite métallisés à l'or sur une épaisseur d'environ 10 nm avant d'être mis dans la chambre d'observation du microscope électronique à balayage Hitachi S-3400N à une tension d'accélération variant entre 3 et 10 kV selon le type d'échantillon (*e.g.* microparticules de collagène à 3 kV, nanoparticules d'hydroxyapatite à 7 kV, matrices hybrides à 7 ou 10 kV, matrices de collagène à 10 kV).

2. Microscopie électronique à balayage aux ions hélium (MIH)

Certains échantillons ont pu être observés à l'aide d'un microscope électronique à balayage aux ions hélium. Le principe est le même qu'un microscope électronique à balayage classique à la différence près que ce sont des ions hélium qui sont la source émise et non des électrons. Les échantillons ont donc été préparés au préalable de la même manière que pour une observation au MEB.

Toutes les observations ont été réalisées au Trinity College à Dublin en collaboration avec Stanislas Von Euw (Postdoctoral researcher, PHC Ulysse) dans le cadre d'un projet européen d'échange entre la France et l'Irlande (Ulysse), sur un microscope électronique à balayage aux ions hélium Zeiss ORION Plus à 29 kV.

3. Microscopie électronique à transmission (MET)

Comme pour la microscopie électronique à balayage, il est nécessaire de traiter les échantillons afin de préserver leur structure. Le volume des échantillons doit être d'environ 1 mm^3. Deux différents protocoles ont été utilisés durant cette thèse.

Préparation des échantillons

Premier protocole

- Fixation au glutaraldéhyde

Solution de glutaraldéhyde			**1h à 4°C**
Glutaraldéhyde	8%	10 mL	
Tampon cacodylate (pH 7.4)	0,05 M	22 mL	
Solution de lavage			**3 lavages de 10 min chacun**
Tampon cacodylate (pH 7.4)	0,1 M	1 volume	
Saccharose	0,6 M	1 volume	

Même protocole que pour la microscopie électronique à balayage.

- Post-fixation à l'osmium

Solution d'osmium			**1h à 4°C**
Tétraoxyde d'osmium	4%	2 volumes	
Saccharose	0,6 M	1 volume	
Tampon cacodylate	0,4 M	1 volume	
3 lavages de 10 min chacun			

La post-fixation par le tétraoxyde d'osmium (OsO_4) permet de fixer la structure, de colorer l'échantillon et d'améliorer le contraste. Cependant, cette étape n'a pas été réalisée afin d'éviter des dépôts de précipités d'osmium sur les grilles et éviter une mauvaise interprétation des observations. En effet, certains dépôts peuvent être confondus avec ceux de l'hydroxyapatite (Wang *et al.* 2011, Supporting Informations).

Lors de la dernière inclusion, une coloration des échantillons a été faite au rouge nucléaire. Dans un même souci de potentiels précipités de dépôts, la coloration n'a pas été faite sur les échantillons contenant du minéral (*e.g.* os et matrices hybrides).

- Déshydratation

Bains EtOH	EtOH 50%	**toute une nuit**
	EtOH 70%	**5 min**
	EtOH 95%	**5 min**
	EtOH 100%	**2x10 min**
Oxyde de propylène	EtOH 100% 1 volume + oxyde de propylène 1 volume	**10 min**
	Oxyde de propylène	**10 min**

Les échantillons ont été ensuite déshydratés dans des bains aqueux d'éthanol puis l'éthanol a été progressivement remplacé par l'oxyde de propylène en 2 bains de 10 min, le premier dans un mélange 50/50 d'éthanol absolu et d'oxyde de propylène, le second dans de l'oxyde de propylène pur. Cela permet de maximiser l'imprégnation de la résine pour la suite.

- Imprégnation des échantillons

Préparation de la résine (Araldite)	EMbed 812	**20 mL**
	DDSA	**9 mL**
	NMA	**12 mL**
	BDMA	**1,2 mL**
Oxyde de propylène + résine 1	Oxyde de propylène 2/3 + résine 1/3	**1h à 4°C**
Oxyde de propylène + résine 2	Oxyde de propylène 1/3 + résine 2/3	**Sous hotte jusqu'à concentration de la résine à 100%**

L'imprégnation des échantillons dans la résine se fait d'abord dans un bain d'oxyde de propylène/résine (2/3 : 1/3) pendant 1h à 4°C puis dans un mélange oxyde de propylène/résine (1/3 : 2/3) sous hotte jusqu'à évaporation de l'oxyde de propylène.

Lors de la dernière inclusion, le kit de résine a été modifié par : un volume d'Araldite (20 mL), un volume de DDSA (22 mL) et un volume de DMP-30 (1 mL).

- Polymérisation de la résine

Les échantillons sont placés dans des moules alvéolaires remplis d'araldite et placés à l'étuve à 60°C pendant 3 jours.

Deuxième protocole (Djediat 1990)

- Fixation des échantillons au glutaraldéhyde

Tampon phosphate 0.1 M	Na_2HPO_4	**40,5 mL**
	$NaHPO_4$	**9,5 mL**
Glutaraldéhyde 2%	Glutaraldéhyde	**2 g**
	Tampon phosphate Sorensen	**100 mL**

Les échantillons sont fixés à l'aide d'une solution de glutaraldéhyde 2% pendant 30 min à température ambiante. Du tétraoxyde d'osmium est rajouté à une concentration finale de 1% dans l'Eppendorf pendant 30 min (cette étape ne sera pas réalisée en raison des artéfacts visibles en microscopie). Les échantillons sont ensuite lavés dans trois bains de tampon phosphate 0,1 M pendant 10 min chacun.

- Déshydratation

Bains EtOH	EtOH 30%	**30 min à TA**
	EtOH 50%	
	EtOH 70%	
	EtOH 90%	
	EtOH 100%	

- Imprégnation des échantillons

Préparation de la résine	ERL 42O6	**10 mL**
	NSA	**26 mL**
	DER	**6 mL**
	DMA	**300 µL**
EtOH 100% + résine	EtOH 1 volume + résine 1 volume	**1h30 à température ambiante**
Résine pure	Résine 1 volume	**2 x 1h à température ambiante**

L'imprégnation des échantillons dans la résine se fait d'abord dans un mélange 50/50 EtOH 100%-résine pendant 1h30 à température ambiante puis dans deux bains de résine pure d'une heure à température ambiante également.

- Polymérisation de la résine

Les échantillons sont placés dans des moules alvéolaires dans une étuve à 70°C pendant 2-3 jours.

Microtomie

Les blocs de résine polymérisés sont coupés à l'aide d'un ultramicrotome, un Leica EM UC7 pour le premier protocole et un Reichert-Jung pour le deuxième protocole. Tout d'abord en sections semi-fines d'environ 1 µm, déposées sur une lame de verre et colorées au bleu de toluidine pendant 1 min sur plaque chauffante. L'excédent de toluidine est ensuite rincé à l'eau. Les coupes semi-fines sont ensuite observées au microscope optique afin de vérifier la présence de l'échantillon sur les coupes comme observé dans la *Figure 18*.

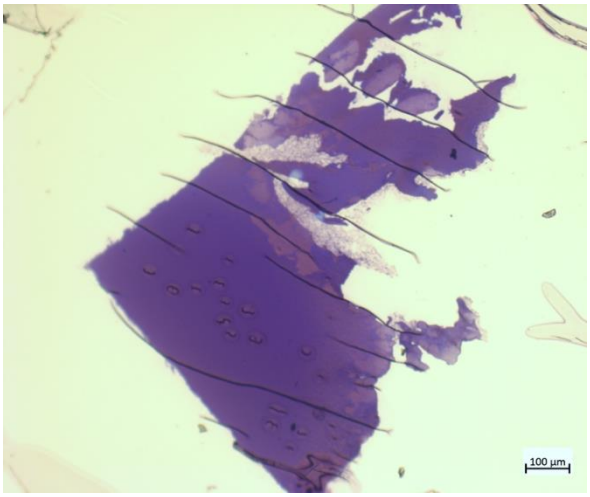


Figure 18 : Observation en lumière blanche d'une coupe semi-fine d'une matrice de collagène.

Ensuite, les échantillons sont coupés afin d'obtenir des sections ultra-fines d'environ 60-70 nm à l'aide des mêmes ultramicrotomes. Les coupes sont déposées sur des grilles de cuivre recouvertes de carbone puis contrastées avec de l'acétate d'uranyle (2%) pendant 15 min. Les échantillons étant composés d'éléments organiques légers (collagène), l'ajout de sels lourds (tels que l'U) permet une meilleure visualisation des échantillons au microscope vis-à-vis des électrons. Cependant, comme énoncé précédemment avec le tétraoxyde d'osmium, il est nécessaire d'avoir une préparation propre pour pouvoir distinguer les dépôts de sels lourds des nanoparticules d'apatite.

Observation des échantillons

Les observations ont été réalisées au laboratoire avec un microscope électronique à transmission FEI TECHNAI G^2 Spirit Twin à 120 kV équipé d'une caméra CCD. Compte tenu de la fragilité des échantillons, les observations ont été menées avec un diaphragme objectif afin d'éviter de brûler nos échantillons en présence de contrastant.

4. Microscopie optique à lumière polarisée (MOLP)

Différents types d'échantillons ont été observés par microscopie à lumière polarisée : évolution suivie sous lumière polarisée des chambres microfluidiques, coupes semi-fines issues des préparations de coupe pour le microscope électronique à transmission et coupes histologiques (protocole décrit dans la partie Histologie).

Un microscope optique Zeiss AX10 équipé d'une caméra AxioCam ICc 5, d'un polariseur, d'un analyseur et d'une lame quart d'onde γ a été utilisé pour faire ces observations.

Les observations ont été menées dans l'ordre suivant :

- Observation sous lumière blanche à faible grandissement (vue globale de l'échantillon)
- Lumière polarisée : polariseur à 0°, analyseur à 90°
- Lumière polarisée : polariseur à 45°, analyseur à 135°
- Observation sous lame quart d'onde pour les zones d'intérêts : polariseur à 0°, analyseur à 90° (pivotement de la platine pour voir les changements de couleurs)

Ce procédé doit être répété à chaque changement de grandissement. Les clichés ont été acquis par la caméra reliée au logiciel ZenCore. En raison de l'épaisseur de certains échantillons, le contraste noir/blanc de nos échantillons n'a pas été optimal. Le fond de certains clichés tire donc plus vers le violet ou le bleu marine.

5. Microscopie optique à lumière polarisée à mesures PolScope (PolScope)

Le système lame de verre-goutte de solution de collagène-chambre microfluidique a été étudié par PolScope.

Un microscope inversé Olympus IX-71 équipé du montage optique à même de réaliser la mesure polscope a été utilisé afin de faire ces observations (Shribak et Oldenbourg 2003). L'image de sortie est envoyée vers une caméra CCD USB EO-0312M (résolution 640x480 pixels). Suivant l'objectif utilisé, la taille de l'image sera donc différente (*Tableau 13*). Les clichés ont été acquis par la caméra reliée au logiciel Abrio.

Objectif	Pleine image horizontale (µm)	Pleine image verticale (µm)
x4	3802	2515
x6	2253	1670
x10	1357	1008
x15	896	672
x20	662	500
x30	436	363
x40	317	252
x60	211	169

Tableau 13 : Taille de l'image obtenue par la caméra en fonction de l'objectif d'acquisition.

6. Histologie

Les coupes histologiques permettent de meilleures observations en microscopie optique à lumière polarisée. La taille des échantillons doit être d'environ 5mm x 5mm x 1-2 mm. Le protocole se divise en 5 étapes : fixation chimique, déshydratation, inclusion, coupe et coloration.

- Fixation chimique

PFA 4%	Paraformaldéhyde	4 g	**Agitation à 60°C pendant plusieurs heures puis filtration**
	PBS x1	100 mL	

La solution de fixation est préparée sous une hotte. Une masse de paraformaldéhyde (4 g) est mélangé à un volume PBS x1 (100mL). Le mélange est chauffé à 60°C sous agitation pendant plusieurs heures jusqu'à dissolution du paraformaldéhyde, puis la solution est filtrée. La solution peut être conservée à 4°C pendant 6 mois, il est possible de faire des aliquots de 5-10 mL à congeler si l'utilisation est prolongée.

Le paraformaldéhyde crée des ponts entre les groupements amines NH_2 ce qui induit une rigidité thermique et physique des échantillons. Selon la concentration en collagène des échantillons, ils sont laissés une nuit dans le PFA à 4°C (40-50 mg/mL) ou 48h (au-dessus de 200 mg/mL).

- Déshydratation

Bains EtOH	EtOH 70%	**24 h à 4°C**
	EtOH 95%	**4 h à 4°C**
	EtOH 100%	
Bains butan-1-ol	Butan-1-ol 1 volume	**Pendant 3 jours, changer le bain tous les jours**

Les échantillons sont d'abord déshydratés sous hotte dans des bains aqueux d'éthanol à concentration croissante puis pendant 3 jours dans des bains de butanol qui permet d'éliminer l'eau résiduelle. Il faut faire attention d'utiliser une bouteille récente de butanol afin d'éviter la présence d'eau dans le solvant.

- Inclusion dans la paraffine

Les échantillons vont être inclus dans de la paraffine. Il est nécessaire de faire fondre de la paraffine 56-58°C à l'étuve au préalable. Les échantillons sont ensuite placés dans de petits cristallisoirs contenant de la paraffine liquide puis mis à l'étuve à 70°C pendant 4-5 h (40-50 mg/mL) ou toute une nuit (au-dessus de 80 mg/mL).

Deux empiècements métalliques sont ensuite placés sur une plaque en verre pour former un cube. De la paraffine liquide est coulée dans le cube et l'échantillon est placé sur un côté, il ne doit pas toucher la plaque en verre ou les parois métalliques. Avant le refroidissement de la paraffine, une étiquette du nom de l'échantillon sera placée du côté opposé de l'échantillon. De la paraffine liquide sera rajoutée au centre du cube au bout de 10 min, le refroidissement de la paraffine précédente créant un creux qui pourrait fragiliser le cube lors des coupes.

- Coupes

Afin de localiser au mieux l'échantillon, la paraffine est taillée en forme de trapèze jusqu'à l'échantillon. Le bloc est placé sur le porte-échantillon du microtome. Des coupes de 7 µm d'épaisseur sont alors réalisées et stockées dans une boîte en carton. Des coupes (5-6) sont prélevées et placées sur une lame de verre et recouvertes d'une goutte d'H_2O MilliQ. La lame est placée sur une plaque chauffante (60°C) afin de détendre la paraffine et de faire adhérer les coupes à la lame lors de l'évaporation de l'eau.

- Coloration des coupes

Les lames sont placées dans une boîte en verre crantée qui est saisie à l'aide de crochets. Afin d'éliminer la paraffine, différents bains sont effectués dans l'ordre suivant :

- Toluène 10 min x 2
- EtOH 100% 10 min
- EtOH 95% 5 min
- EtOH 70% 5 min
- H_2O MilliQ 5 min

Ces bains servent à réhydrater les coupes, afin de colorer les coupes puis de déshydrater de nouveau, les bains suivants sont maintenant effectués :

- Rouge de picrosirius 15 min
- EtOH 100% 3 min

- Toluène 3 min x 2

Afin de maintenir les coupes sur les lames, un montage est réalisé. Les lames sont sorties du dernier bain de toluène. De la résine Eukit de montage est déposée en faisant attention de ne pas toucher les coupes. Une lamelle est ensuite placée au-dessus des coupes, une légère pression est exercée et l'excès de résine est nettoyé à l'aide de papier Kimtech. Les lames sont mises à sécher à température ambiante pendant 2 h le temps que la résine durcisse et peuvent ensuite être observées.

2. Etude la phase organique et de la phase minérale

1. Analyses thermogravimétriques (ATG)

Des analyses thermogravimétriques ont été réalisées afin de déterminer plus précisément la concentration en collagène et le taux de minéralisation le cas échéant dans les matrices minéralisées. Après tare de balance de l'appareil, entre 20 et 40 mg de l'échantillon sont prélevés. L'excédent d'eau de surface est épongé entre deux papiers Kimtech.

Les analyses ont été effectuées sur un appareil thermobalance NETZSCH STA 409PC au laboratoire. L'échantillon est placé dans un creuset en alumine, un creuset en alumine vide étant utilisé comme référence. L'échantillon est ensuite chauffé sous air jusqu'à une température de 1000°C par une rampe de 5°C/min.

Afin de déterminer le taux de minéralisation des matrices hybrides (collagène-apatite), les échantillons sont calcinés jusqu'à 1000 °C. Jusqu'à 200°C la perte de masse correspond à l'eau de surface. La phase organique (collagène) quant à elle se décompose entre 200 et 600°C et entre 600 et 1000°C les matrices ne contiennent plus que la phase minérale (*Figure 19*). Le taux de minéralisation se calcule à partir de la formule suivante :

$$Taux\ de\ minéralisation = \frac{Masse\ (phase\ minérale)}{Masse\ (phase\ minérale + phase\ organique)}$$

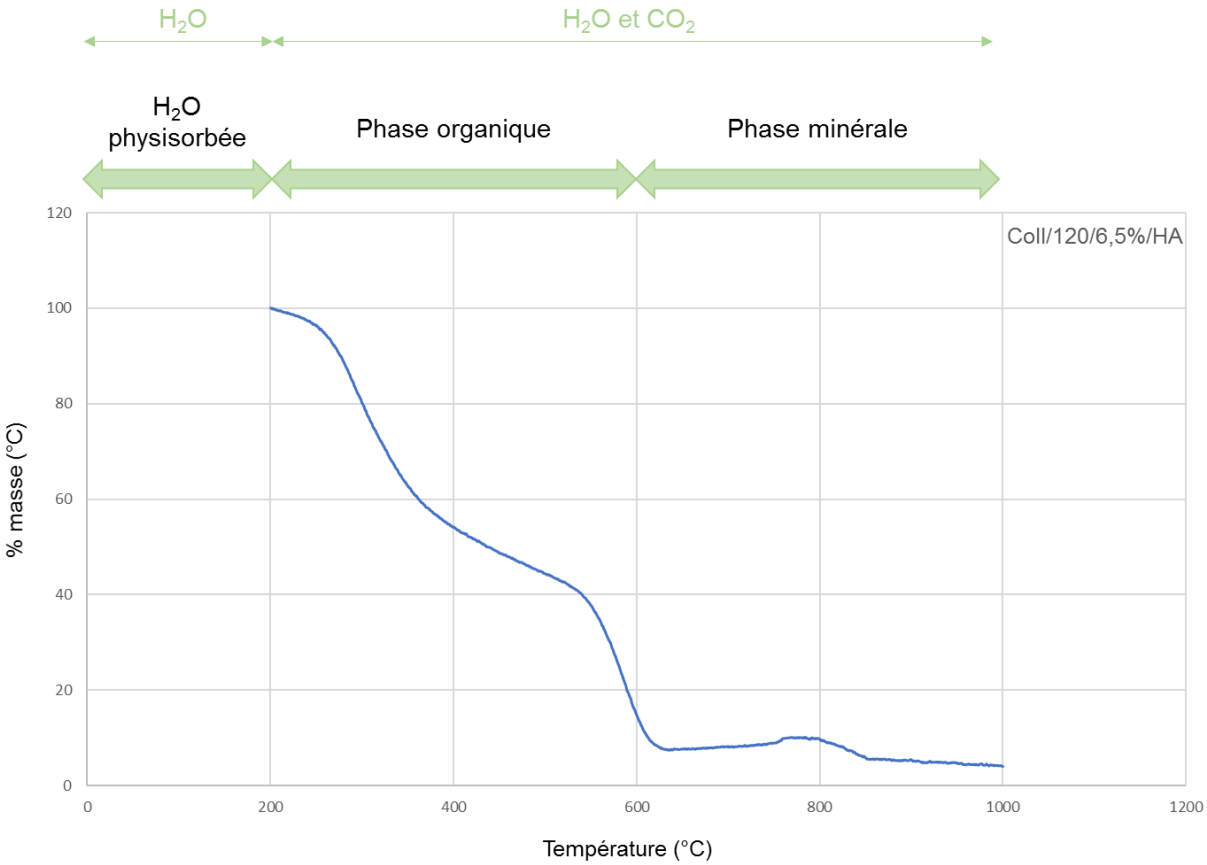


Figure 19 : Thermogramme d'une matrice de collagène. Les températures de décomposition des différents composants sont indiquées.

2. Diffraction des rayons X (DRX) et diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

Les poudres de nanoparticules d'hydroxyapatite synthétisées ont été étudiées par DRX en mode réflexion. Elles sont broyées au préalable dans un mortier, avant d'être compactées dans un porte-échantillon creux en forme de disque afin de pouvoir présenter une face plate. Les diffractogrammes ont été enregistrés avec un diffractomètre Bruker D8 utilisant la radiation Kα du Cu, sur l'intervalle 0-80° (en 2θ) avec un pas de 0,2°. Les phases ont été identifiées par comparaison avec les références du fichier ICDD-PDF (International Center for Diffraction Data-Powder Diffraction Files), notamment celles de l'hydroxyapatite 00-009-0432, 01-089-6438 et 01-084-1998.

En ce qui concerne les matrices de collagène, il n'est pas possible de les présenter suivant une face plate. Il est d'ailleurs indispensable de les conserver humides le temps de la caractérisation. Les matrices ont donc été coupées en petits morceaux et placées dans des capillaires en borosilicate de 1 mm fermés hermétiquement par fusion du capillaire. Les échantillons d'os ont été placés dans des capillaires de 2 mm. Les capillaires ont ensuite été placés dans une enceinte sous vide afin de s'affranchir des phénomènes de diffusion de l'air.

La diffusion des rayons X et aux petits angles (SAXS) nous a permis d'acquérir les diffractogrammes sur capillaire en mode transmission. Les acquisitions ont été faite sur un modèle Guinier mis en place à l'IPR (Bizien *et al.* 2015) composé d'un détecteur 2D Pilatus 300 K et d'un générateur microsource de rayons X GeniX 3D opérant à 30 W. La radiation monochromatique CuKα est de $\lambda = 1.541$ Å. La distance échantillon-détecteur est de 232 mm. Les diagrammes de diffusion ont été enregistrer pour un espace réciproque $q= (4\pi/\lambda)*\sin(\Theta/2)$ dans une gamme de 0.01 à 1.742 $Å^{-1}$.

Cependant, la très faible épaisseur de nos matrices ne permet pas d'obtenir un signal suffisant pour étudier les harmoniques des distances intrafibrillaires de collagène. Il serait intéressant d'étudier la diffusion couplée SAXS/WAXS sur une ligne synchrotron afin d'accéder à ces informations.

3. Résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'état solide

Les expériences de résonance magnétique nucléaire à l'état solide ont été effectuées sur un spectromètre Bruker Avance III avec un champ magnétique $B_0 = 7$ T, où la fréquence de résonance est de 300 MHz pour le ^{1}H et 121 MHz pour le ^{31}P. Toutes les expériences ont été réalisées avec une sonde Bruker double résonance dans des rotors de 4 mm de diamètre.

Comme dans le cas des caractérisations par SAXS, il est nécessaire que les échantillons d'os et les matrices de collagène restent humides. Deux types de rotors ont donc été utilisés : les rotors standards pour les poudres d'hydroxyapatite et les rotors « cramps » pour les échantillons d'os et les membranes de collagène où l'échantillon est centré dans le rotor entre deux inserts en téflon. Les fréquences de rotation à l'angle magique étaient de 8-14 kHz en fonction des échantillons. Différentes séquences ont été utilisées dans cette thèse :

a) Séquence HPDEC

La séquence HPDEC (High Power DECoupling) est la séquence la plus simple pour acquérir un spectre. Elle consiste à envoyer une impulsion sur la voie S avant l'acquisition du signal, qui se découple à haute puissance pendant l'acquisition selon la voie I (*Figure 20*). C'est une séquence quantitative à condition que la relaxation longitudinale (T_1) des spins S entre chaque impulsion soit respectée.

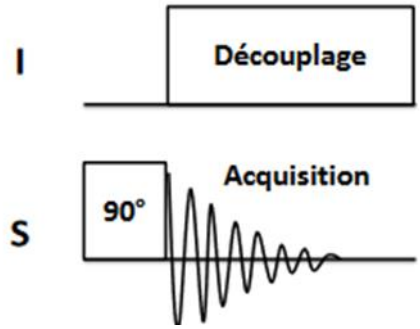


Figure 20 : Séquence d'impulsion HPDEC. Reproduit de Wang 2012.

b) Séquence CP (polarisation croisée)

La séquence CP permet de transférer une partie de l'aimantation des spins abondants I (^{1}H en général) aux spins rares S (ici ^{31}P) (*Figure 21*). Une impulsion de 90° permet l'aimantation des spins I, puis un champ électromagnétique est appliqué en parallèle au champ nécessaire à la première impulsion. Les spins I se retrouvent donc « bloqués » (spin-lock) selon ce deuxième champ électromagnétique, déphasé de 90° par rapport au champ B_0. Les spins I et S sont mis en contact pendant un temps t_{cp} selon le champ B_{IS} et un transfert d'énergie est établi entre les spins I(^{1}H) et S(^{31}P). Cette technique permet de mettre en évidence les noyaux ^{31}P à proximité des noyaux ^{1}H.

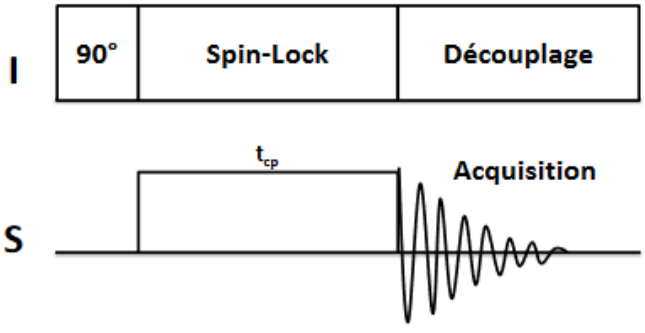


Figure 21 : Séquence de polarisation croisée. Reproduit de Wang 2012.

c) Séquence HETCOR

La séquence HETCOR (HETeronuclear COrrelation) est une variante à deux dimensions (2D) de la séquence CP à la différence près qu'un délai incrémentable t_1 est introduit avant le spin-lock (*Figure 22*). Le noyau abondant étant dans notre cas ^{1}H, il est alors possible d'étudier l'évolution de son aimantation. Nous pouvons donc alors acquérir des spectres RMN ^{31}P dont l'intensité de chaque pic est modulée par les interactions avec les proches protons ^{1}H. Le spectre obtenu est un ensemble de tâches de corrélation qui sont fonction des différentes proximités dans le système étudié.

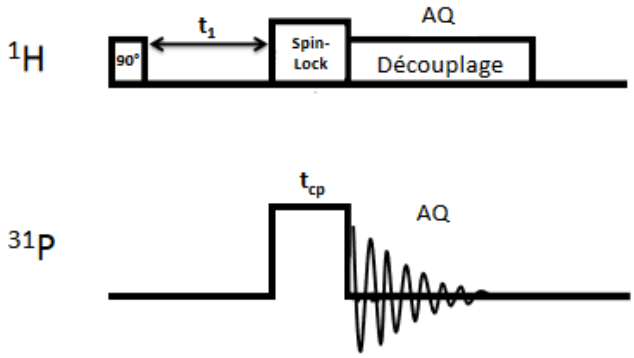


Figure 22 : Séquence d'acquisition HETCOR. Reproduit de Wang 2012.

Références bibliographiques

Algaba H. 2016. « Etude de la formation de structures complexes auto-organisées par séchage confiné de solutions dans des milieux poreux microtexturés en 2D ». Physique. Université de Rennes 1. Français. Tel-01496480.

Bizien, T., J.-C. Ameline, K. G. Yager, V. Marchi, et F. Artzner. 2015. « Self-organization of quantum rods induced by lipid membrane corrugations ». *Langmuir* 31 (44): 12148-54.

Eastoe, J. E. 1955. « The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin ». *Biochemical Journal* 61 (4): 589-600.

Gobeaux, F., G. Mosser, A. Anglo, P. Panine, P. Davidson, M. -M. Giraud-Guille, et E. Belamie. 2008. « Fibrillogenesis in dense collagen solutions: A physicochemical study ». *Journal of Molecular Biology* 376: 1509-22.

Ignat'eva, N. Yu., N. A. Danilov, S. V. Averkiev, M. V. Obrezkova, V. V. Lunin, et E. N. Sobol'. 2007. « Determination of hydroxyproline in tissues and the evaluation of the collagen content of the tissues ». *Journal of Analytical Chemistry* 62 (1): 51-57.

Kokubo, T., S. Ito, M. Shigematsu, S. Sanka, et T. Yamamuro. 1987. « Fatigue and life-time of bioactive glass-ceramic a-w containing apatite and wollastonite ». *Journal of Materials Science* 22 (11): 4067-70.

Lama M., F. M. Fernandes, A. Marcellan, J. Peltzer, M. Trouillas, S. Banzet, M. Grosbot, et al. 2020. « Self-Assembled collagen microparticles by aerosol as a versatile platform for injectable anisotropic materials ». *Small* 16 (4): 1902224.

McDonald J. C., D.C. Duffy, J.R. Anderson, D.T. Chiu, H. Wu, O.J.A Schueller, G.M. Whitesides. 2000. « Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane) ». *Electrophoresis* 21, 27-40

Nassif, N., F. Martineau, O. Syzgantseva, F. Gobeaux, M. Willinger, T. Coradin, S. Cassaignon, T. Azaïs, et M. M. Giraud-Guille. 2010. « *In vivo* inspired conditions to synthesize biomimetic hydroxyapatite ». *Chemistry of Materials* 22 (12): 3653-63.

Robin, M. 2016. « Etude du front de minéralisation du tissu osseux et des modèles biomimétiques associés ». Chimie thérapeutique. Université Pierre et Marie Curie – Paris VI. Français. NNT : 2016PA066635. Tel-01907278v2.

Wang Y. 2012. « Elaboration de modèles collagène/apatite pour l'étude de la biominéralisation du tissu osseux ». Matériaux. Université Pierre et Marie Curie – Paris VI. Français. NNT : 2012PAO66484. Tel-00839469.

Wang Y., T. Azaïs, M. Robin, A. Vallée, C. Catania, P. Legriel, G. Pehau-Arnaudet, F. Babonneau, M.-M. Giraud-Guille, et N. Nassif. 2012. « The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite ». *Nature Materials* 11 (8) : 724-33.

Wang Y., J. Silvent, M. Robin, F. Babonneau, A. Meddahi-Pellé, N. Nassif, et M. M. Giraud Guille. 2011. « Controlled collagen assembly to build dense tissue-like materials for tissue engineering ». *Soft Matter* 7 (20): 9659-64.

Woodhead-Galloway J. 1982. « Collagen: the anatomy of a protein ». *The Institute of Biology's Studies in Biology* 117: 64.

Conclusion générale

L'objectif de ce travail de thèse était de pouvoir structurer en 3D les phases cristal-liquides du collagène *in vitro* afin de pouvoir reproduire l'organisation suprafibrillaire de l'os à l'échelle du tissu osseux cortical et trabéculaire et d'identifier les paramètres physico-chimiques impliqués dans la formation de ces architectures.

Dans les précédents travaux menés au laboratoire, la reproduction du contre-plaqué torsadé à l'échelle de la microstructure a été réalisée localement par un procédé combinant la dialyse inverse et l'injection continue (FR 2960439/WO 2011151587). Ce procédé nous a permis ici dans un premier temps de vérifier en présence de contraintes (réseau de billes de verre ou de fibres de nylon) notre hypothèse de travail quant à l'implication du confinement et du flux sur l'organisation tridimensionnelle des domaines anisotropes.

Dans un second temps, les travaux menés sur le diagramme de phase du collagène (Giraud-Guille et Besseau 1998 ; Salameh *et al.* 2020) et la préparation de solutions acido-solubles de collagène par spray-dring (Lama *et al.* 2020), nous ont permis de pouvoir étudier, de manière reproductible, la formation des domaines cristal-liquides en contrôlant la concentration initiale en collagène.

Ainsi, nous avons d'abord mis en place des modèles microfluidiques dont le réseau de plots mime les unités cylindriques de l'os cortical (*i.e.* ostéons). Ce modèle visait à appliquer des contraintes géométriques sur les mésophases du collagène afin de pouvoir contrôler la distribution spatiale des domaines orientés. Différents facteurs physico-chimiques ont été étudiés par le biais de ces chambres microfluidiques tels que le confinement, la distance inter-plots, la géométrie des plots, la cinétique en faisant varier la concentration initiale de la solution acido-soluble de collagène, l'état de surface et la présence de précurseurs de la phase minérale d'hydroxyapatite. De manière intéressante, nous avons pu observer que le confinement des molécules de collagène menait à la formation de textures de biréfringence présentant une répétabilité à grande échelle. Les études en microscopies ont montré la présence de défauts d'organisations dans nos matrices comparables à ceux de nos échantillons d'os de référence et qui s'apparentent à des défauts topologiques de cristaux liquides. Ces observations renforcent l'hypothèse d'Yves Bouligand sur l'implication d'analogues biologiques cristal-liquides dans les processus de morphogénèses (Bouligand 1972 et 2008).

Après les études de notre modèle en présence de collagène, nous avons minéralisé la matrice dense de collagène par co-précipitation en présence des précurseurs d'hydroxyapatite selon un procédé décrit précédemment qui mène au coalignement collagène/apatite comme observé dans le tissu osseux (Wang *et al.* 2012). Les caractérisations de cette matrice ont montré que la présence des précurseurs d'hydroxyapatite favorise une distance interfibrillaire plus faible que dans les échantillons non minéralisés, ce qui converge avec les échantillons d'os décalcifiés de référence et la littérature (Landis *et al.* 1990 ; Fratzl *et al.* 1992). Notre objectif de reproduire la structure de l'os compact à plus grande échelle sans cellules par un biais physico-chimique est donc validé.

En parallèle, l'approche visant à utiliser un procédé qui combine collagène et huile de coprah (émulsion/porogène) mimant l'interface hydrophile/hydrophobe du système « tissu osseux-moelle osseuse de l'os trabéculaire » a mené à la formation de porosité mais n'a pas permis de reproduire le réseau de macropores osseux interconnectés. Néanmoins, les résultats n'excluent pas qu'un tel mécanisme de la moelle osseuse puisse jouer un rôle dans la formation de la porosité de l'os trabéculaire. Notamment, si on prend en considération que l'épaisseur moyenne des trabécules est compatible avec celle de la distance interostéons de l'os cortical (~200 µm), l'analogie nous semble trop forte pour exclure un effet de confinement. Ces approches nous semblent donc encore pertinentes, et il serait intéressant de pouvoir élaborer des matrices de collagène denses et fibrillaires présentant une macroporosité à l'aide de microparticules et de traitements n'altérant pas la nature du collagène.

Pendant ce travail de thèse, les microscopies optiques et électroniques se sont révélées des techniques indispensables pour caractériser l'organisation tridimensionnelle des domaines anisotropes au sein de nos matrices de collagène. Ces techniques ont apporté des informations pertinentes quant à la distribution spatiale des domaines anisotropes et à l'étude des défauts topologiques dans nos matrices et nos échantillons d'os de référence.

D'un point de vue personnel, ce travail de thèse contraste entre une idée initiale simple et la complexité d'une étude à l'interface entre plusieurs domaines de recherche (chimie, physico-chimie, biologie). De cette interdisciplinarité est née une multitude d'obstacles de différente nature comme (i) le contrôle de phases cristal-liquides du collagène en 3D car rappelons que l'ensemble des travaux dans la littérature sont effectués avec du collagène peu concentré ou des échantillons en 2D, (ii) l'assimilation de la terminologie et des travaux pertinents de la littérature des différents domaines de sciences (microfluidique, chimie des polymères, propriétés de surface, biominéralisation, etc.), et bien sûr (iii) les aléas techniques et expérimentaux qu'il a su falloir palier communs à chaque thèse mais qui dans mon cas ce sont ajoutés à deux périodes de confinements. Néanmoins, ces difficultés franchies m'ont permis d'élaborer des modèles biomimétiques de l'os pertinents qui semblent confirmer notre hypothèse de départ sur l'implication de facteurs physico-chimiques dans les processus de morphogénèses des tissus biologiques.

Même si la compréhension des mécanismes de morphogénèse du tissu osseux est loin d'être complète, ces systèmes mis en place dans mon travail de thèse peuvent être utilisés pour de nouvelles études sur la biominéralisation du tissu osseux.

Ces modèles donnent également accès à l'étude d'autres paramètres physico-chimiques que nous n'avons pas étudiés dans ce manuscrit tels que l'effet de la force ionique des précurseurs minéraux et l'effet d'une géométrie aléatoire (diamètre et hauteur des plots et distance inter-plots) pour reproduire ce qui est observé *in vivo*. Il aurait été également pertinent de pouvoir étudier nos modèles en termes physico-chimiques afin d'établir des données d'hydrodynamisme, de viscosité, etc. en fonction des différentes organisations observées. Enfin, il serait pertinent d'effectuer des études de différenciation cellulaire sur les réseaux formés pour étudier l'effet de ces arrangements suprafibrillaires sur l'activité cellulaire.

Bien entendu, beaucoup d'autres questions restent en suspens après cette thèse quant à l'étroite association des cellules et des phénomènes physico-chimiques lors des processus de formation du tissu osseux. L'observation des défauts d'organisations dans nos échantillons et le tissu biologique suscitent de nombreux questionnements : ces défauts sont-ils issus du remodelage osseux ou sont-ils primo-formés ? Les cellules peuvent-elles créer localement ces défauts ? Les défauts sont-ils à l'origine de l'organisation en contre-plaqué torsadé de la phase organique du tissu osseux ? Quel est le rôle du réseau ostéocytaire ? Y-a-t'il un effet de cisaillement à cette échelle ? etc.

En conclusion, ce travail de thèse apporte un œil nouveau sur les mécanismes physico-chimiques intégrés dans la morphogénèse des tissus osseux. Ce travail permet de renforcer l'idée forte de l'existence de phases cristal-liquides *in vivo*. En parallèle de cet aspect fondamental, il ouvre aussi la voie sur une recherche plus appliquée (**Annexes**) par l'élaboration de biomatériaux en 3D biomimétiques de l'os pour favoriser l'ostéoinduction dans un contexte d'ingénierie tissulaire ; l'os autologue étant encore considéré comme le « gold standard ». Ceci est d'autant plus pertinent que les matrices denses de collagène minéralisées ont montré un comportement similaire à celui de l'os autologue dans un contexte de petit défaut osseux chez la brebis (travaux non publiés).

Références bibliographiques de l'Introduction Générale

Bouligand, Y. 1972. « Twisted Fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases ». *Tissue and Cell* 4 (2): 189-217.

Bouligand, Y. 2008. « Liquid crystals and biological morphogenesis: ancient and new questions ». *Comptes Rendus Chimie* 11 (3): 281-96.

Giraud-Guille M-M., et Besseau L. 1998. « Banded patterns in liquid crystalline phases of type I collagen: relationship with crimp morphology in connective tissue architecture ». *Connective Tissue Research* 37 (3-4): 183-93.

Lama M., F. M. Fernandes, A. Marcellan, J. Peltzer, M. Trouillas, S. Banzet, M. Grosbot, et al. 2020. « Self-assembled collagen microparticles by aerosol as a versatile platform for injectable anisotropic materials ». *Small* 16 (4): 1902224.

Landis, W. J., J. Moradian-oldak, et S. Weiner. 1991. « Topographic imaging of mineral and collagen in the calcifying turkey tendon ». *Connective Tissue Research* 25 (3-4): 181-96.

Salameh C., F. Salviat, E. Bessot, M., J.-M. Chassot, E. Moulongui, Y. Wang, et al. 2020. « Origin of transparency in scattering biomimetic collagen materials ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (22): 11947-53.

Wang Y., T. Azaïs, M. Robin, A. Vallée, C. Catania, P. Legriel, G. Pehau-Arnaudet, F. Babonneau, M.-M. Giraud-Guille, et N. Nassif. 2012. « The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite ». *Nature Materials* 11 (8): 724-33.

Wang Y., J. Silvent, M. Robin, F. Babonneau, A. Meddahi-Pellé, N. Nassif, et M. M. Giraud Guille. 2011. « Controlled collagen assembly to build dense tissue-like materials for tissue engineering ». *Soft Matter* 7 (20): 9659-64.

Annexes

Tables des matières des Annexes

Annexes 271

I. Planches de suivi des chambres microfluidiques 273

II. Travaux annexes 280

1. Matériaux hybrides collagène-apatite 281
2. Matrices de collagène transparentes 284

I. Planches de suivi des chambres microfluidiques

Dans le cadre des suivis in situ des textures de biréfringence observées dans les chambres microfluidiques, il m'a semblé pertinent de mettre en avant l'évolution des systèmes de t=0 à t=J+3 pour chaque paramètre physicochimique étudié sur un réseau de plots plus grand.

Les mêmes observations sont effectuées que dans le **Chapitre 3** :

- La cinétique est plus rapide lorsque l'on part d'une concentration initiale en collagène plus élevée (*Figure 1 et Figure 2*).
- L'interdistance de plots de 200 µm (*Figure 2*) mène à l'observation de textures de biréfringence similaires à celles observées dans les ostéons (Giraud-Guille 1988) tandis que pour une interdistance de plots de 240 µm (*Figure 3*), les domaines cristaux-liquides observés sont intercalés par la présence de domaines isotrope indiquant que cette distance interplots est trop grande pour étudier un effet du confinement dans les conditions expérimentales choisies.
- L'étude de l'état de surface par traitement plasma (*Figure 4*) démontre que la répétition des textures de biréfringence observées est modifiée par l'ancrage des molécules de collagène à la surface du PDMS.
- L'ajout des précurseurs de la phase minérale de l'os n'induit pas de différences de textures de biréfringence observées en lumière polarisée (*Figure 5*).
- L'effet de la géométrie induit du désordre local dans les textures de biréfringence observées (*Figure 6*).

Un exemple de suivi des textures de biréfringence par PolScope est également donné en *Figure 7*.

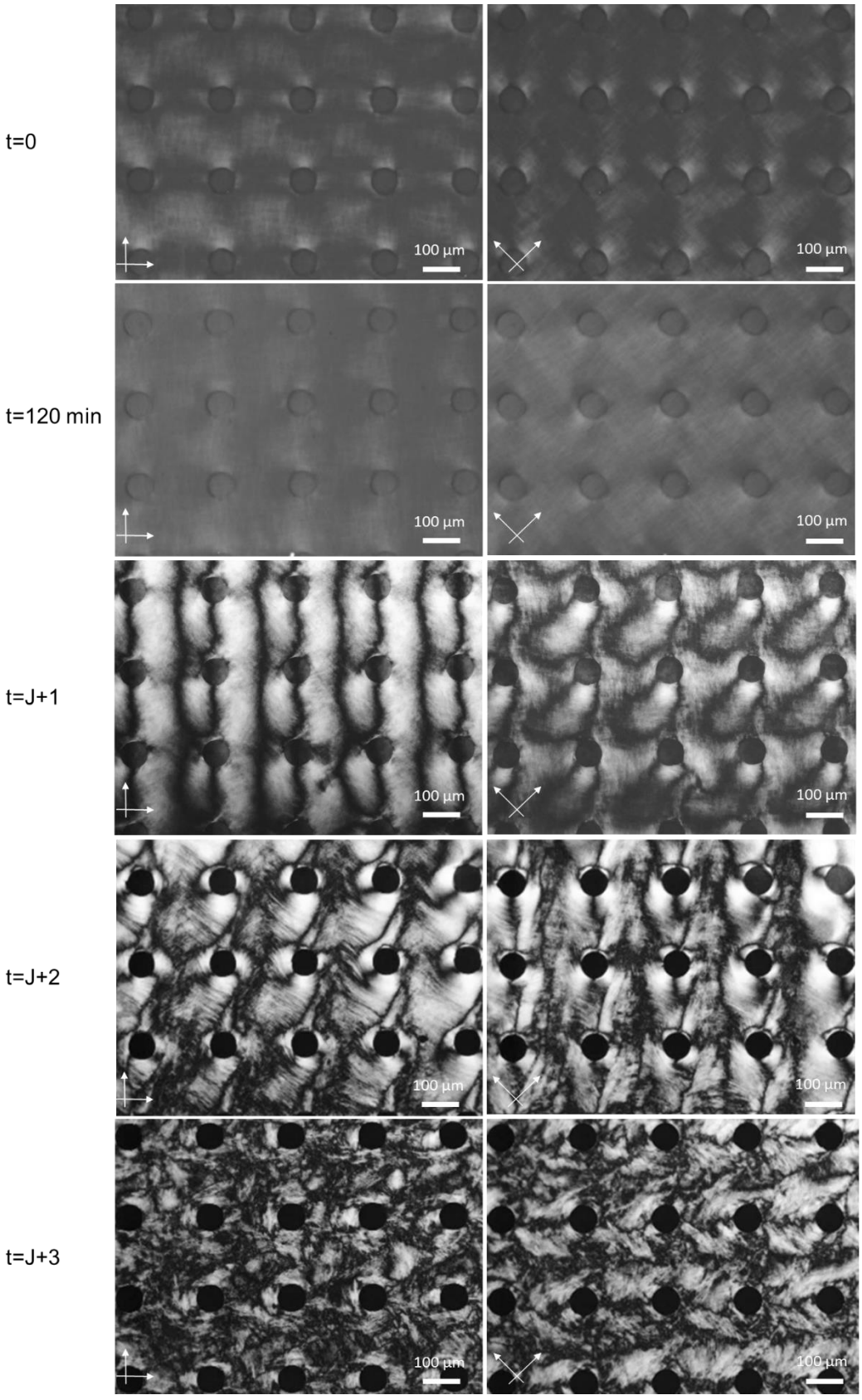


Figure 1 : Clichés en MOLP de Coll/200/6,5% à différents temps d'observations

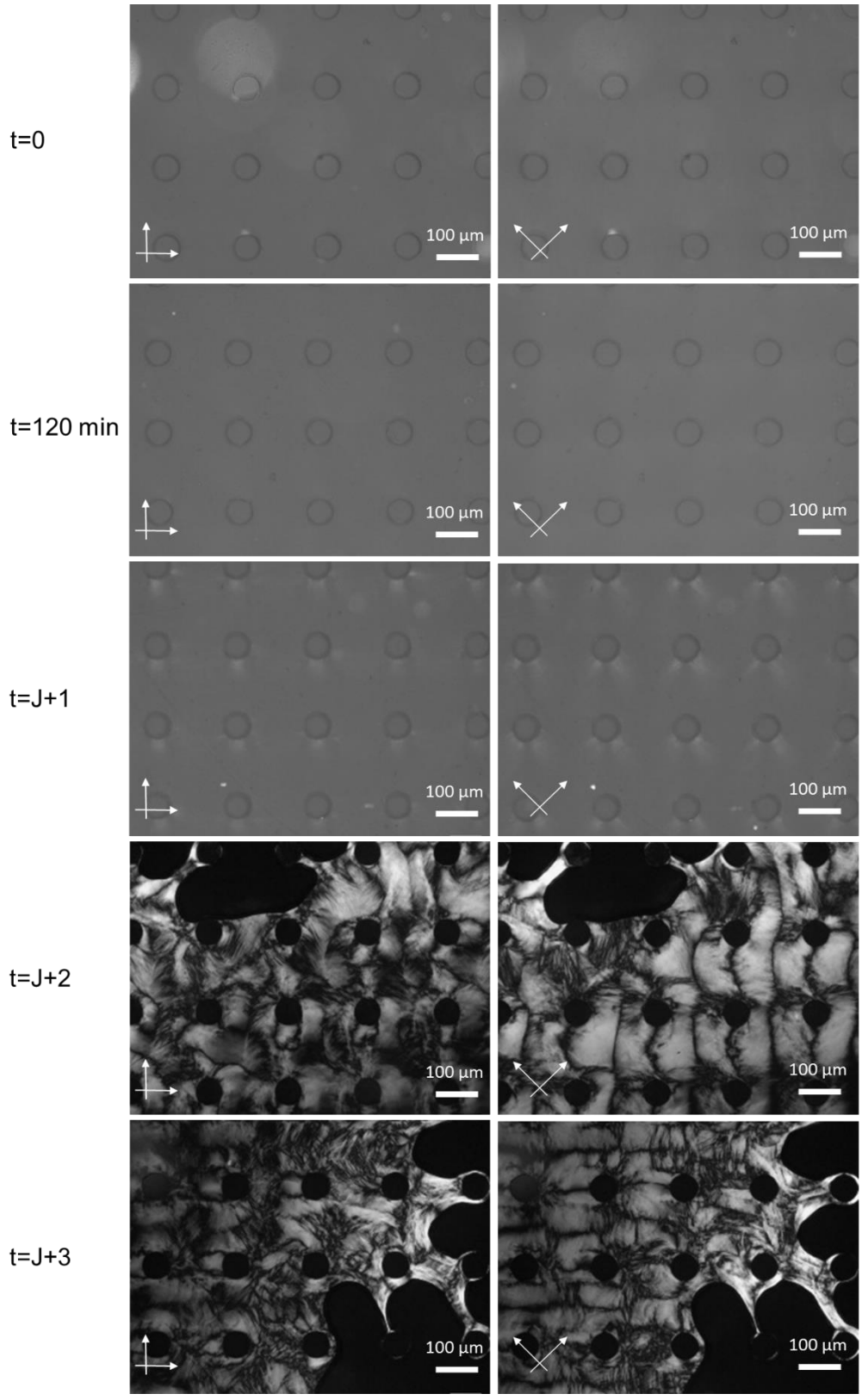


Figure 2 : Clichés en MOLP de Coll/200/4% à différents temps d'observations.

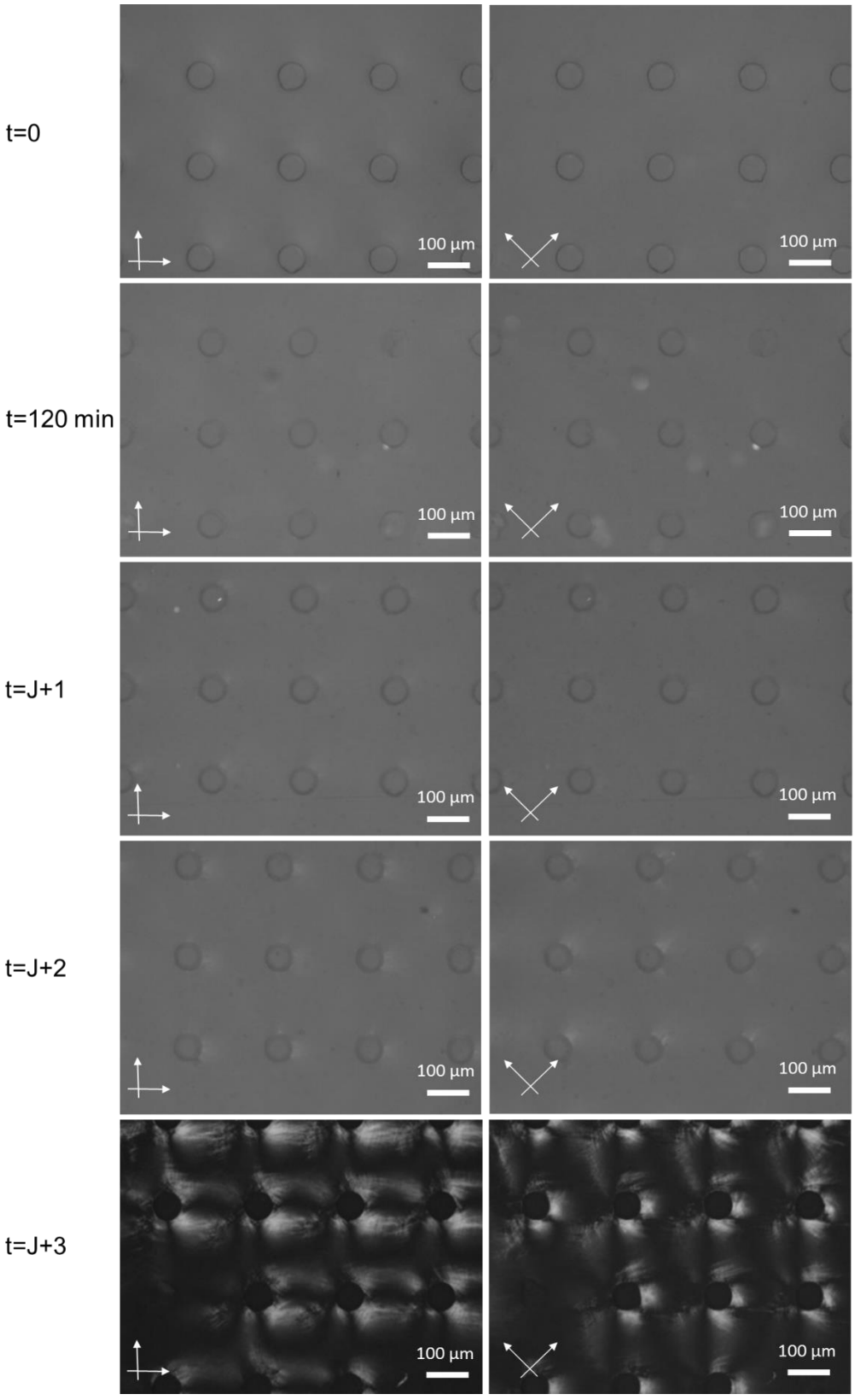


Figure 3 : Clichés en MOLP de Coll/240/4% à différents temps d'observations.

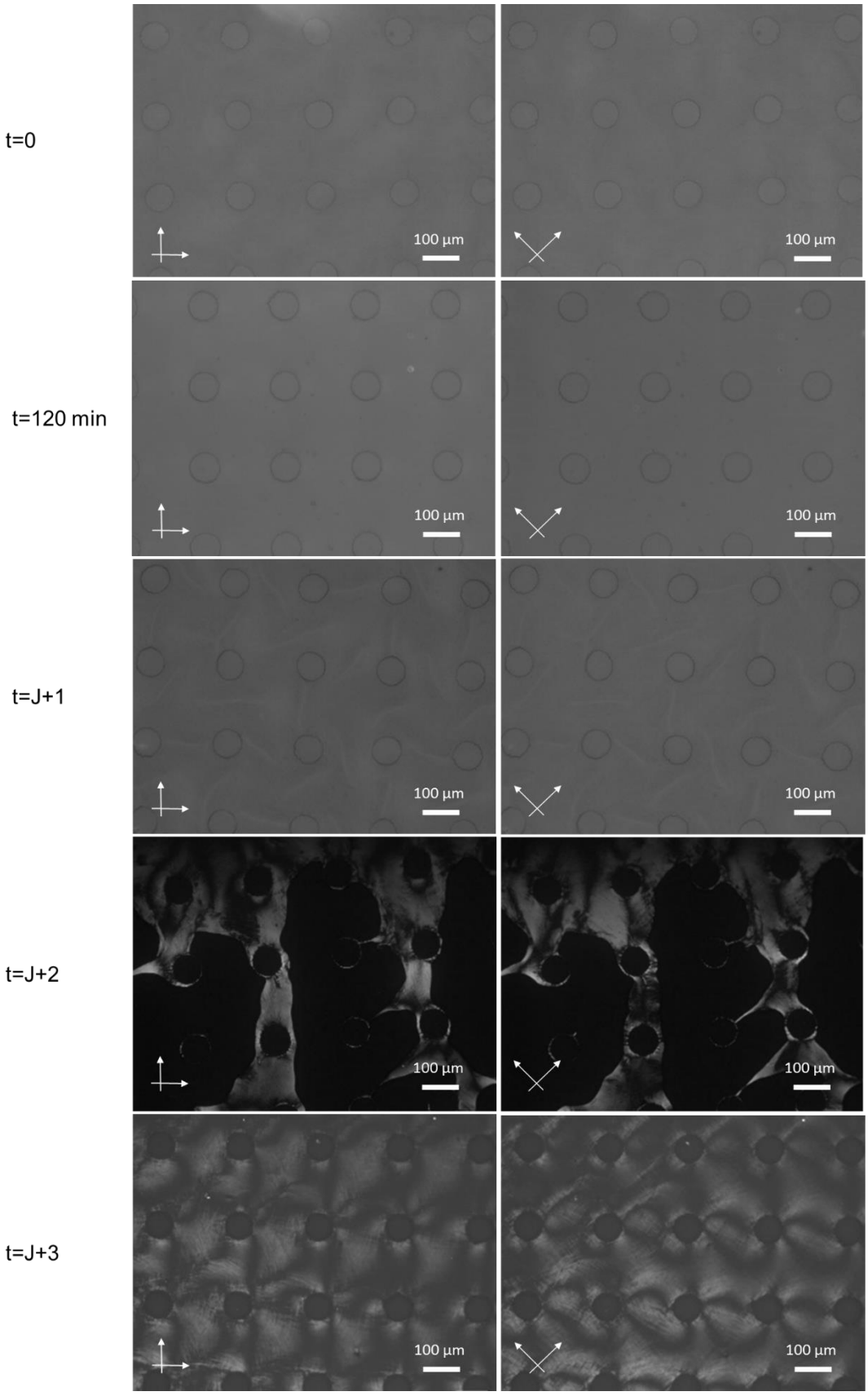


Figure 4 : Clichés en MOLP de Coll/200/4%/P à différents temps d'observations.

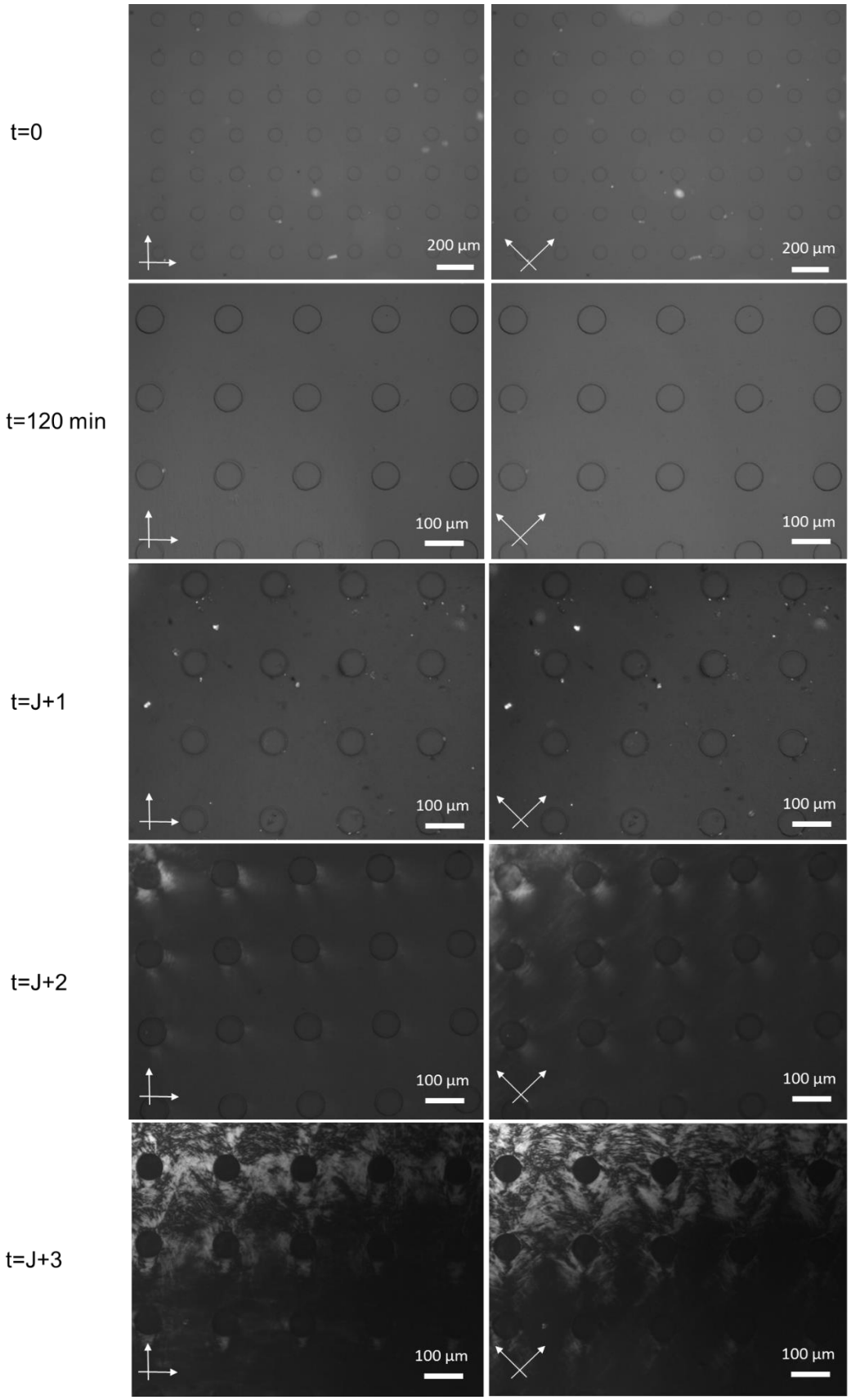


Figure 5 : Clichés en MOLP de Coll/200/4%/HA à différents temps d'observations

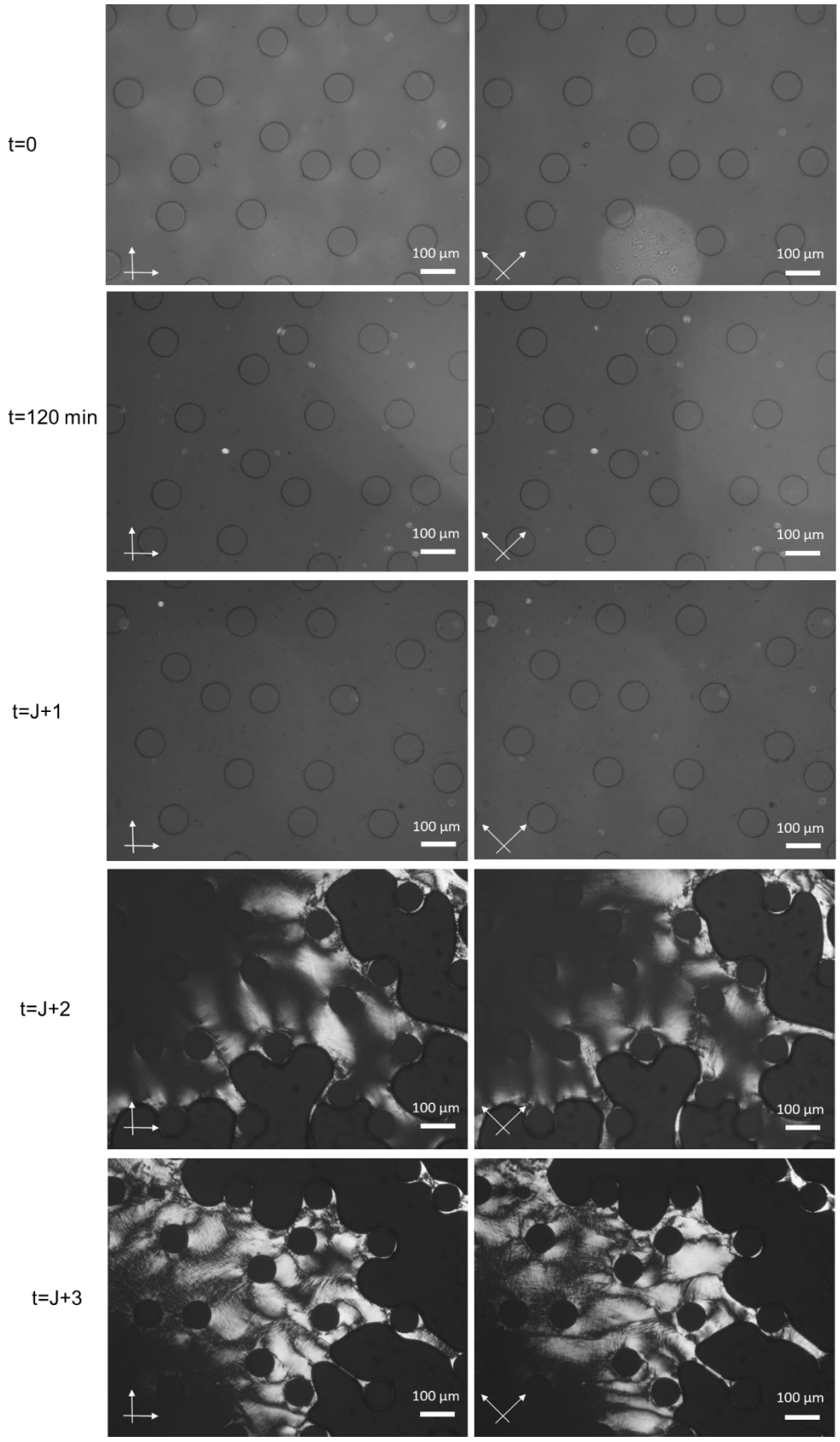


Figure 6 : Clichés en MOLP de Coll/penrose/4%/P à différents temps d'observations.

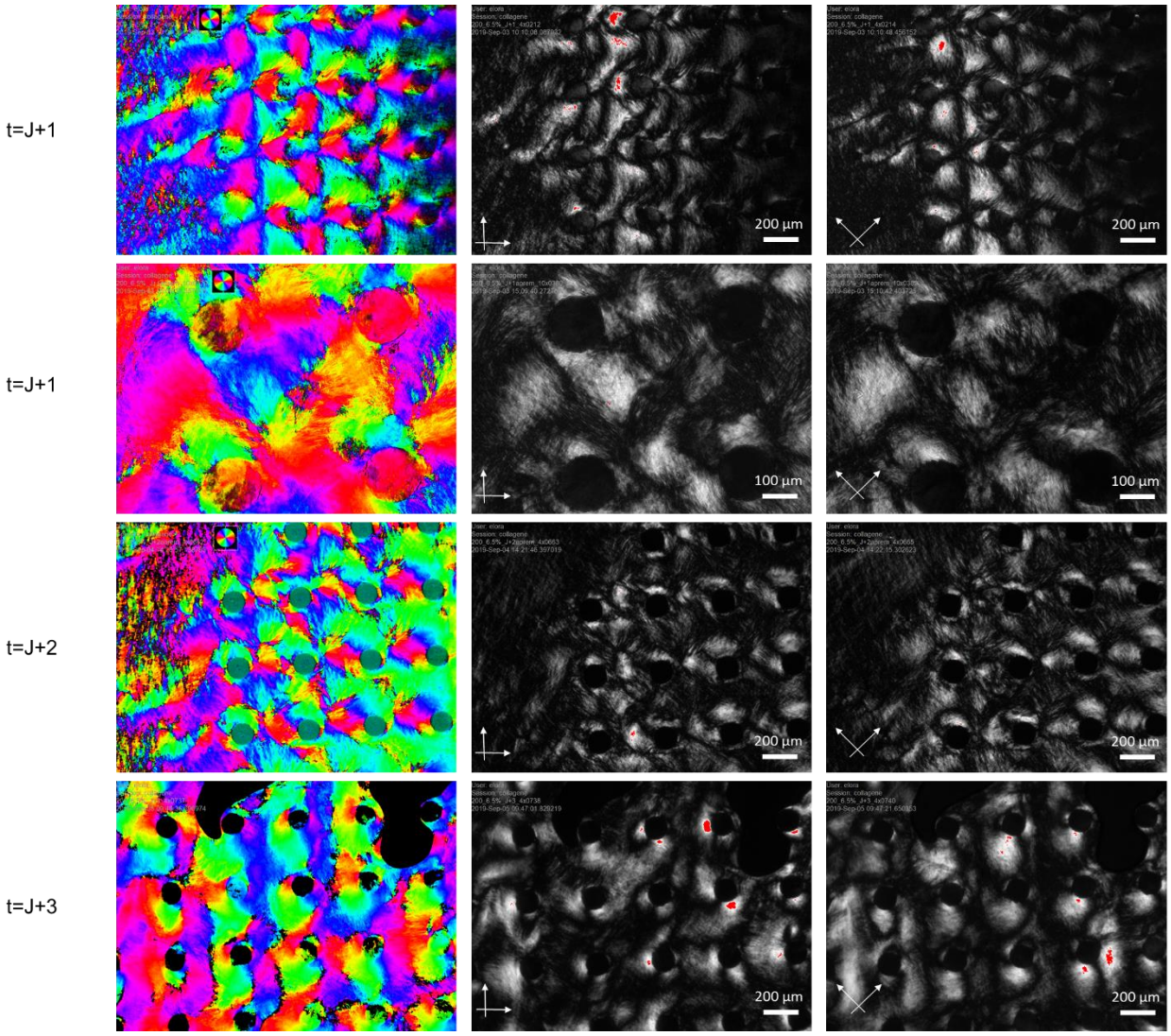


Figure 7 : Clichés en PolScope de Coll/200/6,5% à t=J+1, J+2 et J+3. (Gauche) les mesures d'azimuth et de retardance, (milieu) (droite) clichés obtenus en polarisation classique. Les tâches rouges correspondent à une trop forte biréfringence.

II. Travaux annexes

Lors de mes travaux de stage de Master 2 et de thèse, j'ai eu l'occasion de participer à de nombreux projets de Recherche. J'ai ainsi pu travailler sur des travaux en parallèle de mon sujet de thèse principal. Ces travaux sont complémentaires de mon sujet d'un point de vue thématique (collagène, biominéralisation, implantations).

1. Matériaux hybrides collagène-apatite

Lors des travaux de thèse de M. Lama (Thèse de M. Lama 2019), cette dernière a cherché à étudier la possibilité d'injecter des solutions acido-solubles concentrées (> 40 mg/mL). La stratégie mise en place dans son travail a été de pouvoir contourner les problèmes liés à la viscosité du collagène, qui augmente de concert avec sa concentration, en formant des microparticules de collagène par spray-drying (Lama *et al.* 2020). Des modèles *in vitro* de défauts tissulaires ont été élaborer afin d'étudier si (i) l'organisation tridimensionnelle du collagène est biomimétique du tissu visé, (ii) les propriétés mécaniques sont semblables à celle du tissu biologique et (iii) la nature des réponses cellulaires (adhésion, colonisation, croissance, différenciation) vis-à-vis de la matrice de collagène formée.

Dans un même objectif d'implantation dans un site osseux, la technologie mise en place par M. Lama a été associée à la synthèse de poudre d'hydroxyapatite biomimétique établie précédemment au laboratoire (Nassif *et al.* 2010). Dans ce cadre, j'ai pu reproduire la synthèse de ces poudres d'hydroxyapatite, que j'ai caractérisé par RMN à l'état solide et DRX.

Par diffraction des rayons X sur poudre (*Figure 8*), aucune phase de phosphate de calcium autre que l'hydroxyapatite n'a pu être identifiée sur nos diffractogrammes et ce quel que soit la poudre synthétisée.

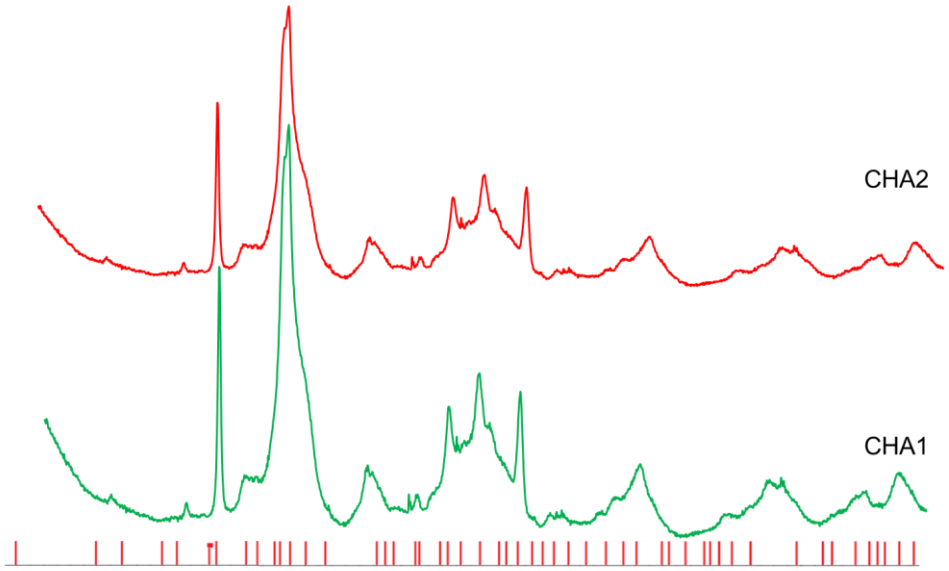


Figure 8 : Comparaison des diffractogrammes de CHA1 et CHA2 avec la fiche JCPDS 00-009-0432 correspondant à l'hydroxyapatite hexagonale.

Les spectres ^{31}P obtenus par RMN à l'état solide des différentes poudres synthétisées sont présentées dans la *Figure 9*. Un signal centré sur 2,8-2,9 ppm correspond à une valeur de déplacement chimique caractéristique de l'hydroxyapatite. La largeur à mi-hauteur des pics correspondant à des apatites carbonatées, qui indique la présence d'un environnement chimique plus dense sur les sites phosphates. Une légère pollution à l'OCP (*) est visible par l'élargissement des pics.

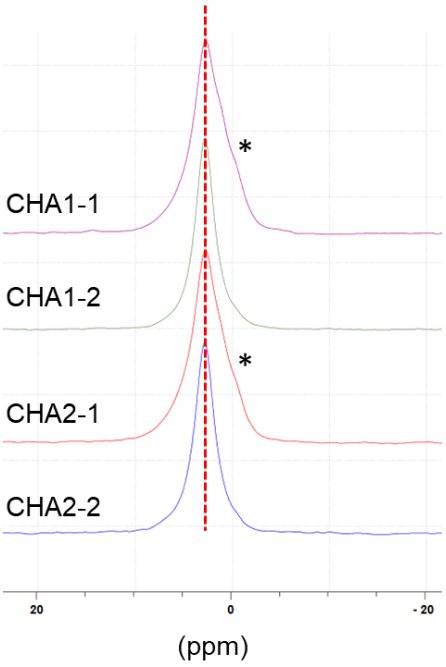


Figure 9 : Spectres RMN ^{31}P MAS des apatites CHA1 et CHA2 (B_0=7,0 T ; γ_{MAS} = 121 kHz).

Des implantations en site intra-musculaire chez le rat ont été effectuées en utilisant ces poudres. Les résultats obtenus avec ce nouveau matériau collagène/apatite hybride injectable, dont la microstructure mime celle du tissu osseux, ont été comparés à ceux d'une matrice dense collagène/apatite non-injectables. Le but du projet était d'évaluer les propriétés ostéoinductrices de ces deux matériaux (implanté ou injecté), c'est-à-dire, leur capacité à recruter et activer des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) de l'hôte provenant de tissus non-osseux environnants et à les différencier en ostéoblastes, capables de former du tissu osseux. Dans ce cadre, j'ai effectué la synthèse des matrices collagène/apatite implantées. Les résultats sont encore confidentiels car un brevet est en cours de dépôt, néanmoins un article, où je suis donc impliquée, est en cours de préparation.

2. Matrices de collagène transparentes

J'ai eu l'occasion lors de mon stage de Master 2 de travailler sur la mise en évidence d'une nouvelle phase précholestérique, notée P*. Ces études rentraient dans le cadre du post-doctorat de C. Salameh. De façon intéressante, la précipitation des fibrilles de collagène à partir d'une telle mésophase a mené à la formation de matrices transparentes. Dans ce cadre, ainsi pu caractériser ces matrices par MEB et par tomographie de cohérence optique (OCT) dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut Langevin. La microstructure de nos matériaux a pu être mise en analogie avec un tissu biologique, la cornée. Ce travail a mené à la publication d'un article joint ci-après : Salameh C., F. Salviat, **E. Bessot**, M., J.-M. Chassot, E. Moulongui, Y. Wang, *et al.* 2020. « Origin of transparency in scattering biomimetic collagen materials ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (22): 11947-53.

Origin of transparency in scattering biomimetic collagen materials

Chrystelle Salameh[a,b,1,2], Flore Salviat[a,b,c,1], Elora Bessot[b], Miléna Lama[b,d], Jean-Marie Chassot[e], Elodie Moulongui[b], Yan Wang[b], Marc Robin[b], Arnaud Bardouil[f], Mohamed Selmane[g], Franck Artzner[f], Alba Marcellan[d], Clément Sanchez[a,b], Marie-Madeleine Giraud-Guille[b], Marco Faustini[b], Rémi Carminati[e], and Nadine Nassif[a,b,e,3]

[a]Collège de France, PSL University, 75231 Paris Cedex 05, France; [b]Sorbonne Université, CNRS, Collège de France, Laboratoire Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP), F-75005 Paris, France; [c]Cornea, External Disorders and Refractive Surgery, Fondation Ophtalmologique Rothschild, 75019 Paris, France; [d]Sciences et Ingénierie de la Matière Molle, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la Ville de Paris (ESPCI) Paris, Paris Sciences et Lettres (PSL) University, CNRS, Sorbonne Université, 75005 Paris, France; [e]Institut Langevin, ESPCI Paris, CNRS, PSL University, 75005 Paris, France; [f]CNRS, Institut de Physique de Rennes, UMR 6251, Université de Rennes, F-35000 Rennes, France; and [g]Institut des Matériaux de Paris Centre, Sorbonne Université, 75252 Paris Cedex 05, France

Edited by Lia Addadi, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, and approved April 10, 2020 (received for review January 21, 2020)

Living tissues, heterogeneous at the microscale, usually scatter light. Strong scattering is responsible for the whiteness of bones, teeth, and brain and is known to limit severely the performances of biomedical optical imaging. Transparency is also found within collagen-based extracellular tissues such as decalcified ivory, fish scales, or cornea. However, its physical origin is still poorly understood. Here, we unveil the presence of a gap of transparency in scattering fibrillar collagen matrices within a narrow range of concentration in the phase diagram. This precholesteric phase presents a three-dimensional (3D) orientational order biomimetic of that in natural tissues. By quantitatively studying the relation between the 3D fibrillar network and the optical and mechanical properties of the macroscopic matrices, we show that transparency results from structural partial order inhibiting light scattering, while preserving mechanical stability, stiffness, and nonlinearity. The striking similarities between synthetic and natural materials provide insights for better understanding the occurring transparency.

collagen | self-assembly | photonic materials | mechanical properties | transparency

Aside from structural colors and pigmentation, and the usual strong scattering generated by biological tissues, optically transparent or translucent organisms are found in nature. They are quite abundant in aquatic environments (e.g., medusa and planktonic organisms) but rare on land (e.g., the butterfly *Greta oto*). The biological role of transparency appears to be related to protection from predators (1–3). The physical basis of biological transparency is not straightforward. Living tissues are heterogeneous at the submicron and micrometer scales, resulting in spatial fluctuations of the refraction index that are expected to produce light scattering. Deciphering the relation between light scattering and the structure of disordered or partially ordered materials is challenging. However, it is a key step in understanding the appearance of transparency in living organisms, and more generally in natural materials.

Among the few reported transparent biological materials, cornea is a connective tissue that forms the front part of the eye. It works as a refracting lens possessing dioptric properties. Light transmission in healthy corneas occurs through the tissue containing collagen fibrils, proteoglycans, and cells, and scattering from collagen is suppressed by interferences induced by partial order in the fibrillar network. Interestingly, disorders opacifying the cornea are a major cause of refractive errors but also blindness (4). Suppression of scattering is generally a key issue encountered at different levels in the mechanism of vision (5). Hence, particular attention has been paid to the distribution of type I collagen, the principal constituent of the corneal stroma, and the link between the fibrillar network and the unexpected high transmittance (6–9).

Collagen type I, a major structural protein in the body, displays an assembled fibrillar organization in numerous connective tissues such as bone, dermis, and cornea. Depending on the tissue, collagen organizes differently, which leads to specific mechanical properties (from hard to soft) and optical properties (from opaque to transparent) (10). For instance, a cholesteric structure is observed in the compact bone that contributes to its mechanical properties (11), while the tendon is composed of unidirectional collagen fibrils (12). For cornea, collagen fibrils organize in a general lamellar orientation with some local plywood forms (4). Hence, an interesting correlation exists between the collagen phase diagram and the tissue ultrastructure, although the occurrence of collagen liquid-crystal (LC) phases was never demonstrated in vivo (13).

In addition to cornea and fish scales (14), transparent collagen matrices were recently reported in natural tissues, elephant ivory (15) and teeth of the deep-sea dragonfish (16), and in synthetic collagen scaffolds (17). Transparency of such heterogeneous

Significance

Disordered materials with heterogeneities at scales ranging from nano- to micrometers usually scatter visible light and become opaque beyond a certain thickness. However, transparent materials are found in nature. The physical origin of transparency in natural and artificial biopolymer materials is still not fully understood. Here, a gap of transparency is found in synthetic fibrillar collagen matrices within a very narrow range of concentration. The transparency results from structural partial order inhibiting light scattering, while preserving mechanical stability, stiffness, and nonlinearity. The potential to produce biomimetic hydrogels with such striking optical properties by self-assembly opens an interesting route in the study of photonic materials and provides new elements in the understanding of the appearance of transparency in natural materials.

Author contributions: N.N. designed research; C. Salameh, F.S., E.B., M.L., J.-M.C., E.M., Y.W., M.R., A.B., M.S., A.M., M.F., and N.N. performed research; C. Salameh, F.S., E.B., M.L., J.-M.C., F.A., A.M., C. Sanchez, M.-M.G.-G., M.F., R.C., and N.N. analyzed data; and C. Salameh, F.S., M.L., J.-M.C., F.A., A.M., R.C., and N.N. wrote the paper.

The authors declare no competing interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Published under the PNAS license.

[1]C. Salameh and F.S. contributed equally to this work.

[2]Present address: Institut Européen des Membranes (IEM), UMR 5635, Univ Montpellier, CNRS, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier (ENSCM), 34095 Montpellier, Cedex 5, France.

[3]To whom correspondence may be addressed. Email: nadine.nassif@sorbonne-universite.fr.

This article contains supporting information online at https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2001178117/-/DCSupplemental.

Downloaded at Akademiska Sjukhuset on May 19, 2020

complex materials remains an intriguing property. It can be present in different degrees, measured by the optical thickness L/ℓ, with L the sample thickness and ℓ the scattering mean free path, the latter being the average distance a photon travels between subsequent scattering events. Understanding whether transparency (L/ℓ << 1) results from a change in the intrinsic parameter ℓ, correlated to the microstructure, or merely from a small physical thickness L of the observed sample, is crucial. To quantitatively address this issue, it is important to shape the collagen matrices into a design permitting a measurement of ℓ independently of the physical thickness L.

Here, we report on the existence of a transparent domain in the phase diagram of fibrillar collagen, observed in a narrow range of concentration. Below and above this transparency gap, scattering increases substantially. The stability of the matrices over time made it possible to produce three-dimensional (3D) collagen materials up to 1 cm in thickness by different processes. This ensures that a change in transparency is linked to a change in the scattering mean free path ℓ, thus revealing a change in the matrix ultrastructure that depends on the collagen concentration. Around the critical concentration producing the gap in transparency, the material exhibits locally the corneal collagen microstructure, together with optical and mechanical features close to that of real corneas. Before the fibrils' precipitation (fibrillogenesis in vitro), a metastable LC phase with facets ordered into a 3D network forms between the nematic and the precholesteric phases in the lyotropic molecular collagen diagram. The optical microscopy of this phase recalls the DNA precholesteric phase (18) which exhibits a 3D orientational order (19) similar to that observed in transparent decalcified elephant ivory (15). This observation strengthens the hypothesis of the existence of biological LC analogs (20). The resulting 3D fibrillar transparent matrix may be of interest for studying the relationship between the materials structure and the occurring transparency, which remains difficult to assess with natural corneas, for example (21–23), but also for developing keratoprosthesis models. Finally, our understanding of transparency may provide a new approach to the design of photonic materials manufacturable using self-assembly processes.

Collagen Concentration Gradient and Gap in Transparency

Two types of matrices were prepared, characterized by gradient in collagen concentration ranging from ~20 to ~100 mg/mL. For this purpose, two setups were used: 1) the continuous injection/reverse dialysis process (*Methods* and *SI Appendix, Extended Supporting Methods*) described previously for preparing pure or composite materials (24, 25) (Fig. 1*A*) and 2) the evaporation process (26) (*SI Appendix*, Fig. S1) but without homogenization of the acidic collagen solution. A gap of transparency was observed for both matrices after the fibrils' precipitation (Fig. 1*A* and *SI Appendix*, Fig. S1, arrows). Nevertheless, a slight difference in terms of opacity was observed between the two samples. Noticeably, the thicker material (i.e., 1 cm large) synthesized by injection/reverse dialysis was more opaque. The collagen concentration in the transparent domain was determined from quantifying the amount of hydroxyproline by titration. The same concentration was found whatever the process adopted (evaporation or continuous injection/reverse dialysis), which was around 45 mg/mL. Such a gap of transparency found in the fibrillar collagen diagram appears quite counterintuitive since the increase in collagen concentration leads to an increase in fibrillar density and order: the isotropic/anisotropic transition occurring slightly above 40 mg/mL (27). An increase in density and ordering are competing mechanisms that can lead to a suppression of scattering and the appearance of transparency beyond a given concentration threshold. Here, the recovery of opacity at even larger densities, and therefore the nonmonotonic behavior of the scattering mean free path versus concentration, proves the crucial role of the ultrastructure on the optical properties.

This is easily highlighted as follows. A diluted soluble-acidic collagen (2 mg/mL) was concentrated by a slow evaporation (26–28) up to 45 mg/mL. This technique permits an accurate estimation of the concentration during evaporation by simple weighing. The fibrillar collagen matrix in the Petri dish is shown in Fig. 1*B*, red asterisk. A part of the collagen matrix has been removed locally (area 1) to demonstrate the presence of a transparent matrix in the Petri dish. Area 2 shows a fibrillar collagen matrix where a shear stress was applied using a spatula before fibrillogenesis in vitro. This area becomes opaque after the precipitation of the fibrils, indicating a change in the material's properties. The collagen concentration's being above 40 mg/mL, this should be due to the destabilization of the LC geometry. This observation clearly shows that, in addition to the collagen density, the ultrastructure is of primary importance for the occurring transparency.

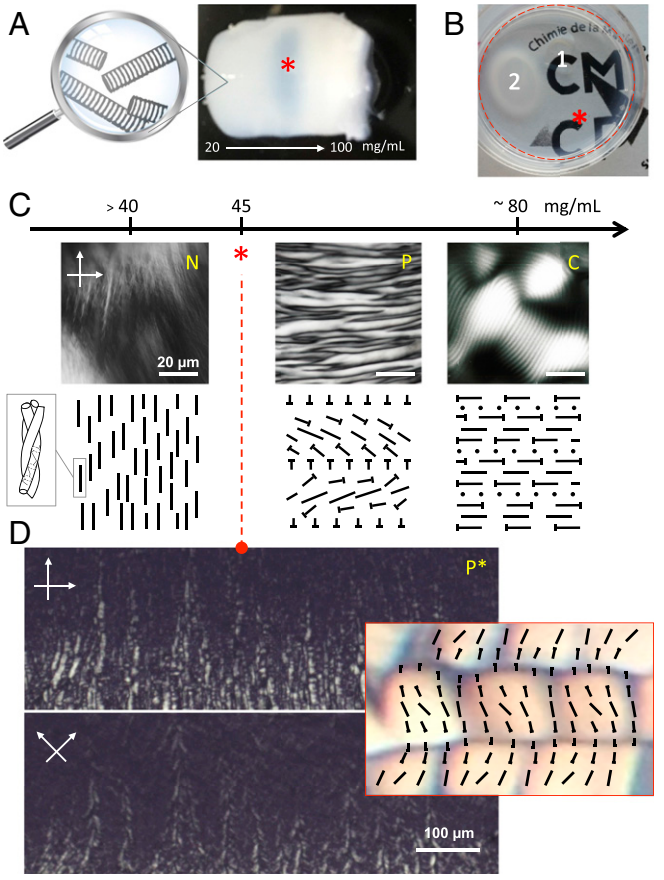


Fig. 1. Optical relationships between collagen fibrillar gradient and LC phase diagram. Images of a fibrillar collagen matrices (*A* and *B*). (*A*) The matrix is characterized by a gradient in concentration (20 to 50 to 100 mg/mL range) and exhibits a gap of transparency. (*B*) The matrix (red asterisk) which is delimited by the red dotted circle is fully transparent in the Petri dish; the final concentration of collagen is ~45 mg/mL. Two other areas are observed: 1 is vacant and 2 is opaque after shearing. (*C*) Classical collagen phase diagram (scheme and polarized optical micrograph) from nematic (N) to cholesteric (C) observed between crossed polarizers (0 to 90°). Segments are molecules in the section plane; dots are molecules normal to this plane; nails are molecules in oblique position with the head representing the molecular extremity pointing toward the observer. The collagen phase diagram is implemented with a new precholesteric phase (P*) for which concentration is found around 45 mg/mL. For the P*, the birefringent texture appears as cubic platelets (*D*). This faceted pattern is still observed after a 45° polarizer rotation; the organization of collagen molecules for P* is presented schematically in the red framed image at higher magnification (*SI Appendix*, Fig. S2 *A* and *B*). The precholesteric phase (P) occurs by increasing the collagen concentration in the solution.

Downloaded at Akademiska Sjukhuset on May 19, 2020

The phase diagram of collagen molecules has been extensively studied (29) (Fig. 1*C*) and exhibits three arrangements: nematic (above 40 mg/mL) (N in Fig. 1*C*), precholesteric (P in Fig. 1*C*), and cholesteric (above ∼75 mg/mL) (27) (C in Fig. 1*C*). None of them was described to lead to transparent collagen materials, although thermotropic nematic liquid crystals tend to be relatively translucent (liquid-crystal displays).

The fact that the physical properties recorded on the transparent matrices remain similar whatever the source of collagen (the porcine clinical grade and the one extracted from rat tails tendons; *SI Appendix*, *Extended Supporting Methods*) ensured that the concentration protocols are 1) reproducible for generating the transparency and 2) that geometry, at a certain collagen concentration, is the key factor for the matrix transparency. Previous work in the literature described the formation of transparent but very thin collagen matrices (30, 31) for which the transparency appears stable at acidic pH (3.5) and is only related to a specific ionic strength, thus rendering comparison with our work difficult.

Further investigations of the collagen phase diagram were done handling the solutions with care. For this purpose, an acidic solution of collagen concentrated at 40 mg/mL was deposited between slide and coverslip and studied by polarized light microscopy, the concentration of collagen occurring at the air/solution interface through a slow evaporation of solvent. The evaporation of solvent being not homogeneous over the drop, the precise concentrations remain uncertain. Acidic collagen solutions with a 2-mm thickness are transparent under ∼100 mg/mL (32). As expected, first a nematic phase is observed where the molecules orient themselves in the same direction (Fig. 1*C*, N). Second, when we slowly evaporate the collagen solution reaching 44 mg/mL, a facetted pattern starts to appear (Fig. 1*D* and *SI Appendix*, Fig. S2) with the presence of stripes in some domains (*SI Appendix*, Fig. S2 *A* and *B*). The facets are polydisperse in size and organize mostly as a mosaic (*SI Appendix*, Fig. S2 *C*–*C*′). Nevertheless, the bigger ones locally arrange in layers reminding the fibrillar collagen arrangement in mice corneal stroma (33) and coelacanth scales (14). The facetted organization of collagen molecules seems different from the "staggered dots" texture described previously in the literature for collagen since it was observed over the cholesteric phase (34) and not related to any optical property. Finally, controlling the sample thickness and the conditions of observations (temperature, humidity, and time under the microscope light) slowed down its systematic transformation into the most common precholesteric phase with a "banded" structure but did not avoid it (*SI Appendix*, Fig. S2*D*). Note that a color phase possessing a filament texture was sometimes observed (35) (*SI Appendix*, Fig. S3*A*), but only with the highly purified clinical-grade collagen (*SI Appendix*, Fig. S3*B*). The transition between the nematic and the precholesteric phases occurs around 46 to 47 mg/mL. The fact that the mosaic phase appears in a very narrow range of concentrations (∼44 to 45 mg/mL) may explain why it was never identified before. Interestingly, after a 45° polarizer rotation, some vertical areas (Fig. 1*D*) remain gray, indicating a vanishing birefringence, while the intensities of areas within these lines are very sensitive to the cross-polarizer orientation. Note that with one polarizer blue and brownish colors were observed, remaining unchanged locally when the stage was rotated (*SI Appendix*, Fig. S2*B*). Such observations indicate a 3D orientational order that has been characterized in blue phases of chiral thermotropic liquid crystals (36) and shortened lyotropic double-stranded DNA solutions (19). The size of the biomacromolecules (DNA and collagen) is noticeably much longer than the thermotropic molecules. Finally, the local arrangements of nonfluid analogs in annelid cuticle (37) and boxfish scutes (38) reports on the analogy between the 3D fibrils' order and a blue phase geometry, although the existence of an LC state is not demonstrated. The polarizing light microscopy images are not in agreement with these previously observed phases. Indeed, all these models exhibit a cubic symmetry and are thus incompatible with the experimental observations of a preferential direction of low birefringence lines. A new model is consequently required. It should exhibit 1) 3D orientational order and 2) large oscillations (>40°) of the orientation of the birefringence director. Such a model is proposed in Fig. 1*D* (scheme) and is in agreement with all optical microscopy observations. This is an intermediate organization between the twisted nematic (39) and the helicoidal instability observed in the cholesteric phase (40). Interestingly, the molecular orientation is continuous at long range, and the 3D orientational order of collagen matrices recalls that of the structure in decalcified elephant ivory (15), although the scale is different. The organization here does not present any defects that are required between the double-twist cylinders in 3D-ordered chiral mesophases, ensuring the high optical transparency of the fibrillar matrix. Indeed, such defects in blue phases exhibit huge refractive index variation and are at the origin of light interferences (color) and scattering (turbidity).

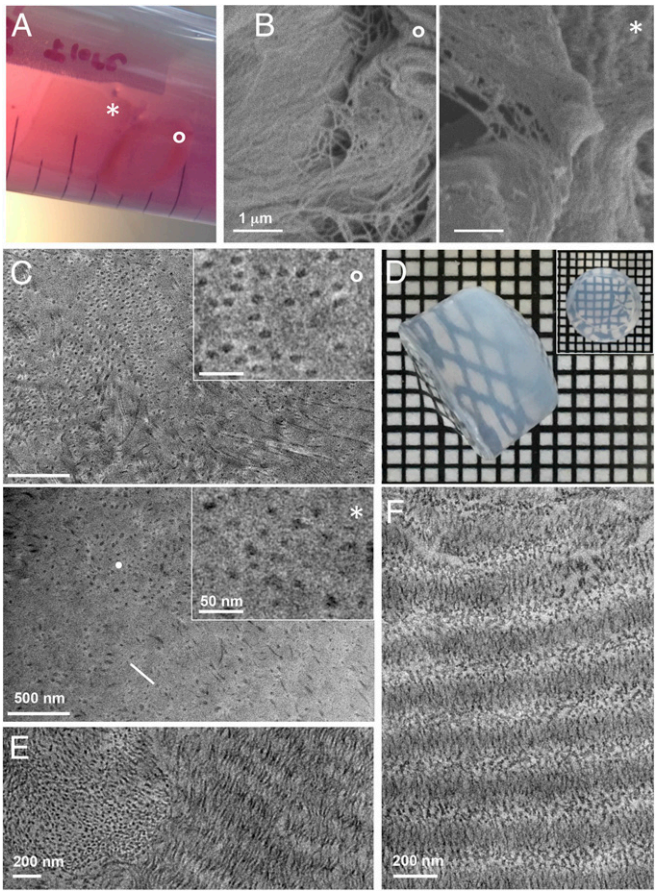


Fig. 2. Ultrastructure investigations of optically transparent collagen-based materials by electron microscopies. (*A*) The collagen matrix (*) and the cornea (°) stored in Cornea Cold as classical storage medium. Both samples remain transparent when stored in the medium. (*B*) SEM and (*C*) TEM images of the biological cornea (°) and the synthetic transparent collagen matrix (*). (Scale bars, 1 μm [*B*] and 500 nm [*C*].) Insets in *C* are observations at higher magnification. (Scale bars, 50 nm.) The fibrils lay parallel (white line) or perpendicular (white dot) to the section cut. (*D*) Thick 3D fibrillar collagen matrix (1 cm in diameter) with a narrow gradient of concentration prepared by using the injection/reverse dialysis process to reach a final concentration around 45 mg/mL over the bulk. An optical gradient of transparency is observed going from opalescent (higher concentration) to transparent (lower concentration) from the curve side but is entirely transparent when observed from the flat end (*Inset*). (*E* and *F*) TEM images of the opalescent collagen matrix showing orthogonal arrangements of the fibrils reminding that of the corneal stroma.

Downloaded at Akademiska Sjukhuset on May 19, 2020

To improve our understanding of the origin of transparency in collagen structures, observations were performed on pig corneas without polarization (*SI Appendix*, Fig. S4*A*). Corneal birefringence is known and varies within a single cornea. Birefringent domains are observed under physical constraints (*SI Appendix*, Fig. S4*B*) which at higher magnification appear as a layered texture (*SI Appendix*, Fig. S4*C*), in agreement with the birefringence texture in mice corneal stroma (33).

In summary, as previously described for transparent collagen matrices of elephant ivory (15), collagen appears to form a precholesteric phase which presents a 3D orientational order. This phase can be interpreted as a subtle equilibrium between double-twist trend for the radial structure of collagen fibrils (41) with only bending deformation, and a helical deformation with a splay deformation. However, due to the lack of crystallographic evidence and physical properties, we will refer to it as precholesteric* phase, P*.

To help identify the physicochemical factors for the origins of the transparency, structural, optical, and mechanical characterization are required.

Ultrastucture of Transparent Collagen Matrices and Analogy with Cornea

Before sample preparation for electron microscopy observations, the synthetic and the biological materials were stored in a classical storage medium for cornea (i.e., Cornea Cold; *SI Appendix*, *Extended Supporting Methods*). Both were stable and remain transparent in the medium (Fig. 2*A*). This step allows a safe comparison of the materials in discarding any potential effect that would have been induced by different ionic forces, pH, and so on on the observed ultrastructure.

Scanning electron microscopy (SEM) observations were performed on a pig cornea (Fig. 2*B*, °) and compared to a transparent collagen matrix (∼45 mg/mL) (Fig. 2*B*, *). Both exhibit dense network with thin collagen fibrils (≤ 100 nm). Transmission electron microscopy (TEM) investigations confirm the high similarity in appearance between the two samples (Fig. 2*C*). Higher magnification (Fig. 2 *C*, *Inset*) shows that fibrils are monodisperse in diameter, which is a main characteristic of biological tissues. The diameter is ∼25 to 30 nm and classical for corneal tissue (42). The extrafibrillar space also appears in the same range of order (≤100 nm) with an average interfibrillar spacing of ∼45 nm in both samples. It is worth mentioning that the formation of biomimetic self-assembled gel needs both an attractive force to gather together the collagen molecules into fibrils and a repulsive force to freeze the fibrils into liquid crystalline order. The balance between the two forces prevents the fibrils from agglomeration, allowing the formation of tissue-like matrices (43). The lack of the other organic constituents (mainly proteoglycans) present in the corneal extracellular matrix may be the reason for the difference in aspects of the collagen. Collagen fibrils appear mostly aligned parallel (line) or perpendicular (dot) to the section plane, recalling previous observations performed with clustered DNA bundles (19), although a periodic pattern is difficult to draw (*SI Appendix*, Fig. S5). This is in fact also the case for cornea when the section plane is not perfectly performed perpendicular (*SI Appendix*, Fig. S6*A*) avoiding the observation of the organized orthogonal plywood (*SI Appendix*, Fig. S6*B*). This is quite intriguing since transparency of cornea is usually related to the arrangement of fibrils in a lattice with a high degree of order (6–8). Although short-range order is certainly a key ingredient for transparency, the microstructure of cornea on a large scale appears to be more complex.

To improve our understanding of the correlation between the microstructure of the collagen material and its transparency, further investigations were performed on a material larger in size (cylinder ∼0.5 × 1 cm^2) with a final concentration of ∼45 mg/mL. Although the material is indeed transparent from the flat end (Fig. 2 *D*, *Inset*), a gradient of transparency forms going from opalescent to completely transparent when observed from the curve side as depicted in Fig. 2*D*. This indicates a slight difference in concentration in the collagen material ($\Delta C \leq 1$). The ultrastructure was investigated by TEM, revealing two other orthogonal arrangements of fibrils in the opalescent domain (Fig. 2 *E* and *F*). Their spatial distribution appears heterogeneous over the domain but we cannot exclude that there is in fact a link between their position and a specific concentration. Both domains are denser in collagen fibrils.

One presents two types of bundles of fibrils (Fig. 2*E*), each showing a constant orientation, but abrupt angular changes at the transition from one bundle to the next one. Interestingly, this arrangement recalls that of fish scutes (*SI Appendix*, Fig. S7*A*) where an analogy with a blue phase geometry is made (14, 38). This original architecture can also be compared to the arrangement found in decalcified ivory of elephant (15, 44). Noticeably, the 3D helical arrangement is observed at higher scale but remains optically transparent (*SI Appendix*, Fig. S7*B*).

The other domain presents two types of layers of fibrils. Each layer shows a constant orientation. As for the two other domains, the collagen fibrils are observed either in cross-section or in longitudinal section being systematically at approximate right angles to the surrounding layers. Thus the synthetic opalescent domain exhibits high similarities in terms of structure (i.e., local orthogonal plywood of lamellae) and size (i.e., fibril diameter, intermolecular packing [*SI Appendix*, Fig. S8], and thickness of layers) (45) with the corneal stroma (*SI Appendix*, Fig. S6*B*). Although the orientation of the collagen fibrils in longitudinal section is perpendicular to the usual but very local observations found in the literature as discussed above, it is also found in cornea (*SI Appendix*, Fig. S6*A*, rectangle).

In summary, three domains exhibit very thin and regular fibril diameter with orthogonal arrangements (from single fibril to layers or bundles of fibrils). The domains coexist in the gap of transparency in the fibrillar collagen diagram. According to this noticeable difference in the domains' size, it may be proposed that the ratio between the unit (whatever its nature, e.g., collagen fibril or empty tubule) and an associate orthogonal arrangement is the key for building transparent materials. To go further on the understanding of the structural–property relationship, the intrinsic degree of transparency (scattering mean free path) was investigated on materials evolving from transparent to opaque and compared to the cornea biological tissue. In addition, mechanical investigations were performed to help identify the physicochemical parameters involved in the formation of such optical properties.

Correlation Between Microstructure and Optical and Mechanical Properties

A set of homogeneous matrices with a thickness of ∼2 mm was prepared using the slow evaporation process described above (*SI Appendix*, *Extended Supporting Methods*), with concentrations ∼40, ∼42, ∼43.5, ∼45, ∼47, and ∼48 mg/mL, covering a narrow range around the critical concentration 45 mg/mL. Transmittance spectra of hydrated fibrillar collagen matrices recorded in the visible and near-ultraviolet, and normalized by the transmittance of the more transparent sample (*SI Appendix*, *Extended Supporting Methods*), are shown in Fig. 3*A*. Increased transmittance of the ∼45 mg/mL matrix is observed over the full wavelength range, which provides qualitative support to the change in transparency. For a quantitative assessment of the degree of transparency, we measured the scattering mean free path ℓ using full-field optical coherence tomography (OCT) (46) (Fig. 3 *B*–*E*). The spatially averaged OCT signal decays exponentially with depth within the material, with a characteristic decay length ℓ, thus providing a direct measurement of this intrinsic parameter in scattering materials (*SI Appendix*, *Extended Supporting Methods*). First, measurements were performed on an ex vivo pig cornea (Fig. 3*B*). A typical in-depth OCT cross-section (Fig. 3*C*) clearly shows the decreasing OCT signal from which the value of ℓ is extracted.

Downloaded at Akademiska Sjukhuset on May 19, 2020

Measurements in four different zones (indicated as square regions in Fig. 3*B*) are presented in a bar graph, showing an increased transparency in the center, consistent with the visual appearance of the cornea. Second, investigations were conducted on the matrix made with the broad gradient in collagen concentration as shown in Fig. 1*A* (Fig. 3 *D* and *E*). The scattering mean free path ℓ was measured in seven different zones, with decreasing concentration in collagen, resulting in the bar graph in Fig. 3*D*. Substantial changes, by almost a factor of 2, are observed along the collagen concentration gradient, and thus by moving through different fibrillar microstructures. Larger values of ℓ at the center indicate an increase in transparency, in agreement with visual appearance and the transmittance curves. This substantial change in ℓ is a signature of the crucial role of partial short-range order in disordered scattering materials. Indeed, it is known that variations of partial order in the fibrils positions can lead to smaller or larger values of ℓ (47, 48), up to transparency (49). Interestingly, the value $\ell = 125.4$ μm found in the center of the pig cornea (Fig. 3*B*) is on the order of the values ℓ ~120 to 140 μm measured at the edges of the transparency gap of the gradient matrix (zones 1 and 4 in Fig. 3*D*). This correspondence is supported qualitatively by the in-depth OCT cross-section images (Fig. 3*E*) of the 3D synthetic bulk (~45 mg/mL; Fig. 2*D*). Indeed, we observe that the collagen fibrils are parallel and superimposed in the opalescent part (corresponding to the edge of the transparency gap), recalling the structure of the corneal stroma (Fig. 3*C*). This strengthens the hypothesis that increased partial order at a concentration 45 ± 1 mg/mL is responsible for enhanced transparency. This also suggests that the structure of cornea may not correspond to the maximum of transparency, presumably since other properties (e.g., mechanical) also need to be optimized.

Based on the evidence of the crucial role of the ultrastructure on the optical properties, the mechanical properties of the collagen matrices were also investigated. The transparent matrix at ~45 mg/mL is tough and easy to handle (Movie S1). It remains transparent upon mechanical handling and shearing, suggesting that fibrillar rearrangements do not operate at the scale of visible wavelengths (from ~100 nm to a few micrometers). However, gel stability is very sensitive to slight differences in concentration (*SI Appendix*, Fig. S9). This suggests that the assumed improvement of mechanical properties of collagen fibrillar matrices with concentration described in the literature (30, 50) does not necessarily apply around the concentration leading to transparency.

More quantitative assessment of the mechanical response of optically transparent materials with concentrations in the range ~43 to 45 mg/mL was obtained at large strains in tension and compared to freshly extracted cornea. The general mechanical response of the matrices exhibits biomimetic mechanical behavior. Tensile behavior of the fibrillar matrices is strongly nonlinear (Fig. 4), with extreme compliance at the lower stretches and hardening at intermediate strains, as expected for biological tissues (51–53) and more especially for cornea (54). From this "J-shaped" mechanical response, elastic moduli were defined in the toe and linear region, respectively.

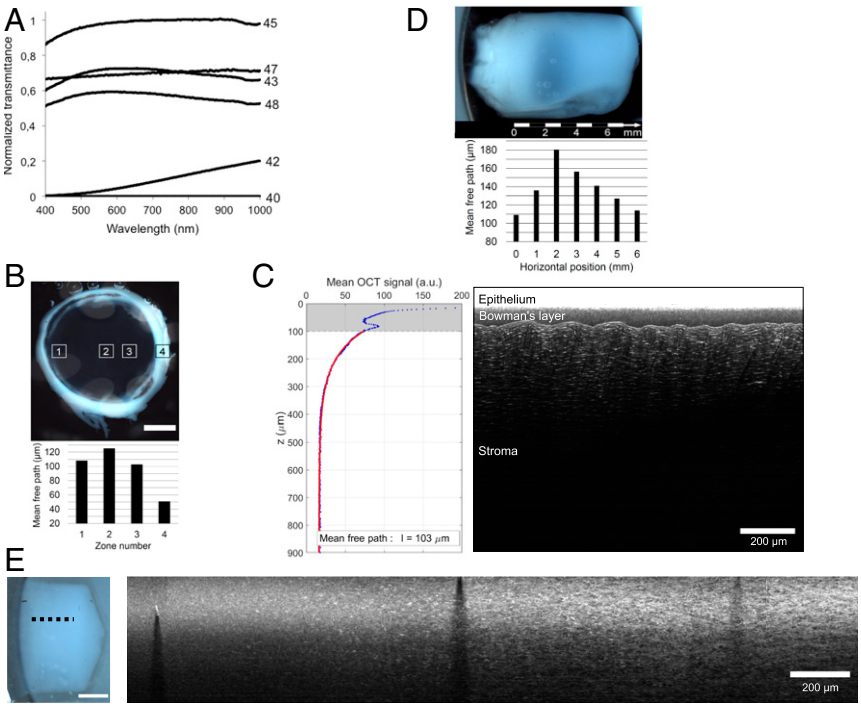


Fig. 3. Transparency of a freshly extracted pig cornea and of collagen matrices investigated by transmittance (*A*) and full-field OCT (*B–E*). (*A*) Transmittance spectra of collagen matrices for visible and near-infrared wavelengths are provided for concentrations ranging from 40 to 48 mg/mL. (*B*) Pig cornea over the black background of the sample holder (*Top*), and bar graph of the measured values of the scattering mean free path ℓ (*Bottom*) in four 1.3- × 1.3-mm^2 zones in the stroma (zones 1 through 3) and in the sclera (zone 4). Larger values of ℓ correspond to an increase in transparency. (*C*) In-depth OCT cross-section image in zone 3 (*Right*) from which ℓ is extracted by fitting the average OCT signal versus the depth z (*Left*, blue dots) with an exponential decay exp(−z/ℓ) (*Left*, red curve; values in the gray zone are discarded in the fitting procedure). (*D*) Collagen matrix (characterized by a gradient in concentration [20 to 50 to 100 mg/mL range; see Fig 1*A*]) over the black background of the sample holder (*Top*), and measured values of ℓ (*Bottom*) in seven 100- × 100-μm^2 zones, evenly spaced along a horizontal line, parallel to the collagen concentration gradient in the matrix. The general shape of the bar graph and the maximum value of ℓ measured in the third zone are consistent with the visual observation of maximum transparency in the center of the matrix. (*E*) Collagen matrix (with a narrow gradient of concentration around 45 mg/mL over the 1-cm bulk; see Fig. 2*D*) over the white background of the sample holder (*Left*), and in-depth OCT cross-section image (*Right*) along the collagen concentration gradient (black dashed line in *E*, *Right*). The change in the structural appearance of the matrix is clearly visible (from left to right in the OCT cross-section), with an increasing textured aspect.

Downloaded at Akademiska Sjukhuset on May 19, 2020

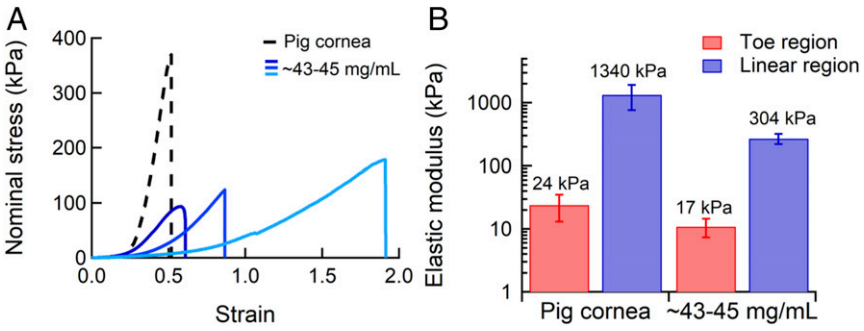


Fig. 4. Mechanical behavior (tension mode) of transparent collagen matrices and of freshly extracted pig cornea. (*A*) The three fibrillar collagen gels prepared by injection/reverse dialysis approach at concentrations in the range ~43 to ~45 mg/mL exhibit a "J-shaped" stress–strain response, as observed for biological tissues. As a guideline, the mechanical response of the pig cornea is given. No preconditioning was applied, that is, curves correspond to the first loading. Note that the maximal stress value before rupture, usually defined as the ultimate tensile strength (UTS), is only indicative since gel (as cornea) failure systematically occurred in the clamps, suggesting that clamps involve local premature damage. (*B*) Modulus increasing with extension, elastic moduli are given in the toe and linear region, respectively. Gel rigidities display moduli of same order of magnitude.

Performing such large strain characterizations on hydrated materials is delicate due to their intrinsic softness and wetness that necessitate preventing any slippage in the jaws and drying during the tests (55). Besides, their potential drying can induce a collapse of the fibrillar collagen network, dramatically enhancing the stiffness (56). The elastic moduli in the linear region of the transparent collagen matrices in the range ~43 to 45 mg/mL (304 ± 50 kPa) are consistent with the higher values found in the literature after the critical concentration threshold for anisotropic fibrillar arrangement (50, 57). However, the stiffness of the transparent matrices in the linear regime is about fourfold lower than that of the pig cornea (1,340 ± 580 kPa) (30). These differences can be explained by the presence of components in the cornea that play an important role in ensuring the mechanical performance (56). The presence of a "nonfibrillar organic matrix" (including proteoglycan), which resists the separation of the fibrils during shearing, was reported in bone tissue (58) and may exist for the synthetic collagen matrix made of residual components not extracted from the purification step (*SI Appendix*, Fig. S3*B*) and/or collagen molecules that did not precipitate. Furthermore, our process does not enable a precise spatial control of the anisotropy in 3D at the microscale, which increases the variability of the mechanical behavior even in a narrow concentration range. Note that ultimate stages of the stress-strain curves were truncated when macroscopic damage (crack) appeared in the sample. Ultimate tensile stresses and strains at break were not investigated, as failure systematically occurred in the clamps. It is worth mentioning that a pretreatment of collagen-based materials is quite systematically used in the literature to reinforce their mechanical properties by means of reticulant agents (59, 60).

In conclusion, we have demonstrated the existence of a gap of transparency in synthetic collagen matrices, around a critical collagen concentration of 45 mg/mL. Transparency is observed for a narrow range of concentrations, below a few milligrams per milliliter, that corresponds to a specific precholesteric phase in the molecular collagen diagram. This phase presents a 3D orientational order without collagen director linear singularity such as disclination. The intimate connection between the degree of optical transparency and the microstructure has been addressed quantitatively. Transparency emerges from structural correlations in the fibrillar collagen network that inhibit light scattering and coexists with a biomimetic mechanical response. The possibility to produce hydrogels by biopolymer self-assembly with such striking optical properties opens a very interesting route in the study of photonic materials. The synthetic collagen matrix also bears deep resemblance to natural corneal stroma, in terms of microstructure and macroscopic optical and mechanical properties. This strengthens the hypothesis of the existence of biological LC analogs to form 3D tissue architectures with specific emerging properties.

Methods

Full details of sample preparation and characterization techniques (polarized light microscopy, SEM, TEM, small-angle X-ray scattering, transmittance, full-field OCT, and tensile testing) are presented in *SI Appendix, Extended Supporting Methods*. This includes the collagen and cornea sources, the collagen gradient matrices synthesis (evaporation procedure and injection/reverse dialysis), and the collagen matrices storage and stability. Briefly, two sources of type I collagen were used either extracted from rat tail tendons or purchased from Symatèse. The synthesis of collagen gradient matrices was performed by either slow evaporation under a laminar flow hood or by injection/reverse dialysis.

Data Availability. The data supporting the findings of this study are available within the paper and *SI Appendix*.

ACKNOWLEDGMENTS. N.N. thanks the Fondation Collège de France and Fondation Electricité de France for financial support, especially Marie Cheron for sharing opinions and her trust, Jean-Baptiste Hennequin (Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de Paris [ESPCI Paris]) for the spark that led to the collaboration of the coauthors, and Niki Baccile (Laboratoire Chimie de la Matière Condensée de Paris [LCMCP]) for fruitful discussion about small-angle X-ray scattering data. We thank Josette Legagneux (Institut de Chirurgie, Paris) for providing pig cornea; Christophe Helary (LCMCP) for help with electrophoresis; and Bernard Haye (LCMCP) for preparation of some TEM samples.

1. W. C. Kerfoot, A question of taste: Crypsis and warning coloration in freshwater zooplankton communities. *Ecology* **63**, 538–554 (1982).
2. J. R. M. Langsdale, Developmental changes in the opacity of larval herring, Clupea harengus, and their implications for vulnerability to predation. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **73**, 225–232 (1993).
3. A. Tsuda, S. Hiroaki, T. Hirose, Effect of gut content on the vulnerability of copepods to visual predation. *Limnol. Oceanogr.* **43**, 1944–1947 (1998).
4. K. M. Meek, C. Knupp, Corneal structure and transparency. *Prog. Retin. Eye Res.* **49**, 1–16 (2015).
5. M. Kreysing, L. Boyde, J. Guck, K. J. Chalut, Physical insight into light scattering by photoreceptor cell nuclei. *Opt. Lett.* **35**, 2639–2641 (2010).
6. D. M. Maurice, The structure and transparency of the cornea. *J. Physiol.* **136**, 263–286 (1957).
7. R. W. Hart, R. A. Farrell, Light scattering in the cornea. *J. Opt. Soc. Am.* **59**, 766–774 (1969).
8. G. B. Benedek, Theory of transparency of the eye. *Appl. Opt.* **10**, 459–473 (1971).
9. T. J. Freegard, The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye (Lond.)* **11**, 465–471 (1997).
10. D. J. Prockop, What holds us together? Why do some of us fall apart? What can we do about it? *Matrix Biol.* **16**, 519–528 (1998).
11. M.-M. Giraud-guille, Cholesteric twist of collagen in vivo and in vitro. *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Incorp. Nonlin. Optics* **153**, 15–30 (1987).

Downloaded at Akademiska Sjukhuset on May 19, 2020

12. S. Weiner, W. Traub, H. D. Wagner, Lamellar bone: Structure-function relations. *J. Struct. Biol.* **126**, 241–255 (1999).
13. M. Mitov, Cholesteric liquid crystals in living matter. *Soft Matter* **13**, 4176–4209 (2017).
14. M. M. Giraud, J. Castanet, F. J. Meunier, Y. Bouligand, The fibrous structure of coelacanth scales: A twisted "plywood". *Tissue Cell* **10**, 671–686 (1978).
15. M. Albéric, A. Gourrier, W. Wagermaier, P. Fratzl, I. Reiche, The three-dimensional arrangement of the mineralized collagen fibers in elephant ivory and its relation to mechanical and optical properties. *Acta Biomater.* **72**, 342–351 (2018).
16. A. Velasco-Hogan *et al*., On the nature of the transparent teeth of the deep-sea dragonfish, Aristostomias scintillans. *Matter* **1**, 235–249 (2019).
17. A. Tidu *et al*., Highly concentrated collagen solutions leading to transparent scaffolds of controlled three-dimensional organizations for corneal epithelial cell colonization. *Biomater. Sci.* **6**, 1492–1502 (2018).
18. F. Livolant, Precholesteric liquid crystalline states of DNA. *J. Phys. France* **48**, 1051–1066 (1987).
19. A. Leforstier, F. Livolant, DNA liquid crystalline blue phases. Electron microscopy evidence and biological implications. *Liq. Cryst.* **17**, 651–658 (1994).
20. Y. Bouligand, Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases. *Tissue Cell* **4**, 189–217 (1972).
21. K. M. Meek, Corneal collagen-its role in maintaining corneal shape and transparency. *Biophys. Rev.* **1**, 83–93 (2009).
22. R. L. Trelstad, A. J. Coulombre, Morphogenesis of the collagenous stroma in the chick cornea. *J. Cell Biol.* **50**, 840–858 (1971).
23. V. M. Borderie *et al*., Banding patterns: Exploring a new feature in corneal stroma organization. *ARVO Annu. Meet.* **58**, 3906 (2017).
24. Y. Wang *et al*., Controlled collagen assembly to build dense tissue-like materials for tissue engineering. *Soft Matter* **7**, 9659–9664 (2011).
25. Y. Wang *et al*., The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nat. Mater.* **11**, 724–733 (2012).
26. L. Bessea, B. Coulomb, C. Lebreton-Decoster, M.-M. Giraud-Guille, Production of ordered collagen matrices for three-dimensional cell culture. *Biomaterials* **23**, 27–36 (2002).
27. M.-M. Giraud-Guille, Liquid crystallinity in condensed type I collagen solutions. A clue to the packing of collagen in extracellular matrices. *J. Mol. Biol.* **224**, 861–873 (1992).
28. C. Helary, A. Foucault-Bertaud, G. Godeau, B. Coulomb, M. M. G. Guille, Fibroblast populated dense collagen matrices: Cell migration, cell density and metalloproteinases expression. *Biomaterials* **26**, 1533–1543 (2005).
29. F. Gobeaux *et al*., Cooperative ordering of collagen triple helices in the dense state. *Langmuir* **23**, 6411–6417 (2007).
30. A. Tidu *et al*., Development of human corneal epithelium on organized fibrillated transparent collagen matrices synthesized at high concentration. *Acta Biomater.* **22**, 50–58 (2015).
31. P. D. S. Peixoto *et al*., Achievement of cornea-like organizations in dense collagen I solutions: Clues to the physico-chemistry of cornea morphogenesis. *Soft Matter* **9**, 11241–11248 (2013).
32. F. Gobeaux *et al*., Fibrillogenesis in dense collagen solutions: A physicochemical study. *J. Mol. Biol.* **376**, 1509–1522 (2008).
33. M. Aldrovani, A. M. A. Guaraldo, B. C. Vidal, Optical anisotropies in corneal stroma collagen fibers from diabetic spontaneous mice. *Vision Res.* **47**, 3229–3237 (2007).
34. P. D. S. Peixoto, A. Deniset-Besseau, M.-C. Schanne-Klein, G. Mosser, Quantitative assessment of collagen I liquid crystal organizations: Role of ionic force and acidic solvent, and evidence of new phases. *Soft Matter* **7**, 11203–11210 (2011).
35. I. Dierking, Chiral liquid crystals: Structures, phases, effects. *Symmetry* **6**, 444–472 (2014).
36. C. Bahr, H.-S. Kitzerow, *Chirality in Liquid Crystals*, (Springer, 2001).
37. L. Lepescheux, Spatial organization of collagen in annelid cuticle: Order and defects. *Biol. Cell* **62**, 17–31 (1988).
38. L. Besseau, Y. Bouligand, The twisted collagen network of the box-fish scutes. *Tissue Cell* **30**, 251–260 (1998).
39. V. Borshch *et al*., Nematic twist-bend phase with nanoscale modulation of molecular orientation. *Nat. Commun.* **4**, 2635 (2013).
40. F. Lequeux, M. Kléman, Helicoidal instability in cholesteric capillary tubes. *J. Phys. France* **49**, 845–855 (1988).
41. A. I. Brown, L. Kreplak, A. D. Rutenberg, An equilibrium double-twist model for the radial structure of collagen fibrils. *Soft Matter* **10**, 8500–8511 (2014).
42. Y. Komai, T. Ushiki, The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **32**, 2244–2258 (1991).
43. M. M. Giraud-Guille, G. Mosser, E. Belamie, Liquid crystallinity in collagen systems in vitro and in vivo. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **13**, 303–313 (2008).
44. M. Albéric *et al*., Relation between the macroscopic pattern of elephant ivory and its three-dimensional micro-tubular network. *PLoS One* **12**, e0166671 (2017).
45. T. Sibillano *et al*., Interfibrillar packing of bovine cornea by table-top and synchrotron scanning SAXS microscopy. *J. Appl. Cryst.* **49**, 1231–1239 (2016).
46. L. Vabre, A. Dubois, A. C. Boccara, Thermal-light full-field optical coherence tomography. *Opt. Lett.* **27**, 530–532 (2002).
47. L. F. Rojas-Ochoa, J. M. Mendez-Alcaraz, J. J. Sáenz, P. Schurtenberger, F. Scheffold, Photonic properties of strongly correlated colloidal liquids. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 73903 (2004).
48. K. Vynck, M. Burresi, F. Riboli, D. S. Wiersma, Photon management in two-dimensional disordered media. *Nat. Mater.* **11**, 1017–1022 (2012).
49. O. Leseur, R. Pierrat, R. Carminati, High-density hyperuniform materials can be transparent. *Optica* **3**, 763–767 (2016).
50. S. Ramtani, Y. Takahashi-Iniguez, C. Helary, D. Geiger, M. M. G. Guille, Mechanical behavior under unconfined compression loadings of dense fibrillar collagen matrices mimetic of living tissues. *J. Mech. Med. Biol.* **10**, 35–55 (2010).
51. Y. C. Fung, Elasticity of soft tissues in simple elongation. *Am. J. Physiol.* **213**, 1532–1544 (1967).
52. J. D. Humphrey, Continuum biomechanics of soft biological tissues. *Proc. R. Soc. London. Ser. A* **459**, 3–46 (2003).
53. S. Rose *et al*., Nanoparticle solutions as adhesives for gels and biological tissues. *Nature* **505**, 382–385 (2014).
54. S. Kling, F. Hafezi, Corneal biomechanicsA review. *Ophthalmic Physiol. Opt.* **37**, 240–252 (2017).
55. S. Rose, A. Dizeux, T. Narita, D. Hourdet, A. Marcellan, Time dependence of dissipative and recovery processes in nanohybrid hydrogels. *Macromolecules* **46**, 4095–4104 (2013).
56. D. A. Hoeltzel, P. Altman, K. Buzard, K. Choe, Strip extensiometry for comparison of the mechanical response of bovine, rabbit, and human corneas. *J. Biomech. Eng.* **114**, 202–215 (1992).
57. N. Nassif *et al*., Self-assembled collagen– apatite matrix with bone-like hierarchy. *Chem. Mater.* **22**, 3307–3309 (2010).
58. G. E. Fantner *et al*., Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture. *Nat. Mater.* **4**, 612–616 (2005).
59. E. Khor, Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. *Biomaterials* **18**, 95–105 (1997).
60. M. E. Nimni, Glutaraldehyde fixation revisited. *J. Long Term Eff. Med. Implants* **11**, 151–161 (2001).

Downloaded at Akademiska Sjukhuset on May 19, 2020

PNAS
www.pnas.org

Supplementary Information for:

Origin of transparency in scattering biomimetic collagen materials

Chrystelle Salameh[a,1,2], Flore Salviat[a,b,1], Elora Bessot[c], Miléna Lama[c,d], Jean-Marie Chassot[e], Elodie Moulongui[c], Yan Wang[c], Marc Robin[c], Arnaud Bardouil[f], Mohamed Selmane[g], Franck Artzner[f], Alba Marcellan[d], Clément Sanchez[a,c], Marie-Madeleine Giraud-Guille[c], Marco Faustini[c], Rémi Carminati[e] and Nadine Nassif[a,c,e,3].

Affiliations:

[a]Collège de France, PSL University, 11 place Marcelin Berthelot, 75231 Paris Cedex 05, France.

[b]Cornea, External Disorders and Refractive Surgery, Fondation Ophtalmologique Rothschild, 29 rue Manin, 75019 Paris, France.

[c]Sorbonne Université, Laboratoire Chimie de la Matière Condensée de Paris, UMR 7574 CNRS, Collège de France, 4 place Jussieu, 75231 Paris Cedex 05, France.

[d]Sciences et Ingénierie de la Matière Molle, ESPCI Paris, PSL University, CNRS, Sorbonne Université, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France.

[e]Institut Langevin, ESPCI Paris, CNRS, PSL University, 1 rue Jussieu, 75005 Paris, France.

[f]Univ Rennes, CNRS, Institut de Physique de Rennes - UMR 6251, F-35000 Rennes, France

[g]Sorbonne Université, Institut des Matériaux de Paris Centre (IMPC), 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France.

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2001178117

[1]These authors contributed equally to this work.

[2]Current address : Institut Européen des Membranes, IEM, UMR 5635, Université Montpellier, ENSCM, CNRS, 34095 Montpellier Cedex 5, France.

[3] To whom correspondence may be addressed. Email: nadine.nassif@sorbonne-universite.fr

This PDF file includes:

Supplementary text
Figures S1 to S9
Legend for Movie S1
SI References

Other supplementary materials for this manuscript include the following:

Movie S1

Extended supporting methods

Sample preparation

Collagen source

To ensure that the resulting transparency does not depend on the biological tissue source, two sources of collagen were investigated: (*i*) Type I collagen extracted from rat tail tendons, (*ii*) Type I collagen diluted in acetic acid 5 mg/mL purchased from Symatèse® (N°Baan : S2132380005). The extraction of type I collagen from rat tail tendons was performed following a classical procedure[1]. Fresh tendons were solubilized in 0.5 M acetic acid (glacial acetic acid Carlo Erba®, Purity >= 99.8%) after washing with a phosphate-buffered saline (PBS) solution. The raw solution was centrifuged and the supernatant was selectively precipitated with 0.7 M NaCl. Precipitated type I collagen was solubilized in 0.5 M acetic acid then desalted by dialysis against 0.5 M acetic acid. The concentration of type I collagen solutions was calculated by hydroxyproline titration[2], and found to be equal to ~2 mg/mL. By this procedure, all organic components and contaminants are removed giving rise to a pure diluted collagen solution.

Cornea source

Three corneas were freshly removed from 3 months pigs. Under general anaesthesia and sterile conditions, the cornea at its junction with the sclera was cut on 360° and conserved firstly in Balanced Salt Solution (ophthalmic irrigation solution), secondly in Cornea Cold®. Scanning and transmission electron microscopies, mechanical tests and transparency measurements were performed on the extracted corneas.

Collagen gradient matrices synthesis

Evaporation procedure. Collagen matrices were synthesized by slow evaporation under a laminar flow hood. Typically 100 mL of collagen acid solution of a concentration comprised between 2 and 5 mg/ml were placed in a sterile 200 mL crystallizer previously weighed empty. The crystallizer is left open under a laminar flow hood for about 12 hours. Evaporation in a laminar hood allows the slow concentration of collagen to the desired concentration[3] by evaporation of the acetic acid/water present in the solution. This technique allows an accurate estimation of the concentration during evaporation by simple weighing. The pH was then increased to a range of 9 to 10 by ammonia (Carlo Erba® 28-30%) gas diffusion for 2 days to induce collagen *in vitro* fibrillogenesis and stabilize the liquid crystalline organization into dense fibrillar matrices[4]. The matrices were then washed several times in PBS until neutralization. All the experiments were carried under sterile conditions and at room temperature (19 ± 2°C) in order to prevent collagen denaturation. The samples were then stored at low temperature.

Injection/reverse dialysis. Collagen matrices were synthesized following a one step procedure (Ref. 24 in the main text) that combines injection[5] and reverse dialysis[6]. The procedure is based on the continuous injection of low concentrated collagen into a mold closed by a dialysis chamber in contact with a polymer of which the concentration controls that of the collagen. Collagen samples were cylinder-shaped with a thickness of ~3 mm and width of ~10 mm. A sterile syringe (20 mL) is filled with 15 mL of ~1 mg/mL soluble acidic collagen solution (0.5 mM acetic acid). The dialysis cell and the syringe are connected via a capillary, which will allow gradual injection of collagen. In order to make the system hermetic, a sterile cone is connected at one end to the syringe

tip wrapped in Teflon, and at the other end to the capillary. The bottom of the chamber contained a dialysis membrane with a molecular weight cut off of 12-14 kDa. The flux of the collagen solution was controlled (1µL/min-15 mL/min for 8 days) to maintain the same pressure on each side of the dialysis membrane and avoid thus the « inflation » of the membrane. The reverse dialysis process was set against polyethylene glycol (PEG, 35 kDa, Fluka) dissolved in 0.5 M acetic acid up to respectively 20 mg/mL for 24h, 50 mg/mL for 72h, 100 mg/mL for 72h and 150 mg/mL for 36h (see Fig. 1a); the final concentration over the bulk being ~20-50-100 mg/mL. For the thick 3D fibrillar collagen matrix (1 cm in diameter) with a narrow gradient of concentration (final concentration around 45 mg/mL over the bulk) (see Fig. 2d), the reverse dialysis process was set against polyethylene glycol (PEG, 35 kDa, Fluka) dissolved in 0.5 M acetic acid up to respectively 20 mg/mL for 24h, 50 mg/mL for 72h, and 60 mg/mL for 36h. The homogeneity of the solution can be maintained by stirring. The continuous injection of this solution under dialysis allows the concentration of collagen within the matrix. The PEG solution was renewed each 2 days. The form and the size of the matrices depend solely on the mold which constitutes the dialysis cell into which the collagen solution is injected over time. The molds were adapted to the best configuration suitable for the characterization techniques. For instance, 3D thick cylinders were privileged for optical tomography, rectangular molds for the mechanical tests. Similarly to the evaporation dialysis protocol, the fibrillogenesis step is carried out by bringing the collagen matrix into contact with ammonia vapors. The operating conditions described above make it possible to obtain a thick matrix of 1 cm^3 with a concentration gradient. These matrices were then removed from the dialysis chamber and washed several times in PBS solution

to remove all the ammonia residues. They were then treated for characterization. All of the assembly is carried out under a laminar flow hood in order to keep the mixture in sterile conditions. The plugs and clips constituting the dialysis cell are previously sterilized by immersion in a beaker containing 90% ethanol for 30 minutes. The dialysis membranes are cut to approximately 5 cm in length (the optimum size) then rehydrated by immersion in boiling water and finally cooled in sterile water.

Collagen matrices storage and stability

Collagen matrices obtained by both processes (evaporation and injection/dialysis) derived from rat tails as well as clinical grade were stored for several months at 4°C in sterile ultrapure water, SBS and Cornea cold®, Eurobio, Les Ulis, France as a preservation medium dedicated to corneas without impairing transparency. The best preservation mediums were found to be SBS and Cornea cold® since the matrices remained without any alteration of transparency for more than a year. A film of salts can form on the surface when the matrices are stored in cold PBS in the case of "clinical grade" collagen, but it is possible to remove it. The precipitation of salts can be avoided and the storage time increased in a cornea preservation medium (Cornea cold®) always at 4°C.

Sample characterization

For polarized light microscopy (PLM), collagen acid solutions (from rat tails and clinical grade) were left to slowly concentrate under a laminar hood up to ~39 mg/mL then a drop of each solution was placed between glass slides. Observations were made using a transmission Zeiss AxioImager A2 POL and performed on the drop, which slowly evaporate to reach concentrations between 40 and 48 mg/mL. The microscope is

equipped with the standard accessories for examination of birefringent samples under polarized light (*i.e.* crossed polars) and an AxioCam CCD camera.

For scanning electron microscopy (SEM) investigations, the cornea as well as the synthetic collagen matrices at 45mg/mL were fixed in 2.5% glutaraldehyde and dehydrated through successive ethanol baths (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% and 100%) for the supercritical CO_2 drying process. The supercritical drying process was performed with a BAL-TEC 030. Samples coated with a 10 nm layer of gold were analyzed with a Hitachi S-3400N SEM at an accelerating voltage of 10 kV.

For transmission electron microscopy (TEM), cornea and synthetic collagen matrices were fixed in 2.5% glutaraldehyde and dehydrated through successive ethanol baths (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% and 100%). After washing in a cacodylate/saccharose buffer solution (0.05 M/0.6 M, pH 7.4), the matrices were post-fixed with 2% osmium tetroxyde in the buffer solution for 1 h at 4°C, washed, dehydrated and embedded in araldite. Thin araldite sections (80 nm) were stained with uranyl acetate/lead citrate solutions and analyzed with a FEI TECMAI G2 Spirit Twin electron microscope operating at 120 kV.

Small Angle X-ray Scattering (SAXS) experiments were performed using the homemade Guinier beamline at IPR[7]. A two-dimensional Pilatus detector with sample-to-detector distance of 232 mm allowed the recording of scattering patterns in the range 0.01 $Å^{-1}$ to 1.742 $Å^{-1}$. The radial scattering vector is $q=4\pi\sin\theta/\lambda$, where 2θ is the scattering angle and $\lambda=1.541$ Å is the wavelength of the incident beam. Thin quartz capillaries of 1.5 mm diameter (GLAS W. Muller, Berlin, Germany) were loaded with small pieces cut out of the transparent gel and analyzed at 20 °C. For Wide X-ray Scattering (WAXS)

experiments, small pieces of the gel were cut out of the bulk sample and inserted in X-ray cylindrical borosilicate capillary tubes. The tubes were flame-sealed to keep the samples hydrated and then placed directly in the vacuum chamber beam. X-ray diffraction experiments were performed with a S-MAX 3000 RIGAKU using a monochromatic CuKα radiation. The data was collected in the 5-60° range (2θ). The sample-to-detection distance was 0.059 meters. The data was analyzed using Andy Ammersley's software Fit2D. The two-dimensional WAXS patterns were collected with imaging plates then scanned with a 50 μm resolution. The diameter of the cylindrical X-ray beam dimension at the specimen was 400 μm and the sample thickness was approximately 1 mm.

Transmittance measurements were conducted by ellipsometry on the synthetic collagen matrices prepared by evaporation at different concentrations, ranging from 40 to 48 mg/mL. Transmission spectra are obtained using an Ellipsometer (Variable angle spectroscopic ellipsometry (VASE) M-2000U Woollam spectroscopic ellipsometer) between 370 and 1000 nm at an angle of incidence of 0°. In order to ensure the planarity of the surfaces, the ~2 mm thick hydrated collagen matrices are placed between two glass slides for microscopy.

For mechanical characterization, tests were performed in tensile mode on an Instron tensile testing machine (model 5565) equipped with a 10 N load cell (with a relative accuracy of 0.5% from 0.1% to 100% of the full scale). The samples were placed in a home-made screw side action grip. Nominal strain was obtained from the cross-head displacement and defined as the ratio $(l\text{-}l_0)/l_0$, where l and l_0 are respectively the length during stretching and the initial length. Nominal stress, defined as engineering stress, was calculated from the tensile force and the initial cross section area, with respect to the

dimensions of the samples. Samples dimensions were about 6mm x 3.5mm x 2mm. The tests were performed at room temperature at a nominal strain rate of 0.06 s^{-1}. Careful attention was payed to keep the samples hydrated in order to avoid the denaturation of collagen in the biological and synthetic materials.

For the characterization of the intrinsic degree of transparency, we used a Light-CT Scanner from LLTech SAS, Paris, France, to image the samples and evaluate their scattering mean free path ℓ on different locations. This instrument provides in-depth optical sectioning imaging system based on full-field Optical Coherence Tomography (FF-OCT)[8]. Standard *en face* reflection microscopy images are recorded in planes at different depths inside the material, the light backscattered from regions above and below the selected plane being rejected using an interferometric detection. From a set of images recorded at different depths, 2D or 3D numerical reconstructions are possible, resulting in images such as that in Fig. 3c and 3e. The transverse resolution is FF-OCT is diffraction limited as in a usual optical microscope, unless optical aberrations from the sample are too significant. The axial (in depth) resolution depends on the spectral bandwidth of the illumination light[9]. The LLTech Light-CT Scanner, with its 10x NA 0.3 objectives and halogen illumination, achieves 1.5 µm lateral and 1 µm axial resolutions over a 1.3x1.3 mm^2 field of view. The inspected samples were placed in the cylindrical sample holder of the instrument, immersed in PBS, and covered with an appropriate glass plate. A piston enabled us to push and hold the sample close to or slightly in contact with the plate. For each inspected position of the samples, we performed a depth scan over several hundred micrometers, with a one micrometer step. We then used Fiji[10] and Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States) software to select a 100x100

μm² region of interest (ROI indicated in Fig. 3c and 3e) and plot the mean FF-OCT signal over this ROI vs. the depth z. The signal was fitted with an exponentially decreasing function of the form A exp(-z/ℓ) + B, where A and B are constants needed to adjust the maximum and background signal, respectively. Note that, since the refraction index mismatch between the samples and the reference arm immersion medium (silicone oil, n = 1.41) introduces defocus in depth, blurring images and reducing the signal intensity, we used Light-CT tools to measure the mean refraction indices of the samples (n_s~1.34 to 1.36) and to compensate for defocus all along the axial displacement during the depth scans[11].

References

1. Gobeaux, F. *et al.* Cooperative ordering of collagen triple helices in the dense state. *Langmuir* **23**, 6411–6417 (2007).
2. Bergman, I. & Loxley, R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Chem.* **35**, 1961–1965 (1963).
3. Helary, C., Foucault-Bertaud, A., Godeau, G., Coulomb, B. & Guille, M. M. G. Fibroblast populated dense collagen matrices: cell migration, cell density and metalloproteinases expression. *Biomaterials* **26**, 1533–1543 (2005).
4. Besseau, L. & Giraud-Guille, M.-M. Stabilization of fluid cholesteric phases of collagen to ordered gelated matrices. *J. Mol. Biol.* **251**, 197–202 (1995).
5. Mosser, G., Anglo, A., Helary, C., Bouligand, Y. & Giraud-Guille, M.-M. Dense tissue-like collagen matrices formed in cell-free conditions. *Matrix Biol.* **25**, 3–13 (2006).
6. Knight, D. P., Nash, L., Hu, X. W., Haffegee, J. & Ho, M. In vitro formation by reverse dialysis of collagen gels containing highly oriented arrays of fibrils. *J. Biomed. Mater. Res. An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater.* **41**, 185–191 (1998).
7. Bizien, T., Ameline, J.-C., Yager, K. G., Marchi, V. & Artzner, F. Self-Organization of Quantum Rods Induced by Lipid Membrane Corrugations. *Langmuir* **31**, 12148–12154 (2015).
8. Vabre, L., Dubois, A. & Boccara, A. C. Thermal-light full-field optical coherence tomography. *Opt. Lett.* **27**, 530–532 (2002).

9. Dubois, A. *et al.* Ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography. *Appl. Opt.* **43**, 2874–2883 (2004).

10. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676 (2012).

11. Labiau, S., David, G., Gigan, S. & Boccara, A. C. Defocus test and defocus correction in full-field optical coherence tomography. *Opt. Lett.* **34**, 1576–1578 (2009).

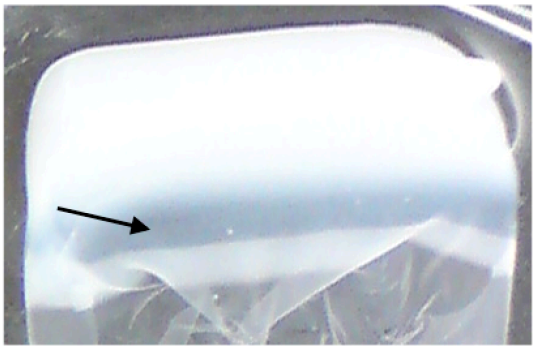


Fig. S1/ Matrix with a gradient in collagen concentration synthesized by slow evaporation. From top to down, the collagen concentration is increasing from 10 reaching 100 mg/mL. A gap in transparency (arrow) is observed inside the matrix and found at ~45 mg/mL after hydroxyproline titration.

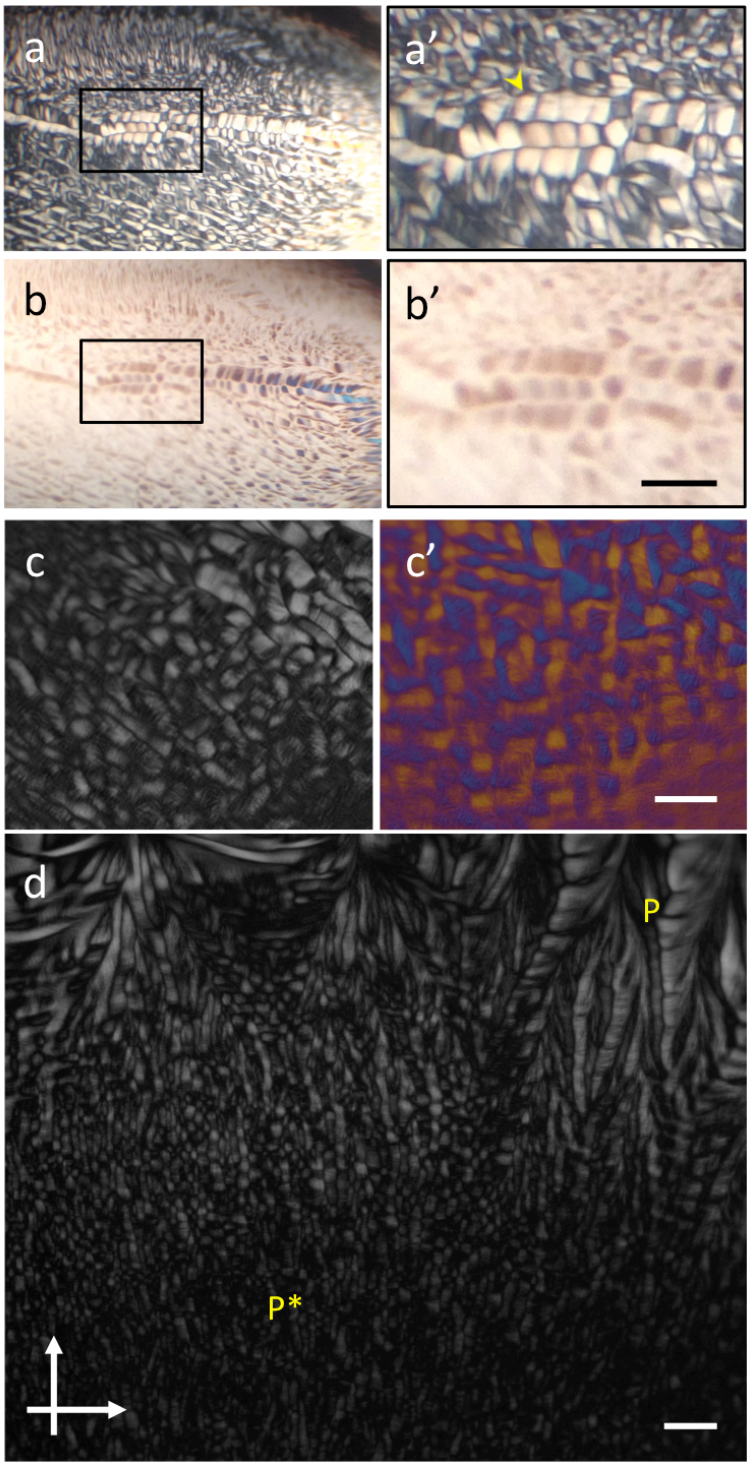


Fig. S2/ Observations by polarized light microscopy of acidic collagen solutions around the concentration found for the gap in transparency in the phase diagram of fibrillar collagen. a) Polarized light micrographs of a collagen liquid-crystal solution (~45 mg/mL) observed between crossed-polarizers (90°). a') Observation at higher

magnification evidences the “facetted dots” pattern where stripes are observed inside locally (yellow arrow) (scale bar = 20 microns); b-b’) Same observation with one polarizer. Blue and brown colors are observed. c-c’) Different orientations of the mosaic texture observed between crossed-polarizers (90°) (left) as evidenced with a first order retardation plate (right) (scale bar = 20 microns); d) Polarized light micrograph of a collagen liquid-crystal solution (~48 mg/mL) observed between crossed-polarizers (90°). The transition between two birefringent textures is observed: the more “classical” precholesteric banded-pattern (P) and the mosaic texture determined as a new precholesteric phase (P*) (scale bar = 100 microns).

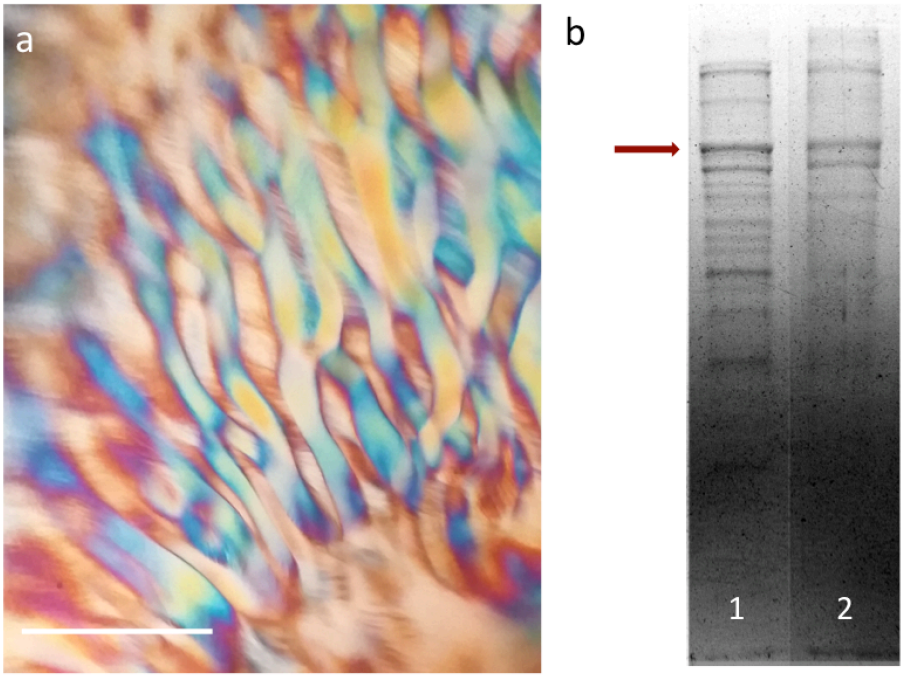


Fig. S3/ a) Polarized light micrograph of an acidic collagen solution (clinical grade) around the concentration found for the gap in transparency in the phase diagram of fibrillar collagen. This coloured **phase** with a filament texture was only observed with the highly purified collagen (scale bar = 20 microns); **b) SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of type I Collagen** extracted from (1) rat tails tendons and (2) porcin dermis (commercialized as clinical grade) confirming the higher purity of this latter solution. The red arrow shows the band corresponding to the α chain of type I collagen (125.10^3 KDa).

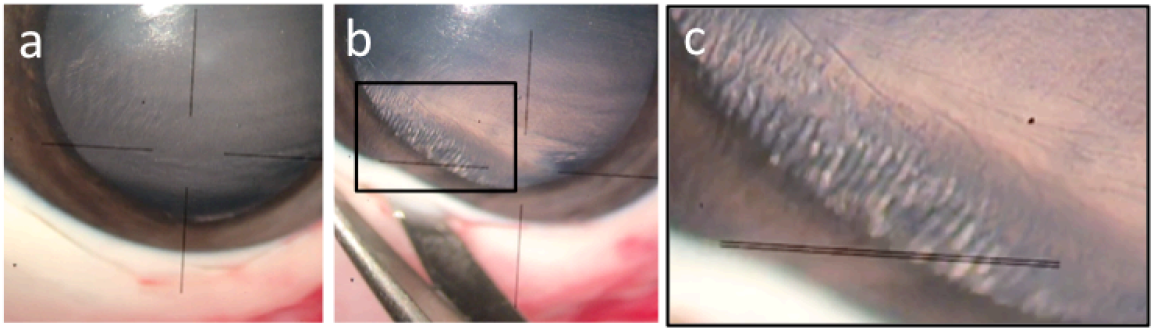


Fig. S4/ Observations of pig cornea by light microscopy. (a) Freshly extracted cornea, (b) a birefringence texture is observed under mechanical constraint without the use of polarizers, (c) which appears layered at higher magnification.

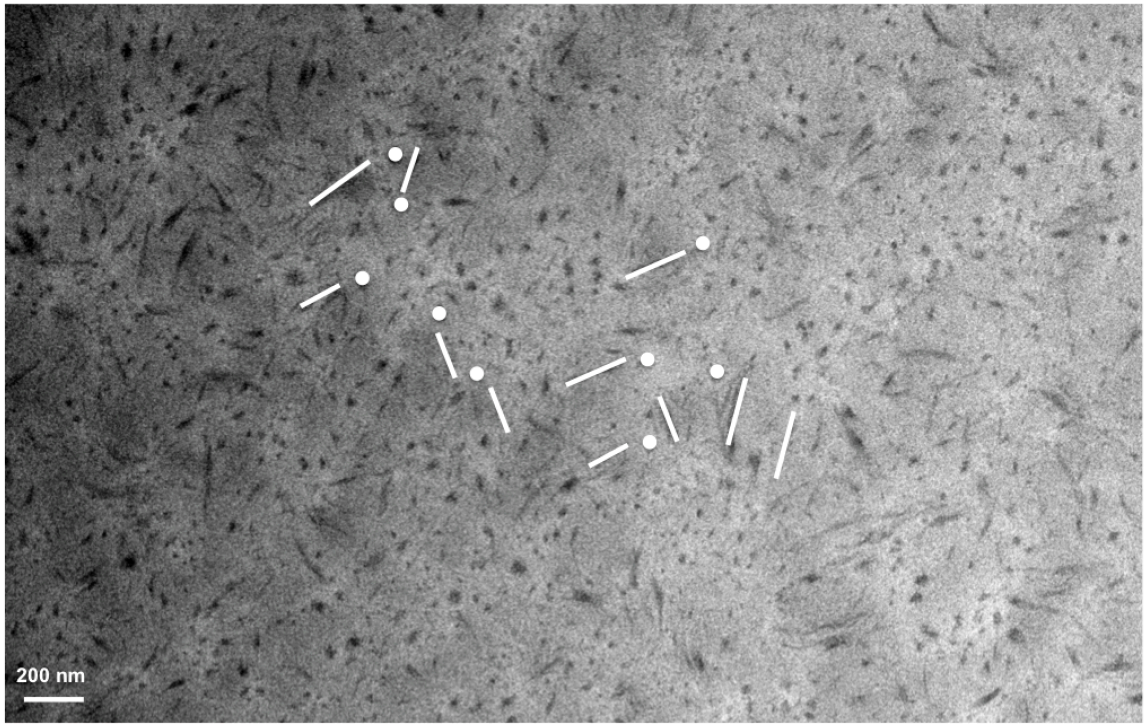


Fig. S5/ TEM micrograph of a transparent collagen matrix (~45 mg/mL). Collagen fibrils are monodisperse in diameter (~25-30 nm). They appear aligned parallel or perpendicular to the section plane, as respectively underlined by lines and dots.

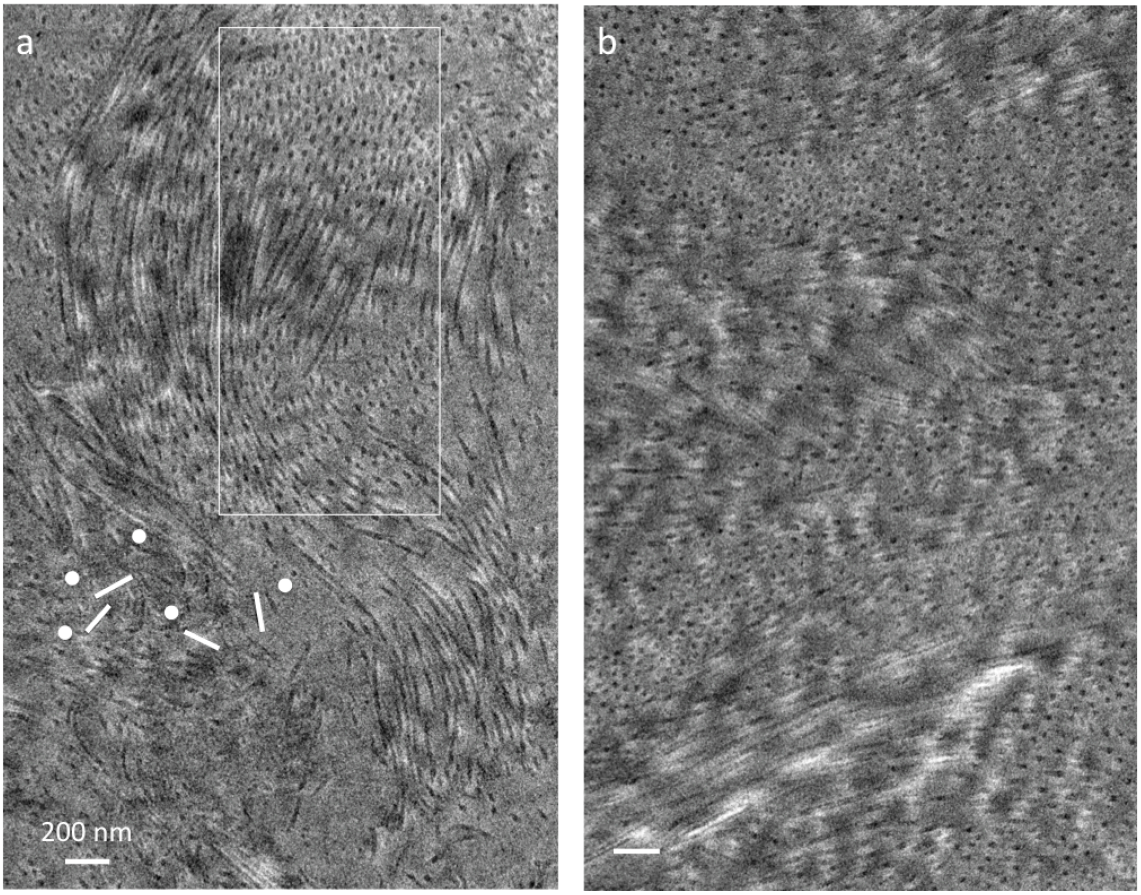


Fig. S6/ TEM micrographs of corneal stroma (pig). Different sections orientations are shown (a-b). Fibrils are aligned parallel or perpendicular to the section plane, as respectively underlined by lines and dots in (a). The rectangular underlines an unusual illustration of the fibrils. (b) Transverse section performed on the orthogonal plywood showing the typical feature of the corneal architecture.

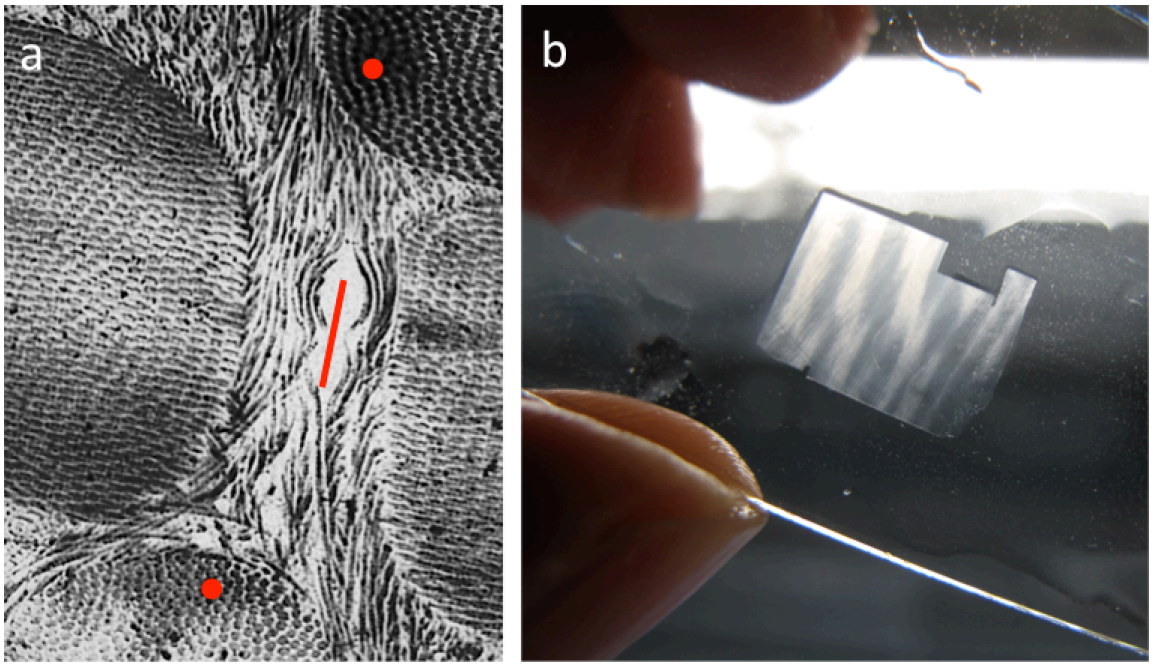


Fig. S7/ Illustrations of transparent biological materials. a) TEM micrograph of a Fish scale showing that bundles of fibrils are aligned parallel or perpendicular to the fracture plane, as respectively underlined by red the line and dots; b) image of demineralized ivory revealing layered transparent/opalescent domains. Image credit: Marie Albéric (Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Potsdam, Germany) and Ina Reiche (Institut de Recherche de Chimie Paris, Paris, France).

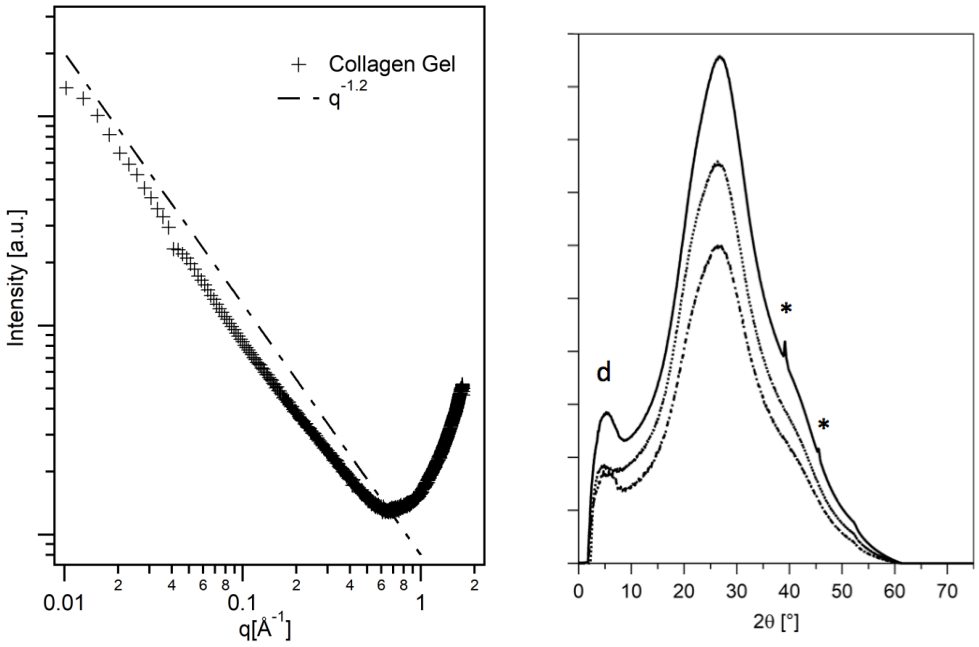


Fig. S8/ (Left) Small Angle X-ray Scattering of the gel in Log-Log plot shows a power-law behavior from less than q_{min} = 0.01 Å^{-1} (more than 60 nm) to 0.4-0.6 Å^{-1} (1.5-1.0 nm) with an exponent of -1.2. Such exponent is close to -1 that is characteristic of a stiff rod, with a persistence length longer than 60 nm and a distance between rods around 1.0-1.5 nm. This range of spacing is characteristic of collagen in the form of fibrils (*versus* free molecules). The reduced flexibility could explain the slight excess of exponent (-1.2 instead of -1) as observed for polymers in the case of excluded volume effects (-5/3). Noteworthy, there is no correlation peak between collagen fibrils. SAXS signal being proportional to the product of the contrast and the volume fraction, it suggests that the system is in equilibrium in terms of humidity. The volume fraction may not be high enough for fibrils to interact at shortest distance explaining the absence of structure factor. Collagen being extracted from non-corneal tissues, differences in scattering between synthetic and corneal matrices could result from the components forming the residual non-fibrillar organic matrix (see main text). Similarly to corneal tissue (Fratzl, P., & Daxer, A., Structural transformation of collagen fibrils in corneal stroma during drying, an X-ray scattering study, *Biophys. J.* 64, 1210-1214 (1993)), the SAXS profile of our material may be very sensitive to both the electron density contrast between fibrils and the surrounding solvent, and to some slight increase of local disorder **(Right)** Three

integrated 1D WAXS profiles of the transparent gel (*peaks artefacts). The intensity of the characteristic collagen diffraction signal (d ~ 5.5°), which corresponds to the lateral packing of the collagen molecules, is varying. The collagen diffraction signals corresponding to the axial repeat of the collagen triple helices (0.29 nm) is not observed being hidden with the water diffusion signal.

SI video 1/ showing a transparent gel at ~45 mg/mL which remains transparent upon mechanical handling. It is tough and easy to handle.

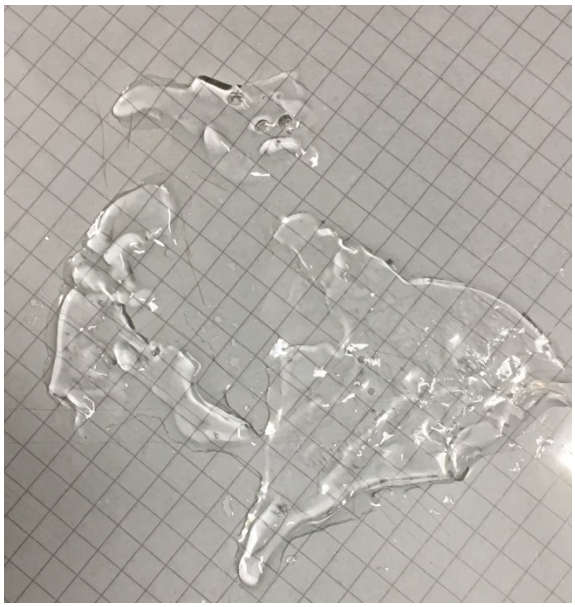


Fig. S9/ Image of a transparent matrix synthesized by evaporation. When handling, its qualitative behaviour was very different although the concentration was slightly below 45 mg/mL. The gel exhibits extreme softness and weakness that preclude performing tensile mechanical characterization.

Titre de la thèse

« Structuration en 3D de phases cristal-liquides pour la formation biomimétique de tissus osseux »

Résumé

L'os est un matériau hybride qui associe une trame organique dense et organisée de fibrilles de collagène (type I) et un réseau minéral d'hydroxyapatite. La formation de ce matériau à l'organisation si complexe a été souvent étudié d'un point de vue biologique dans la littérature. Comment étudier la morphogénèse des tissus osseux d'un point de vue physico-chimique et ainsi pouvoir reproduire l'organisation hiérarchique de ce matériau à l'échelle suprafibrillaire ?

Nous proposons d'identifier ces paramètres en appliquant *in vitro* des contraintes physiques aux mésophases du collagène et ainsi pouvoir contrôler l'arrangement spatial 3D des domaines orientés. Des chambres microfluidiques mimant les unités cylindriques de l'os cortical (*i.e.* ostéons) et différents procédés d'émulsion mimant l'interaction os trabéculaire-moelle osseuse ont été utilisés au cours de cette étude. Ces modèles d'os cortical et trabéculaire nous ont permis de mettre en évidence l'implication, notamment, du confinement, du flux en collagène et de la géométrie du réseau dans l'organisation fibrillaire résultante du tissu osseux.

Les microscopies optiques et électroniques révèlent que ces organisations biologiques sont issues de la texturisation des phases cristal-liquides du collagène à l'échelle macroscopique grâce à l'observation de la propagation de défauts inhérents à la géométrie des tissus. Cette étude ouvre des perspectives dans la compréhension des mécanismes physico-chimiques intervenant dans la morphogénèse et la biominéralisation osseuse ainsi que sur la caractérisation de l'organisation des domaines anisotropes *in vivo*. Ce travail ouvre des perspectives pour élaborer des échafaudages en 3D à hautes performances pour l'ingénierie tissulaire osseuse afin de réparer de plus larges défauts et de favoriser l'ostéoinduction.

Mots-clefs : collagène ; biomimétisme ; auto-assemblage ; microfluidique ; cristal-liquide

Abstract

Bone is a hybrid material that combines a dense and organized organic matrix of collagen fibrils (type I) and a mineral network of hydroxyapatite. The formation of this so complexly organized material has often been studied biologically in the literature. How to study the morphogenesis of bone tissue from a physicochemical point of view and thus be able to reproduce the hierarchical organization of this material at the suprafibrillary scale?

We propose to identify these parameters by applying physical constraints in vitro to the mesophases of collagen and thus be able to control the 3D spatial arrangement of the oriented domains. Microfluidic chambers mimicking the cylindrical units of cortical bone (i.e. osteons) and different emulsion processes mimicking the trabecular bone-bone marrow interaction were used in this study. These cortical and trabecular bone models allowed us to highlight the involvement, in particular, of containment, collagen flow and network geometry in the resulting fibrillar organization of bone tissue.

Optical and electron microscopies reveal that these biological organizations result from the texturization of the liquid crystal phases of collagen on a macroscopic scale by observing the propagation of defects inherent in the geometry of the tissues. This study opens up perspectives in the understanding of the physicochemical mechanisms involved in bone morphogenesis and biomineralization as well as in the characterization of the organization of anisotropic domains *in vivo*. This work opens prospects for developing high-performance 3D scaffolds for bone tissue engineering to repair larger defects and promote osteoinduction.

Keywords: collagen; biomimicry; self-assembly; microfluidics; liquid crystal