



HAL
open science

Conception d'un capteur impédancemétrique à base de peptides pour surveiller l'activité enzymatique de la protéase liée à l'inflammation des plaies : vers un pansement intelligent et connecté

Amandine Sandoval

► To cite this version:

Amandine Sandoval. Conception d'un capteur impédancemétrique à base de peptides pour surveiller l'activité enzymatique de la protéase liée à l'inflammation des plaies : vers un pansement intelligent et connecté. Ingénierie biomédicale. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONT044 . tel-03722885

HAL Id: tel-03722885

<https://theses.hal.science/tel-03722885>

Submitted on 13 Jul 2022

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Ingénierie Biomoléculaire

École doctorale ED 459 Sciences Chimiques Balard

Unités de recherche UMR 5247 – Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM)
Et UMR 5214 – Institut d'Électronique et des Systèmes (IES)

Conception d'un capteur impédancemétrique à base de
peptides pour surveiller l'activité enzymatique de la
protéase liée à l'inflammation des plaies :
Vers un pansement intelligent et connecté

Présentée par Amandine SANDOVAL
Le 12 juillet 2021

Sous la direction de Gilles SUBRA
Et Brice SORLI

Devant le jury composé de

Nicolas INGUIMBERT, Professeur, CRIOBE Perpignan
Chloé THIEULEUX, Directrice de recherche, CP2M / MMAGICC Lyon
Katia GRENIER, Directrice de recherche, LAAS-CNRS Toulouse
Gilles SUBRA, Professeur, IBMM Montpellier
Brice SORLI, Maître de conférences, IES Montpellier
Ahmad MEHDI, Professeur, ICGM Montpellier

Rapporteur
Rapporteuse
Examinatrice
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse
Encadrant de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Ce travail de thèse est issu de la collaboration entre trois équipes de recherche montpelliéraine : l'équipe « Acides-aminés, peptides et protéines » de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), l'équipe Capteur RFID et Électronique Flexible de l'Institut d'Électronique et des Systèmes (IES) et l'équipe de « Chimie Moléculaire et Organisation du Solide » de l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier (ICGM).

Je remercie l'I-Site MUSE qui a financé ce projet au travers des trois équipes citées précédemment grâce au programme ANR « Investissements d'avenir » (16-IDEX-0006).

Je tiens à remercier chaleureusement les membres du jury, Mesdames Chloé Thieuleux et Katia Grenier, et Monsieur Nicolas Inguibert d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je les remercie de m'avoir accordée de leurs précieux temps, notamment dans le contexte sanitaire actuel et de leurs fonctions de recherche et d'enseignement. Je les remercie pour leur évaluation pertinente de ces travaux, et pour les remarques et les conseils qui me permettront de progresser dans mon domaine d'expertise. Je voudrais remercier la Dr. Chloé Thieuleux et le Pr. Nicolas Inguibert, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Leurs rapports écrits seront appréciés, et je serai attentive à leurs conseils.

Je remercie le Pr. Jean Martinez pour m'avoir accueillie au sein du département et d'avoir été à l'origine de cette collaboration entre laboratoires, mais aussi pour ses corrections lors de rédaction de ma publication. Je remercie Monsieur Jean-Jacques Vasseur, Directeur Adjoint de l'IBMM et de l'École Doctorale Sciences Chimiques Balard, pour m'avoir accordé sa confiance en tant que membre du conseil de l'ED. Je remercie les Prs. Alain Foucaran, Pascal Dumy et Jean-Marie Devoisselle pour m'avoir accueillie au sein de l'IES, de l'IBMM et de l'ICGM respectivement, afin de réaliser ma thèse. Je remercie également le Dr. Emmanuel Le-Clézio, le Dr. Muriel Amblard et le Pr. Ahmad Mehdi pour m'avoir accueillie dans leurs trois équipes.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à mon directeur de thèse, le Pr. Gilles Subra. Tout d'abord, pour son encadrement à toute heure, mais aussi pour la confiance qu'il m'a accordée afin que je puisse mener à bien ce projet de thèse. Je le remercie pour ses discussions très enrichissantes et pour sa volonté à vouloir faire avancer la science. Je tiens sincèrement à remercier mon co-directeur de thèse, le Dr Brice Sorli, qui m'a donné l'opportunité de travailler avec lui sur ce projet de thèse en me recrutant. Je le remercie pour sa bonne humeur, ses discussions, mais aussi pour la liberté et la confiance qu'il m'aura accordé pour réaliser ce projet. Je remercie bien évidemment le Pr. Ahmad Mehdi pour sa disponibilité, ses corrections, son soutien et son enthousiasme tout au long de ce projet de thèse. Je les remercie de manière plus générale tous les trois, de m'avoir soutenue, et gardée motivée jusqu'à la fin de ce projet de thèse.

Je remercie également Pierre Sanchez pour les analyses de spectrométrie de masse mais aussi sa disponibilité et son aide. Je remercie Luc Brunel pour sa bonne humeur et son aide durant ma thèse. Je remercie aussi le Dr. Pascal Verdié, pour la formation que j'ai reçu durant mon

stage et qui m'a permis de travailler au sein de la plateforme SynBio3 durant mon projet de thèse.

Je tenais à remercier plus particulièrement le Dr. Benoît Charlot, qui m'a initié au milieu de la recherche et sans qui je ne serai pas là où j'en suis maintenant. Merci pour tes idées, ta motivation, et d'avoir apporté de la bonne humeur durant mon travail au sein du laboratoire. Je remercie chaleureusement le Dr. Michel Ramonda pour son temps accordé pour m'aider dans mes analyses AFM, pour sa bonne humeur et ses encouragements. Merci au Dr. Alain Giani qui m'a permis notamment l'accès à la Salle Blanche. Merci Frédéric Pichot et Jean-Marie Peiris pour votre aide dans la conception de mes échantillons mais surtout pour votre accueil au sein de la salle blanche, la formation que j'ai pu recevoir, allant de mon stage de master jusqu'à la fin de ma thèse.

Je remercie le Dr. Laurent Devel qui m'a permis en stage de master de me former sur la digestion enzymatique des MMP au sein de CEA de Saclay. Je remercie le Dr. Vincent Humblot pour les analyses XPS, pour son aide apportée dans la rédaction de mon article et plus généralement durant mon travail de thèse. Je remercie également le Dr. Sébastien Balme qui m'a permis de réaliser des analyses d'épifluorescence.

Pauline, Ameni, et Anna, je vous remercie d'avoir rendu agréable mon quotidien, vraiment j'ai de la chance de vous avoir rencontrées et de partager cette amitié avec vous toutes. Une pensée pour Bénédicte. Je remercie la Dr. Séverine Denoyelle, pour ta bonne humeur quotidienne et de m'avoir fait partager ton bureau lors du déconfinement. Je remercie également mes autres collègues de l'IBMM, les Drs. Lubomir Vezekov, Baptiste Legrand, Anthony Martin, Guillaume Laconde, Mathieu Simon, Jean-Alain Fehrentz, Sonia Cantel, Laurent Gavara, Ludovic Maillard et Jean-François Hernandez, le Pr. Nicolas Masurier, et bien sûr Emmanuelle Retière, Lyne-Rose Poudroux et Bruno Maurel. Je remercie également le Dr. Morgan Pellerano pour sa gentillesse, et de m'avoir apporté son expertise sur les tests enzymatiques que j'ai réalisés au cours de ma thèse.

Une pensée à mon ancienne collègue de bureau côté IES, Afaf, merci pour ces années passées à tes côtés, accompagnées de fous-rires, mais surtout de motivation, j'en garde un excellent souvenir. Évidemment, je remercie Benjamin de m'avoir épaulé et encore plus en cette fin de thèse, vraiment, merci. Je n'oublie pas les Drs. Sylvain Dutrieux, Rudy Desgarceaux, Florian Baudry, Daniel Diaz-Thomas, Zeineb Loghmari, Arnaud Vena, Adrien Carretero, Ricardo Garcia Bermejo et le Pr. Philippe Combette, ainsi que Manon, Isabelle, Audrey, Oramany, Claire, Chayma, Tatiana, Sophie, Lauris, Cahu, David, Alexandre, Baptiste, Léo, Alaeddine et Jean-Marc Aniel.

J'espère n'avoir oublié personne, et si c'est le cas, je m'en excuse par avance.

Merci à mes amis de longue date, Laura, Sofya, Sauveur, Guillaume, Samantha, Margaux, et Sébastien. Une pensée particulière pour Camille, je suis ravie qu'on se soit rencontrées à Phytocontrol et que depuis, notre amitié dure ; courage à toi et aux mois à venir, c'est bientôt ton tour !

Merci à mes amis de la fac, Andrea, Ana, Anthony, Karim et Kévin. Vous êtes des personnes formidables, et j'espère qu'avec le temps nous continuerons à nous retrouver et organiser des voyages.

Une pensée pour *toi*, tu as été formidable tout au long de ma thèse, merci de m'avoir soutenu, et en particulier en période de rédaction.

Enfin, je remercie très fortement mes parents et mon frère qui m'ont soutenue au cours de toutes mes années d'études. C'est un plaisir de passer des week-ends ou des semaines en si bonne compagnie. Vous avez été l'un des meilleurs soutiens durant ce travail de thèse et je vous en remercie et vous aime du fond de mon cœur. De meilleurs jours restent encore à venir, peut-être à New-York...

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	4
Table des figures	7
Table des tableaux	12
Table des équations	13
Abréviations	14
Avant-propos	18
Chapitre 1. État de l'art : du papyrus au pansement multifonctionnel connecté	22
Partie 1. Plaies et cicatrisations, des plaies aiguës aux plaies chroniques	24
1.1. Les plaies et la cicatrisation.....	24
1.2. Les plaies chroniques.....	28
Partie 2. Les pansements	35
2.1. Présentation et intérêt des pansements.....	35
2.2. Les pansements bioactifs	35
2.3. Les pansements connectés ou intelligents.....	46
2.4. Les pansements intelligents associés à une partie capteur.....	56
Partie 3. Les protéases	57
3.1. Généralités sur les protéases	57
3.2 Les métalloprotéases matricielles (MMP).....	59
3.3. Les MMP dans la cicatrisation	66
3.4. Les MMP dans les plaies chroniques	66
Partie 4. Stratégie et cahier des charges de ce projet de thèse	67
Chapitre 2. Conception d'un matériau peptidique hybride sensible à une activité enzymatique	71
Partie 1. Polymérisation par procédé sol-gel	72
1.1. Généralités.....	72
1.2. Étape d'hydrolyse	73
1.3. Étape de condensation	75
Partie 2. Choix des séquences et conception des substrats peptidiques	79
2.1. Choix des substrats peptidiques.....	79
2.2. Design des peptides hybrides.....	87
Partie 3. Synthèse de peptides hybrides silylés	92
3.1 Généralités.....	92
3.2. La synthèse peptidique sur support solide (SPPS).....	92
3.3. Purification	102
3.4. Silylation.....	102

Partie 4. Étude de la dégradation des peptides hybrides silylés en solution par une activité enzymatique : la MMP-13	107
4.1. Activation de la pro MMP-13	107
4.2. Dosage de la MMP-13.....	107
4.3. Test de l'activité enzymatique de la MMP-13	108
4.4. Étude de l'activité enzymatique de la MMP-13 sur le substrat peptidique hybride en solution.....	109
 Chapitre 3. Matériaux peptidiques hybrides dégradables par l'activité enzymatique de la MMP-13.....	118
Partie 1. Préparation d'une couche de matériau hybride dégradable sur un capteur modèle en or et caractérisation physicochimique.....	120
1.1. Généralités sur la fonctionnalisation de surfaces métalliques par des peptides hybrides	120
1.2. Fonctionnalisation de surfaces en or par des peptides hybrides	121
1.3. Fonctionnalisation de supports en oxyde d'aluminium poreux par des peptides hybrides.....	125
Partie 2. Caractérisation de surface métallique en or fonctionnalisée par des peptides hybrides	130
2.1. MEB-EDX	130
2.2. Microscopie à fluorescence.....	134
2.3. XPS.....	137
2.4. AFM	143
Partie 3. Caractérisation de surface métallique en Al₂O₃ fonctionnalisée par des peptides hybrides	149
3.1. MEB	149
3.2. XPS.....	151
 Chapitre 4. Étude par mesure d'impédance du capteur modifié avec le matériau peptidique hybride.....	154
Partie 1. Généralités des mesures des propriétés électriques du capteur.....	156
1.1. Introduction au capteur	156
1.2. Notion d'impédance électrique.....	157
1.3. Les électrodes interdigitées comme capteurs d'impédance et de capacité.....	161
Partie 2. Caractérisation électrique d'un matériau peptidique hybride greffé sur des électrodes interdigitées en or	164
2.1. Mesure électrique de la surface de l'IDE en or fonctionnalisée	165
2.2. Mesure électrique du greffage du matériau peptidique hybride sur l'IDE en or.....	166
2.3. Étude de la résistance du matériau S4 dans un tampon par mesure électrique.....	168
2.4. Intérêt du ferrocène en tant qu'amplificateur de signal.....	169
2.5. Étude de l'activité enzymatique de la MMP-13 sur le matériau par mesure électrique.....	170
2.6. Étude de l'activité enzymatique de la MMP-13 sur le matériau en (D)	173
Partie 3. Caractérisation électrique du matériau peptidique hybride greffé sur l'Al₂O₃ poreux	175
3.1. Stabilité de la mesure électrique sur le capteur en Al ₂ O ₃ non greffé	175
3.2. Mesure électrique du greffage du matériau peptidique hybride sur le capteur en Al ₂ O ₃	176
3.3. Étude de la résistance du matériau S4 dans un tampon par mesure électrique sur le capteur en Al ₂ O ₃	177
 Conclusion et perspectives.....	180

Références182

Table des figures

Figure 1. Dispositif général.	18
Figure 2. Dispositif RFID-Capteur.	19
Figure 3. Principe de la technologie de ce dispositif.....	20
Figure 4. Structure de la peau.....	24
Figure 5. Biologie de la plaie : les 4 phases de la cicatrisation.	26
Figure 6. Localisation des escarres (Source : escarre.fr).	29
Figure 7. Ulcère veineux de la jambe (Source : medicinus.net).	30
Figure 8. Structure chimique de l'alginate.....	36
Figure 9. Mécanisme d'action du pansement d'alginate (Source : Klinion, Media).	37
Figure 10. Représentations des structures de polyisobutylène, CMC sodique, pectine et gélatine.	39
Figure 11. Hydrocolloïde sous forme de pâte, Algoplaque Pâte, Laboratoire Urgo.....	40
Figure 12. Représentation schématique du collagène (Source : X115® Magazine).	41
Figure 13. Structure chimique de l'acide hyaluronique.	43
Figure 14. Désacétylation partielle de la chitine en chitosane.....	45
Figure 15. La thérapie par pression négative. (Source : ActuSoins)	46
Figure 16. Schéma du dispositif de thérapie par pression négative. (Source : ActuSoins).....	47
Figure 17. Principe de fonctionnement d'un biocapteur.	48
Figure 18. (A) Vue d'ensemble de DETEC® pH. (B) Schéma du test de DETEC® pH	49
Figure 19. Test clinique de DETEC® pH sur une plaie à cicatrisation normale (A) et sur une plaie chronique (B).	50
Figure 20. Un pansement intelligent multifonctionnel à base d'hydrogel et de nanoparticules multifonctionnelles pour la surveillance des infections par fluorescence et la libération d'antibiotiques déclenché par spectroscopie proche infrarouge.....	53
Figure 21. Les différents types de protéases. Le placement des sous-sites correspond à ceux de l'endopeptidase.....	57
Figure 22. Mécanisme d'action des protéases à cystéine, sérine et thréonine.	58
Figure 23. Mécanisme d'action des protéases à acide aspartique, glutamique et les métalloprotéases.	59
Figure 24. Classification générale des MMP.....	62

Figure 25. Représentation 3D de l'interaction entre le domaine catalytique de la MMP-13 et des 5 résidus du domaine N-ter du TIMP-2.....	65
Figure 26. Modèle combinant les propriétés électriques du capteur IDE sur le matériau avant et après une activité enzymatique.....	69
Figure 27. Principe du procédé sol-gel et mises en forme possible.	73
Figure 28. Taux de réaction de l'hydrolyse (courbe bleue) et de la condensation (courbe rouge) du TEOS en fonction du pH.....	74
Figure 29. Effets du pH sur la croissance et la structure d'un gel.....	76
Figure 30. Schéma général du procédé de dip-coating.....	77
Figure 31. Dépôt du biomatériau par casting. Créé à partir de biorender.com.....	77
Figure 32. Représentation de la MMP-13 avec son peptide provenant du pro domaine ¹⁴⁵ (Source : rcsb.org).	80
Figure 33. Représentation des différents domaines de la MMP-13 d'après BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	81
Figure 34. Représentation du substrat Mca-Mat.....	82
Figure 35. Tableau de spécificité de la MMP-13. Inspiré à partir de MEROPS.....	83
Figure 36. Structure tridimensionnelle de l'élastase des neutrophiles humains (HNE) (Source : Expasy).....	84
Figure 37. Tableau de spécificité de la HNE. Inspiré à partir de MEROPS.....	85
Figure 38. Substrat fluorescent MeOSuc-A-A-P-V-AMC.....	86
Figure 39. Deux représentations du ferrocène carboxylique acide.....	87
Figure 40. Peptide mono fonctionnel silylé.....	88
Figure 41. Peptide bi fonctionnel bis-silylé.....	89
Figure 42. Formule générale d'un peptide hybride silylé.....	92
Figure 43. Principe de la SPPS.....	93
Figure 44. Principe général de la SPPS par stratégie Fmoc/tBu pour la préparation de peptide C-terminaux amidés sur une résine portant un linker Rink Amide.....	94
Figure 45. Liste des aminoacides utilisés durant ce travail de thèse.....	96
Figure 46. Ancrage du premier aminoacide C-terminal sur un support solide fonctionnel avec le linker Fmoc-Rink Amide.	97
Figure 47. Déprotection du groupement Fmoc.	98
Figure 48. Activation et couplage peptidique.....	99
Figure 49. Mécanisme de couplage de l'amide par l'activation de l'HATU.....	100

Figure 50. Déprotection de l'Alloc et couplage du groupement métallocène ou du groupement fluorescent.	101
Figure 51. Synthèse de peptide hybride hydrolysable. En A, le peptide monosilylé. En B, le peptide bis-silylé.	103
Figure 52. Schématisation du principe d'analyse LC/MS.	104
Figure 53. LC/MS peptide hybride 4 bis-silylé.	106
Figure 54. Design de la microplaque 96 puits pour tester l'activité enzymatique de la MMP-13.	108
Figure 55. Activité enzymatique de la MMP-13.....	109
Figure 56. Peptide hybride bis-silylé n°5.	110
Figure 57. Fragments issus de la coupure du peptide hybride 5 obtenus après la digestion de la MMP-13 en solution : fragments 5a, 5b et 5c.	110
Figure 58. LC/MS du peptide hybride bis-silylé 5 en solution dans un tampon.....	112
Figure 59. Étude de la dégradation du peptide hybride 5 (C = 1 mM) par la MMP-13 dans le tampon T durant 24 heures.....	113
Figure 60. LC/MS du peptide hybride 5 fragmenté après digestion enzymatique par la MMP-13.....	114
Figure 61. Électrodes interdigitées en or (IDE).....	121
Figure 62. Images topographiques obtenues par AFM de S0 en or (A), de S4 (B) et S4-lav (C).	123
Figure 63. Surface en or modifiée par le MPTMS.	123
Figure 64. Représentation schématique du greffage des peptides hybrides sur la surface en or préalablement fonctionnalisée par du MPTMS.....	125
Figure 65. Photo du support en oxyde d'aluminium poreux.....	125
Figure 66. Pré traitement du support d'aluminium sur PET avant anodisation.....	126
Figure 67. Support en oxyde d'aluminium poreux (Al ₂ O ₃). Les électrodes représentées en gris foncé sont en aluminium et toute la zone gris clair correspond à de l'Al ₂ O ₃	128
Figure 68. Représentation schématique du greffage du biomatériau sur support d'Al ₂ O ₃ ...129	129
Figure 69. Analyse EDX du support en or vierge : échantillon S0	131
Figure 70. Analyse EDX du support en or après fonctionnalisation par MPTMS : S-MPTMS	132
Figure 71. Image prise en microscopie électronique de l'échantillon S4 (gauche) et illustration du matériau peptidique hybride correspondant (droite).	132

Figure 72. Analyse MEB-EDX du matériau peptidique hybride greffé sur le support en or : S4	133
Figure 73. Analyse MEB-EDX du matériau peptidique hybride après activité enzymatique de la MMP-13 : S4-MMP	134
Figure 74. Couche de biomatériau sur l'or préparé par le peptide hybride 6	135
Figure 75. Image prise par microscopie à fluorescence de l'échantillon S-MPTMS.	135
Figure 76. Image prise par microscopie à fluorescence du matériau peptidique hybride contenant le fluorochrome : S6	136
Figure 77. Image (centre) prise par microscopie à fluorescence du matériau peptidique hybride après l'activité enzymatique de la MMP-13 : S6-MMP	136
Figure 78. Énergies de liaisons atomiques de Au4f et de N1s pour les différentes étapes du processus d'étude du matériau sur l'or.	140
Figure 79. Énergies de liaisons atomiques de Fe2p et de Si2p pour les différentes étapes du processus d'étude du matériau sur l'or.	141
Figure 80. Illustration de l'analyse par AFM de l'échantillon Au-Fe. Créé à partir de Biorender.com.	144
Figure 81. Image obtenue par AFM (topographie) de l'échantillon S0	145
Figure 82. Image obtenue par AFM (topographie) de l'échantillon S4	146
Figure 83. Détermination de l'épaisseur du matériau S4 par AFM.	147
Figure 84. Image obtenue par AFM (topographie) de l'échantillon S4-MMP	148
Figure 85. Contrôle par MEB de l'état de surface de l' Al_2O_3	150
Figure 86. Greffage du matériau peptidique sur l' Al_2O_3	151
Figure 87. Énergies de liaison de l'atome d'azote N1s des échantillons S4, S4-lav et S4 lavé durant 72h.	152
Figure 88. Schématisation du dispositif RFID-Capteur.....	155
Figure 89. Modèle électrique parallèle type d'un capteur à électrodes interdigitées.....	156
Figure 90. Condensateur à plaques parallèles, cas d'un courant continu.	157
Figure 91. Condensateur à plaques parallèles, cas d'un courant alternatif.....	158
Figure 92. Diagramme vectoriel de la tangente de perte.	159
Figure 93. Influence des différents types de polarisation sur les paramètres diélectriques.	160
Figure 94. Représentation des phénomènes de polarisation.	160
Figure 95. Représentation de la structure interdigitée : IDE (Micrux Technologies).	161

Figure 96. A, condensateur à plaques parallèles. B, électrodes légèrement écartées. C, électrodes complètement ouvertes.....	162
Figure 97. Photo de l'appareillage de mesure.....	164
Figure 98. Courbes représentant la capacité électrique (A) et $\tan \delta$ (B) des échantillons S0 (courbe noire) et S-MPTMS (courbe rouge) en fonction de la fréquence.....	166
Figure 99. Courbes représentant la capacité électrique (A) et $\tan \delta$ (B) du matériau greffé S4 sur le capteur en or, en fonction de la fréquence.	167
Figure 100. Courbes représentant la capacité électrique (A) et $\tan \delta$ (B) du matériau peptidique hybride avant (S4, courbe vert foncé) et après différents lavages (courbe vert clair).....	168
Figure 101. Peptides hybrides 6 et 7.....	169
Figure 102. A et B, comparaison de la capacité électrique et de $\tan \delta$ du matériau peptidique hybride S4 (courbe verte) et S6 (courbe orange). C et D, comparaison de la capacité électrique et de $\tan \delta$ du matériau peptidique hybride S4 (courbe verte) et S7 (courbe violette).....	170
Figure 103. Courbes représentant la dégradation du matériau S4 (courbe verte) par la MMP-13 (S4-MMP, courbe rose). A représente la capacité électrique et B, le facteur de dissipation $\tan \delta$	171
Figure 104. Comparaison de la capacité électrique (A) et de $\tan \delta$ (B) du matériau peptidique hybride S4 (courbe verte) et S6 (courbe orange) après la digestion enzymatique de la MMP-13 (S4-MMP et S6-MMP , respectivement).....	172
Figure 105. Courbes représentant le matériau S8 (courbe grise) dans le tampon biologique T sans l'enzyme et le matériau S8-MMP (courbe jaune) dans le tampon biologique T en présence d'enzyme.....	174
Figure 106. Étude de la stabilité de S0 dans un tampon biologique T en fonction de la fréquence.....	176
Figure 107. Greffage du matériau hybride S4 sur l' Al_2O_3 (S0).....	177
Figure 108. Étude de la covalence du greffage de S4 sur le capteur en Al_2O_3	178

Table des tableaux

Tableau 1. Classification sur le pied du diabétique selon l'IWGDF.....	31
Tableau 2. Pansements bioactifs à base de matériaux d'alginate. Les remarques sont indiquées par les fabricants.	38
Tableau 3. Pansements bioactifs hydrocolloïdes.....	41
Tableau 4. Pansements à base de collagène.	43
Tableau 5. Classification des MMP.....	60
Tableau 6. Exemples de substrats de la MMP-13. Avec X correspondant à un aminoacide variable.	83
Tableau 7. Exemples de séquences consensus de substrats de la HNE. Avec X correspondant à une variété d'acides aminés différents.	86
Tableau 8. Liste des peptides hybrides synthétisés durant cette thèse.	91
Tableau 9. Dégradation du peptide hybride 5 par la MMP-13 au bout de 24 heures, en fonction de la concentration d'enzyme MMP-13.	115
Tableau 10. Liste des matériaux réalisés au cours de ce travail de thèse.	119
Tableau 11. Données répertoriant les pourcentages atomiques obtenus par XPS pour toutes les étapes du processus.	139
Tableau 12. Liste des densités de peptides greffés sur une surface métallique en or.	142
Tableau 13. Pourcentages atomiques des énergies de liaison obtenues par XPS pour les échantillons en oxyde d'aluminium poreux.	152
Tableau 14. Liste des matériaux caractérisés par mesure d'impédance électrique.....	155

Table des équations

Équation 1. Réaction d'hydrolyse.	73
Équation 2. Réaction d'hydrolyse en catalyse acide.	74
Équation 3. Réaction d'alcoxolation.	75
Équation 4. Réaction d'oxolation.	75
Équation 5. Équation selon la loi de Beer-Lambert.	107
Équation 6. Vitesse de formation de la couche d'oxyde d'aluminium.	127
Équation 7. Calcul de l'épaisseur de la couche peptidique hybride.	138
Équation 8. Calcul du nombre de peptide par cm^2	138
Équation 9. Formule générale de l'impédance électrique.	157
Équation 10. Calcul du facteur de dissipation.	159
Équation 11. Formule de module d'impédance électrique adaptée au dispositif choisi.	162

Abréviations

AA : amino acids

AFM : atomic force microscope

AH : hyaluronic acid

Alloc : allyloxycarbonyl

APMA : p-aminophenylmercuric acetate

APTES : aminopropyltriethoxysilane

Boc : tert-butoxycarbonyl

CMC : carboxyméthylcellulose

DBF : dibenzofulvene

DCM : dichloromethane

DIEA : N,N-Diisopropylethylamine

DMF : N,N-Dimethylformamide

DRO : dérivés réactifs de l'oxygène

EEPROM : electrically erasable programmable read-only memory

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

ENH : élastase des neutrophiles humains (ou HNE : human neutrophil elastase)

ERB : élément de reconnaissance biomoléculaire

Et₂O : diethyl ether

FDA : food and drug administration

FITC : fluorescein isothiocyanate

Fmoc : 9-fluorenylmethoxycarbonyl group

FRET : fluorescence resonance energy transfert

HATU : O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate

HF : high frequency

HIF1 : hypoxia-inducible factor 1

HPX : hemopexin

ICPTES : 3-(Triethoxysilyl)propyl isocyanate

ICPTMeS : 3-isocyanatopropyl trimethylsilane

IL : interleukine

IVC : chronic venous insufficiency

IWGDF : international working group on the diabetic foot

LC/MS : liquid chromatography-mass spectrometry

LF : low frequency

MBHA : methylbenzhydramine

MCP : monocyte chemoattractant protein

MEC : extracellular matrix

MEB : microscopie électronique à balayage

MMP : matrix metalloproteinases

NFC : near field communication

NIR : Near-infrared spectroscopy

Pbf : 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl

Pd(PPh₃)₄ : tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)

PDGF : platelet-derived growth factor

PDMS : polydimethylsiloxane

PEG : polyethylene glycol

PhSiH₃ : phenylsilane

PS : polystyrene

PVA : polyvinyl alcohol

RE : endoplasmic reticulum

RFID : radio frequency identification

RP-HPLC : reverse-phase high performance liquid chromatography

SFFPS : société française et francophone des plaies et cicatrisations

SIE : electrochemical impedance spectroscopy

Sol-gel : solution-gelification

SPPS : solid-phase peptide synthesis

TCNB : Tris, CaCl₂, NaCl, Brij-35, pH 7.5 (noté T dans le manuscrit)

tBu : tert-butyl

TEOS : tetraethyl orthosilicate

TFA : trifluoroacetic acid

TGF-β1 : Transforming growth factor beta 1

TIMP : tissue inhibitors of matrix metalloproteinases

TIS : triisopropylsilane

TPN : negative pressure therapy

TWTCP : tertryptophan ter-cyclo pentane

UV : ultraviolets

XPS : X-Ray photoelectron spectrometry

Avant-propos

Avant-propos

La prise en charge des plaies reste un domaine thérapeutique diversifié et complexe ; notamment à cause de la très grande diversité de type de blessures et de leurs étiologies (tailles, formes, stades, infection...).

Dans ce contexte, un pansement « intelligent » capable de communiquer « sans fil » serait une aide précieuse pour le personnel médical afin de l'informer sur la nécessité de changer le pansement ou d'instiller des médicaments au sein de la plaie (antibiotiques ciblés, anti-inflammatoires, pro-cicatrisants...). Plusieurs dispositifs sont en cours de développement mais restent limités dans leur usage. Certains ne sont pas intégrés au pansement et nécessitent un prélèvement ; la majeure partie des systèmes reposent sur un changement de coloration dans le pansement.

Parmi les biomarqueurs possibles utilisés par ces dispositifs, la présence de protéases surabondantes est particulièrement pertinente car elle peut être liée à une inflammation ou à une infection. Elles dégradent les chaînes peptidiques des protéines en catalysant l'hydrolyse des liaisons amides entre différents résidus en fonction de leur spécificité. A notre connaissance, il n'existe pas de dispositif associé à un pansement, pour la détection de l'activité protéasique de l'enzyme in situ.

Dans ce contexte, nous proposons de travailler au développement d'un nouveau type de capteur basé sur l'activité enzymatique. Ce dispositif sans fil, intégré au pansement sera capable à la fois d'acquérir des données et de les transmettre par un signal électrique permettant de suivre l'évolution de la plaie, présenté dans la Figure 1.

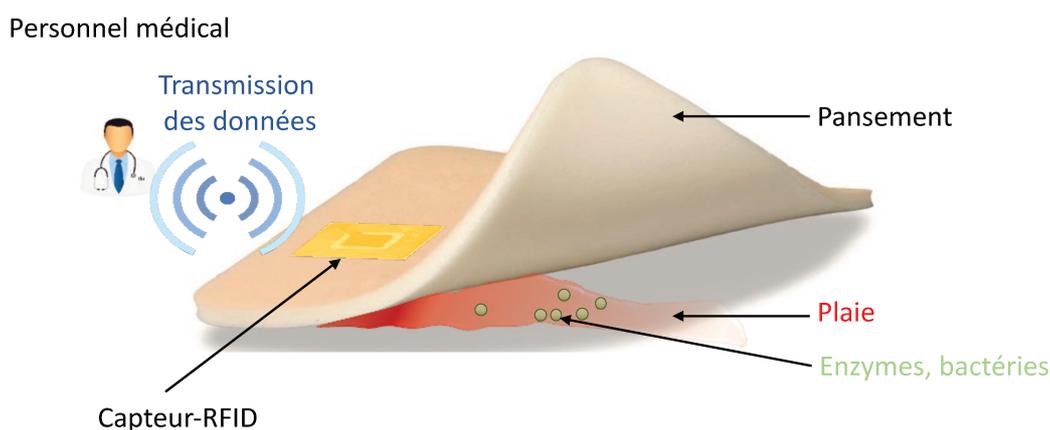


Figure 1. Dispositif général.

L'objectif de ce travail de thèse, est de démontrer la faisabilité d'un pansement intelligent connecté. L'idée principale est de se servir de la technologie d'identification radiofréquences

(RFID) couplée à une partie capteur où un peptide hybride spécifique a été greffé et dont l'interaction avec une enzyme ciblée fait évoluer la réponse électrique du capteur.

Comme le montre la Figure 2 ci-dessous, notre dispositif est composé de deux parties : la communication avec la partie RFID (antenne / puce) et la partie sensible que nous appellerons dans la suite de ce manuscrit capteur.

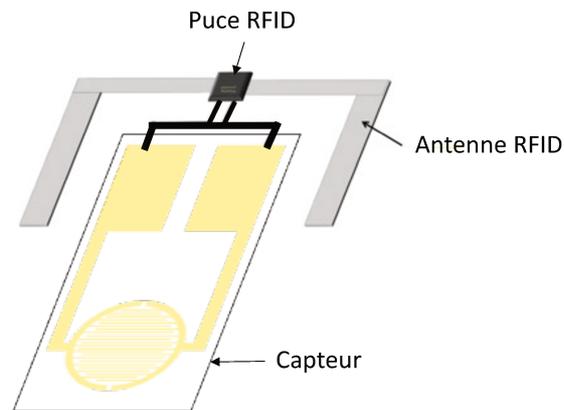


Figure 2. Dispositif RFID-Capteur.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons focalisé nos efforts sur la mise au point de ce capteur et de sa réponse en présence d'enzyme. Pour y parvenir, nous avons sélectionné comme biomarqueurs, des protéases surexprimées dans les plaies chroniques : la MMP-13, une métalloprotéase matricielle qui témoigne d'une inflammation, et l'élastase des neutrophiles humains (HNE) qui témoigne d'une infection.

Notre stratégie a été de modifier la surface de ce capteur en greffant un matériau hybride contenant des séquences de peptides reconnues et spécifiques de ces protéases. Nous avons émis l'hypothèse que la dégradation de ce matériau entraînerait une modification suffisante des propriétés électriques du capteur pour qu'elle puisse être détectée, témoignant de la présence d'enzymes actives. Ces matériaux innovants sont préparés par le procédé sol-gel à partir de peptides hybrides, possédant un ou plusieurs groupes alcoxysilanes capables de former un réseau tridimensionnel par polymérisation à la surface de l'antenne. Afin d'améliorer la sensibilité, nous avons rajouté un groupement métallocène aux peptides qui seront dégradés, permettant de modifier significativement le signal électrique (Figure 3).

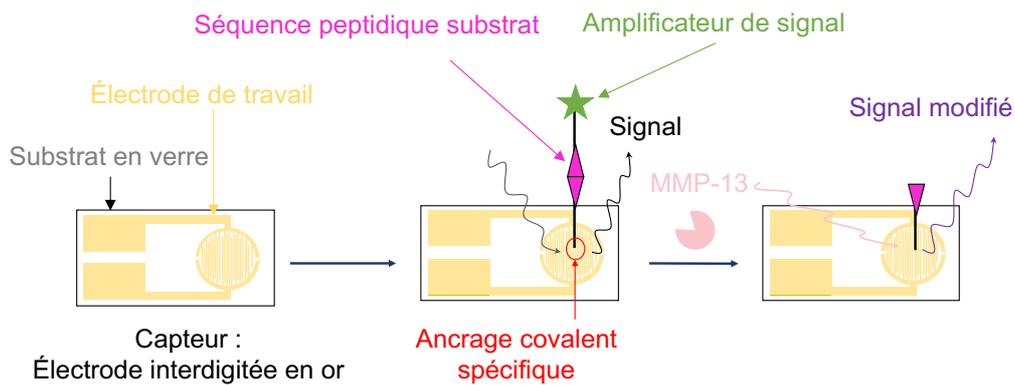


Figure 3. Principe de la technologie de ce dispositif.

Le manuscrit de thèse est organisé en quatre chapitres, dont le premier présente un état des lieux des plaies chroniques. Les facteurs entraînant leur chronicité, et notamment les pansements utilisés dans la gestion de ces plaies allant du simple pansement au pansement intelligent, seront évoqués.

La conception, la synthèse et la caractérisation des peptides hybrides sont présentées dans le deuxième chapitre qui détaille également la polymérisation minérale (sol-gel). Le troisième chapitre présente la caractérisation physicochimique de ces matériaux, avant greffage, après greffage, en milieu biologique et après l'action d'une activité enzymatique. Il s'agit notamment d'analyse par AFM (microscope à force atomique), MEB-EDX (microscope électronique à balayage associé à la microanalyse par énergie dispersive de rayons X) ou par XPS (spectrométrie photoélectronique X).

Le dernier chapitre présente la caractérisation électrique de l'antenne modifiée avec ce matériau hybride en mesurant l'impédance électrique en particulier.

L'ensemble de ces résultats issus des analyses physicochimiques et des mesures électriques, obtenus sous l'action de ces enzymes peuvent être corrélés et sont discutés dans les deux derniers chapitres. Ces travaux ouvrent la voie à l'intégration de ce type de capteur au sein de dispositifs RFID par exemple qui pourraient permettre de concevoir des pansements intelligents.

Chapitre 1 :

État de l'art : du papyrus au pansement multifonctionnel connecté

Chapitre 1. État de l'art : du papyrus au pansement multifonctionnel connecté

L'histoire du traitement des plaies s'étend de la préhistoire à la médecine moderne. En 2000 av. J.-C, le plus ancien des manuscrits décrit pour la première fois les trois principaux gestes de la guérison, (i) le lavage des plaies, (ii) la fabrication du médicament et (iii) la couverture de la plaie. La première civilisation à utiliser des pansements adhésifs ayant pour fonctions principales : (i) une fonction de protection avec un pansement composé de miel et de graisse et (ii) une fonction de drainage des plaies avec de la charpie (amas de fils tirés de vieilles toiles végétales absorbantes) date de l'Égypte ancienne. En 460 av. J.-C en Grèce, Hippocrate établit plusieurs recommandations sur la prise en charge des plaies, encore considérées de nos jours, avec notamment une haute propreté dans le traitement des plaies. Les Romains ont ensuite mis en place les « 4 signes cardinaux de l'inflammation » avec (i) la rougeur, (ii) le gonflement, (iii) la chaleur et (iv) la douleur. Inspirés par les Grecs, et jusqu'au Moyen-Âge, les romains ont continué à traiter les plaies en utilisant du matériel chirurgical, différents types de pansements et différentes formulations déposées au niveau de la plaie avec du gel, des pommades ou des crèmes. Ce n'est qu'à la Renaissance, où les armes à feu ont commencé à être utilisées que les plaies deviennent plus compliquées à traiter et sont cautérisées par le fer rouge ou l'huile bouillante dont les douleurs ressenties par les militaires sont insoutenables.

Le père de la chirurgie moderne, Ambroise Paré, remplace en 1537 ces moyens de cautérisation par un mélange de jaune d'œuf, d'huile de rose et de térébenthine. Au 19^{ème} siècle la charpie est remplacée par le coton et la gaze. C'est à cette époque que Louis Pasteur met en évidence les germes responsables de la fermentation et de la putréfaction des plaies. Il met ainsi en place des techniques antiseptiques pour réduire et contrôler les infections induisant des taux de mortalité élevés. Par la suite, la découverte des premiers anesthésiques va révolutionner la chirurgie. Le traitement des plaies fait un véritable bond en avant au début du 20^{ème} siècle. Auguste Lumière est l'un des pionniers de la cicatrisation moderne en mettant au point un nouveau type de pansement, le « Tulle gras Lumière », semi-occlusif, non adhérent et en particulier, stérile. Il a aussi mis en place les règles d'un bon pansement : (i) être changé tous les jours au début, puis moins fréquemment, (ii) être non-adhérent, et (iii) fermé avec un bandage stérile afin d'éviter que la plaie ne soit en contact avec le milieu extérieur. Ce n'est qu'en 1960, que Georges Winter démontre que les plaies cicatrisent mieux et plus rapidement en milieu humide et occlusif. Dès les années 1980 apparaissent les hydrocolloïdes qui ont permis de révolutionner le traitement des plaies. Mais leurs inconvénients comme la macération ou les odeurs émises au niveau de la plaie ont fait poursuivre la recherche de nouveaux pansements comme les hydrocellulaires. Dès le début des années 2000, les pansements possédant des principes actifs explosent sur le marché. De nos jours, énormément de produits commerciaux sont destinés spécifiquement au soin d'une plaie grâce à l'élaboration de différents matériaux.

La première partie de ce chapitre aborde les différents types de plaies et leur cicatrisation, avec une approche plus centrée sur les plaies chroniques. La deuxième partie de ce chapitre présente les différents types de pansements utilisés dans la gestion des plaies chroniques allant du pansement simple au pansement intelligent. La troisième partie traite des protéases, un marqueur biologique important et intervenant dans la gestion des plaies chroniques. La quatrième partie du chapitre présente l'objectif du projet de thèse et le cahier des charges qui en découle afin de le réaliser.

Partie 1. Plaies et cicatrisations, des plaies aiguës aux plaies chroniques

1.1. Les plaies et la cicatrisation

1.1.1. La peau : structure, physiologie et renouvellement

La peau est l'organe le plus grand et le plus lourd de notre organisme. Chez l'adulte, elle représente en moyenne 2,3 m² et environ 10 à 16% de la masse totale du corps.¹ Cette enveloppe vivante, représentée dans la Figure 4, est la première barrière qui protège notre corps. Elle est constituée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme, de la couche la plus superficielle à la plus profonde.

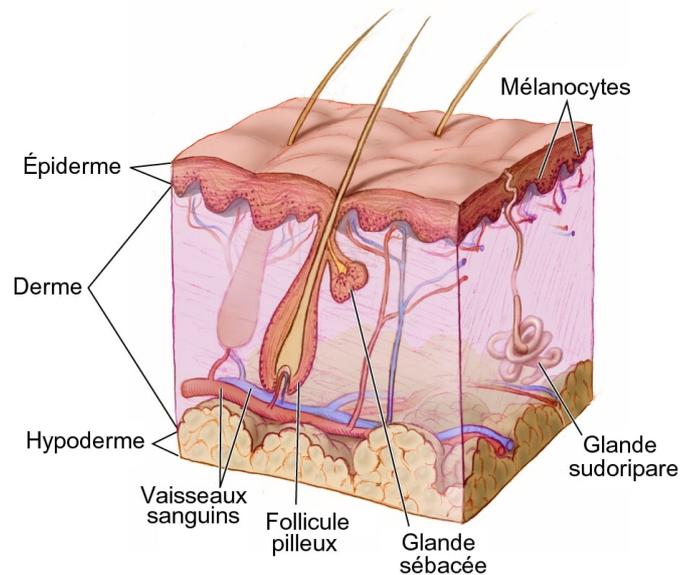


Figure 4. Structure de la peau.²

La couche superficielle, l'épiderme, est un tissu non vascularisé d'épaisseur de 0,5 à 1 mm. Son rôle principal est d'assurer l'imperméabilité et la résistance de la peau.³⁻⁵ Il s'agit d'un épithélium pavimenteux pluristratifié⁶ qui est composé de deux types de cellules, (i) les kératinocytes à 90-95% et (ii) les mélanocytes. Les kératinocytes sont responsables de la synthèse d'une protéine, la kératine qui assure l'imperméabilité de la peau et la rend plus résistante aux agressions extérieures. Les mélanocytes, produisant la mélanine, permettent de pigmenter la peau et de la protéger des rayonnements ultraviolets (UV).

Le derme est un tissu conjonctif très vascularisé de 1 à 4 mm d'épaisseur. Il est composé de fibroblastes et de globules blancs entourés par la matrice extracellulaire (MEC) qui elle-même est constituée de nombreuses protéines et d'eau. Les fibroblastes synthétisent les fibres de collagène qui permettent de résister aux tensions et aux tractions exercées lors de mouvements. Le derme possède plusieurs fonctions essentielles au bon fonctionnement de l'organisme telles que, (i) la fonction sensitive, (ii) la fonction de nutrition, (iii) la fonction de thermorégulation et enfin (iv) une fonction de détersion, grâce à la présence de glandes sudoripares, produisant l'urée contenue dans la sueur.⁷

L'hypoderme, couche la plus profonde de la peau, est un tissu adipeux vascularisé composé de lobules adipeux contenant les adipocytes, cellules spécialisées dans le stockage des triglycérides. Il assure un rôle de protection thermique et mécanique.⁵

Grâce à cette organisation, la peau assure plusieurs fonctions, (i) la sensorialité, (ii) la régulation thermique et (iii) la protection.

Comme la plupart des tissus de l'organisme, la peau a besoin d'être renouvelée et vascularisée en permanence.⁸ Le renouvellement de la peau concerne en particulier l'épiderme. En effet, grâce à la migration des cellules de la lame basale vers la couche cornée, la totalité de la couche est renouvelée en 45 jours. Cela se fait en deux processus, (i) la kératinisation, où en migrant, les kératinocytes s'aplatissent, s'enrichissent en kératine et par la suite perdent leur noyau et (ii) la desquamation, où les kératinocytes morts en surface se détachent en emportant incidemment des microbes et/ou des corps étrangers.

En dehors de ce phénomène physiologique, la peau peut être altérée de façon plus ou moins importante : on parle alors de plaie. Cela veut dire que le rôle de barrière ne peut plus être entièrement assuré, laissant ainsi une voie d'entrée à différents agents pathogènes. Les plaies sont classées en fonction de leur durée et de la cause de leur formation ; on les classe en deux types : les plaies aiguës et chroniques.

1.1.2. Définition des plaies dites aiguës

Une plaie dite aiguë est définie comme une rupture de l'intégrité épithéliale des tissus.⁹ Cette rupture peut être plus profonde et concerne les tissus sous-épithéliaux, notamment le derme, le tissu conjonctif et les muscles. Les plaies peuvent être causées par une agression physique lorsque la peau est déchirée, coupée ou perforée (une plaie ouverte) ou lorsqu'un traumatisme dû à un objet contondant ou à une chute provoque une contusion (une plaie fermée). En fonction de ces différentes agressions, les plaies sont réparties en 4 principaux groupes, (i) les plaies traumatiques, (ii) les plaies post-opératoires, (iii) les brûlures et (iv) les abrasions de la peau (dermabrasion).

1.1.3. Processus de cicatrisation des plaies aiguës

En fonction de l'importance de la plaie et du traitement nécessaire, différentes catégories de plaies aiguës sont définies. La dégradation plus ou moins sévère de la peau va déclencher le processus de cicatrisation dont l'objectif va être de réparer l'intégrité de la peau. Les plaies aiguës suivent un processus de cicatrisation classique avec des étapes régulées amenant à la formation d'un tissu cicatriciel. Cependant, une plaie qui présente une inflammation prolongée, retardant le phénomène de cicatrisation, est considérée comme chronique.⁹

La cicatrisation d'une plaie aiguë est un processus biologique spontané qui peut être divisé en 4 phases impliquant plusieurs acteurs cellulaires et biochimiques (telles que les cellules sanguines et parenchymateuses, les cellules de la MEC mais aussi des médiateurs solubles¹⁰).

Les phases impliquées sont (i) l'hémostase (ii) l'inflammation (iii) la prolifération et (iv) le remodelage. Elles sont cliniquement distinctes et se recourent dans le temps, comme le montre la Figure 5.

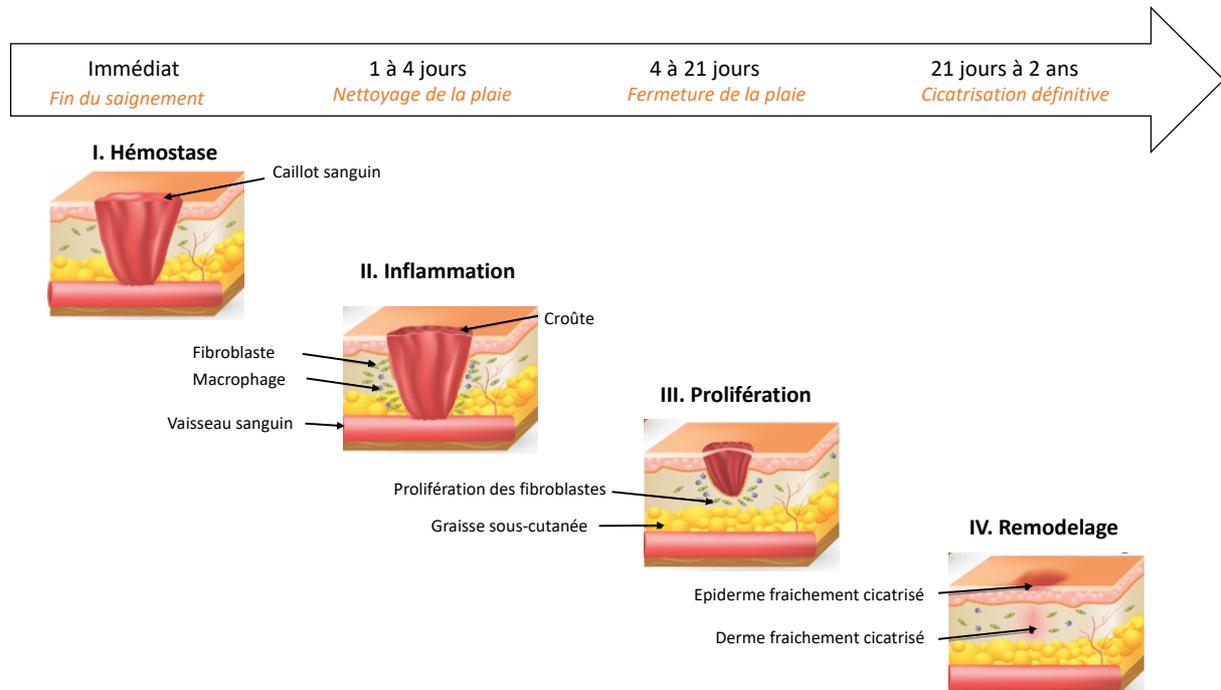


Figure 5. Biologie de la plaie : les 4 phases de la cicatrisation.

I. L'hémostase

Cette phase commence peu de temps après une blessure et se termine généralement en quelques heures.^{11,12} Elle est caractérisée par la vasoconstriction et la coagulation. La rupture des vaisseaux sanguins et lymphatiques expose le tissu au sang. La cascade de coagulation est activée en même temps que les plaquettes, ce qui entraîne le dépôt d'un caillot hémostatique.¹³ Il est composé de fibrine et sert également à concentrer les cytokines et les facteurs de croissance qui sont générés. La coagulation conduit à l'hémostase, ce qui amorce la cicatrisation par la libération de facteurs (tels que le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et le facteur de croissance transformant ($TGF-\beta 1^{14}$)) provoquant un processus inflammatoire.

II. L'inflammation

Elle se termine en général dans les premières 48-72h, mais peut durer jusqu'à 7 jours.¹⁵ Cette phase permet d'éliminer les organismes et les débris infectieux de la plaie. La vasoconstriction initiale est suivie d'une vasodilatation et augmente la perméabilité capillaire en réponse à l'histamine et à d'autres médiateurs vasoactifs. Le plasma sanguin va pouvoir circuler avec les neutrophiles et les macrophages, et vont participer aux fonctions anti-infectieuses, contribuer

au débridement de la plaie en éliminant les cellules mortes ainsi qu'au remodelage de la MEC par phagocytose.

Cette phase est notamment caractérisée par l'apparition de signes spécifiques appelés signes cardinaux de l'inflammation,¹⁶ comprenant (i) le développement d'un œdème et d'un érythème au sein de la plaie, (ii) une sensation de chaleur et (iii) une douleur pulsatile.

III. La prolifération

Elle intervient 2 à 10 jours après la blessure.¹⁵ Le rôle principal de cette phase est de restaurer une barrière épithéliale stable pour la formation d'un tissu cicatriciel grâce à l'agrégation des kératinocytes. Les macrophages et les neutrophiles sécrètent des cytokines et chimiokines afin d'amorcer le recrutement et la prolifération cellulaire au niveau de la lésion.¹¹ C'est ainsi que le processus de granulation apparaît. Le tissu de granulation est appelé ainsi en raison de son aspect granulaire et est composé de nombreux vaisseaux sanguins.

Sa genèse est associée à (i) la prolifération fibroblastique, (ii) la synthèse de la MEC par les fibroblastes, (iii) l'angiogenèse, favorisée par l'hypoxie tissulaire de la plaie et la dégradation de la MEC par les protéases synthétisées par les fibroblastes, mais aussi (iv) la transformation des fibroblastes en myofibroblastes, ce qui rapproche les bords de la plaie et provoque une contraction de la plaie.¹⁷ La contraction réduit la taille de la plaie et, par conséquent, la quantité de MEC nécessaire pour combler la plaie, ce qui facilite la ré-épithélialisation en réduisant la distance que doivent parcourir les kératinocytes en migration.

À la fin de cette phase les fibroblastes commencent à subir l'apoptose, convertissant le tissu de granulation d'un environnement riche en cellules en un environnement constitué principalement de collagène.¹⁸

IV. Le remodelage

Le remodelage se produit 2 à 3 semaines après la blessure et peut durer plusieurs mois (8^{ème} jour à 2 ans).¹⁵ La durée de cette phase est affectée par la taille de la plaie et par le fait qu'elle ait été initialement fermée ou laissée ouverte.

Cette phase est caractérisée par le remodelage du tissu dermique, les fibroblastes continuant à stimuler la synthèse de collagène. Il y a une production rapide de collagène, mais il n'y a pas de gain net, car l'ancien collagène est dégradé par les MMP (métalloprotéases de la matrice). Le collagène est libéré dans la MEC où il s'auto-assemble en triple hélices et commence à former des fibrilles et fibres plus importantes par le biais d'interactions intra et intermoléculaires. Le résultat final forme un tissu cicatriciel, un maillage de collagène très stable et solide.^{19,20}

La deuxième caractéristique de cette étape est l'apoptose, et donc le nombre de types de cellules tels que les macrophages, les kératinocytes, les fibroblastes et les myofibroblastes est réduit.²¹

Le remodelage est régulé par les fibroblastes grâce à la synthèse de composants de la MEC et de MMP qui contrôlent la différenciation cellulaire.²² Tous ces changements produisent un environnement déficient en cellules avec un excès de tissu conjonctif. Les vaisseaux sanguins qui ne sont plus nécessaires meurent par apoptose, et les autres acquièrent une membrane basale et deviennent relativement imperméables. Tous ces facteurs entraînent une augmentation de la résistance à la tension et une diminution de l'érythème et du volume du tissu cicatriciel, ce qui donne l'apparence finale de la cicatrice.

Cependant, certaines plaies ne suivent pas ce processus classique de cicatrisation et restent en phase inflammatoire prolongée ; ce sont des plaies dites chroniques.

1.2. Les plaies chroniques

1.2.1. Définition

On considère comme chronique une plaie n'ayant pas suivi les étapes classiques de la cicatrisation au bout de 3 mois de la blessure.²³ Elle reste à un stade inflammatoire prolongé avec une incapacité des cellules de la peau à refermer la plaie, exposant ainsi les tissus endommagés à un risque d'infection grave.²⁴

A l'heure actuelle, la Société Française et Francophone des Plaies et Cicatrisations (SFFPS) a indiqué qu'environ 2,5 millions de personnes (soit 3,7%) souffraient de plaies chroniques en France. Alors qu'environ 9 % de la population mondiale souffre de diabète, le traitement de ces plaies reste un réel challenge pour les cliniciens qui doivent comprendre les processus de chronicité de ces plaies afin de pouvoir les soigner efficacement.^{25,26} La prévalence de ce type de plaies est liée à différents facteurs, allant du vieillissement de la population à l'augmentation de l'obésité ou de la sédentarité.

1.2.2. Classification des plaies chroniques

Les patients les plus susceptibles de présenter des caractéristiques de plaies à cicatrisation chronique sont classés en 3 grandes catégories : (i) les escarres, (ii) les ulcères de jambe veineux, et (iii) les plaies du pied diabétique, qui constituent la majorité des plaies dont la cicatrisation prend plus d'un an.²⁷

1.2.2.a. Les escarres

L'escarre, est une plaie chronique nécrotique des tissus mous d'origine ischémique secondaire à la compression de ces tissus entre un plan dur et une saillie osseuse. Cette compression forte/prolongée entraîne une interruption de la circulation sanguine vers la peau, conduisant

à une hypoxie qui va être responsable d'une souffrance tissulaire et donc de la nécrose des tissus. Les facteurs responsables de ce type de plaie sont de plusieurs types : (i) la pression et un support inadapté, (ii) les mauvaises positions, (iii) l'état cutané (dénutrition, déshydratation, incontinence, macération...), (iv) les troubles de la sensibilité et de la mobilité et (v) les autres pathologies telles que l'athérosclérose (diabète, cholestérol et artérite).

Les escarres sont localisées sur plusieurs zones montrées sur la Figure 6 : au niveau du sacrum, du talon de l'occiput (au niveau de la tête) et du trochanter (au niveau de la hanche) pour des patients en position allongée, et au niveau du sacrum et de l'ischion pour des patients en position assise.

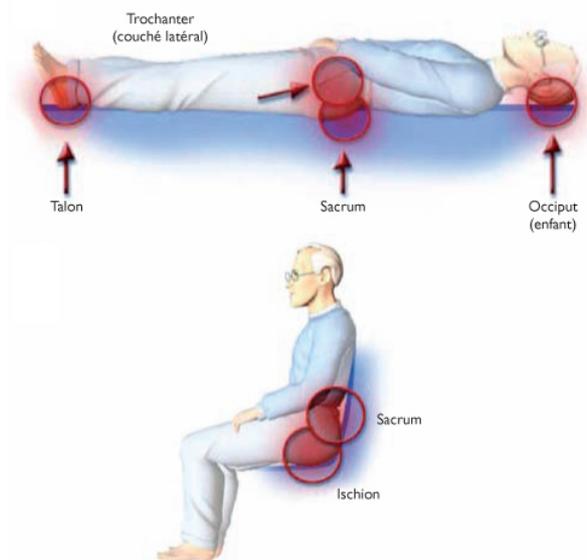


Figure 6. Localisation des escarres (Source : escarre.fr).

Les moyens de prévention des escarres se font en plusieurs étapes. D'abord on évalue le risque d'escarre du patient, puis on vient soulager la pression. On ajuste le matériel sur lequel est le patient (matelas, sur-matelas), on modifie la position du patient de façon très fréquente, généralement toutes les 3 heures au minimum. S'ajoute à cela le maintien du bon état cutané avec une bonne hygiène, hydratation, nutrition, mais aussi l'effleurage des zones à risques (massages).

1.2.2.b. Les ulcères veineux de la jambe

Les ulcères veineux de la jambe ont tendance à se développer lorsqu'il existe un problème de circulation du sang dans les veines de la jambe provoquant une augmentation de la pression qui va détériorer de façon progressive les vaisseaux sanguins de la peau. Elles apparaissent généralement au niveau de la malléole médiale, montrée sur la Figure 7, et touchent

principalement les personnes âgées souffrant de maladies sous-jacentes (diabète, insuffisance cardiaque).



Figure 7. Ulcère veineux de la jambe (Source : medicinus.net).

La physiopathologie de cette affection est complexe, mais elle est largement associée à l'insuffisance veineuse chronique (IVC) et est causée par la défaillance de la pompe musculaire du mollet responsable de la circulation sanguine veineuse. Elle peut être aussi causée par des reflux des veines superficielles ou profondes ou une obstruction dans les veines profondes. Les moyens de prévention de ce type d'ulcère sont (i) une bonne hygiène de vie, (ii) une mobilisation adaptée, (iii) une prise en charge pluridisciplinaire (dermatologie, chirurgien...) et (iv) un soin des plaies spécifiques.

1.2.2.c. Les plaies diabétiques

L'ulcère du pied diabétique est l'une des complications les plus dévastatrices et les plus fréquentes du diabète, avec une prévalence de 5,1% en France.²⁸ Selon l'IWGDF (International Working Group on the Diabetic Foot), la définition du pied diabétique est la suivante : « infection, ulcération ou destruction des tissus profonds du pied associée à une neuropathie et/ou à une artériopathie périphérique des membres inférieurs chez le diabétique ».²⁹ Le risque d'ulcération du pied pendant la vie d'une personne diabétique est compris entre 15 et 25%.³⁰

Les ulcères du pied diabétique sont toujours accompagnés d'hypoxie.³¹ Une hypoxie prolongée peut être le résultat d'une perfusion insuffisante et d'une angiogenèse inadéquate, deux facteurs qui nuisent à la cicatrisation des plaies. L'hypoxie peut intensifier la réponse inflammatoire précoce de la cicatrisation normale et, par conséquent, augmenter les niveaux de radicaux d'oxygène, qui prolongent les dommages tissulaires.³² L'hyperglycémie peut également aggraver le stress oxydatif lorsque la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) dépasse la valeur de la capacité anti-oxydante.³³ In vitro, les sucres atypiques peuvent être toxiques pour les fibroblastes et les neutrophiles ; par conséquent, chez les diabétiques, ils peuvent entraîner une plus grande vulnérabilité aux infections.³⁴

Le diagnostic des plaies du pied diabétique peut être classé suivant sa sévérité grâce à la classification de l'IWGDF, répertoriée dans le Tableau 1.

Grade	État d'infection	Observations
1	Non infecté	Aucun symptôme ni de risque d'infection
2	Infection légère	Atteinte cutanée uniquement : chaleur/sensibilité locale ; durcissement ou gonflement local ; érythème compris entre 0,5 et 2 cm
3	Infection modérée	Érythème > 2 cm et une des constatations du grade 2 ; infection atteignant les structures au-delà du tissu sous-cutané ; pas de réponse inflammatoire systémique ;
4	Sepsis sévère	Au moins 2 caractéristiques parmi les suivantes : - Température > 38°C ou < 36°C - Leucocytes > 12000 ou < 4000/mm ³ - Fréquence cardiaque > 90 battements/mn - 10% de formes leucocytaires immatures - Fréquence respiratoire > 20 cycles/mn - PaCO ₂ < 32mHg

Tableau 1. Classification sur le pied du diabétique selon l'IWGDF.

Cette classification permet au personnel médical une évaluation rapide et une prise en charge adaptée de ce type de plaie chronique. Son traitement relève d'une prise en charge pluridisciplinaire puisqu'en plus de traiter l'infection, il faut amener une correction du positionnement du pied et un rétablissement de la vascularisation. Le traitement de l'infection se fait en deux temps avec (i) une intervention chirurgicale pour le débridement de la plaie et la diminution de la charge bactérienne, puis (ii) un traitement antibiotique local ou général afin d'éliminer les charges bactériennes restantes.³⁵

Lorsque la plaie est en voie de cicatrisation le personnel médical va prescrire du matériel spécialisé au patient dans le but de minimiser les contacts anormaux et de travailler vers une modification de l'architecture du pied.³⁶

1.2.3. Physiopathologie des plaies chroniques

La physiopathologie complète des plaies chroniques reste encore mal comprise. Le retard de guérison est souvent dû à des complications dites « périphériques » telles que la neuropathie, l'ischémie (diminution de l'apport sanguin au niveau d'un organe) ou les maladies artérielles. Ces maladies sont généralement corrélées avec du diabète, où le taux de glycémie élevé entraîne une détérioration relative des fibres nerveuses mais aussi une réduction de la taille des capillaires dans les extrémités du corps. Ces complications périphériques influencent la protection, la vascularisation et l'oxygénation de la plaie, facteurs connus ; entre autres, pour favoriser la guérison.³⁰

Des facteurs externes tels que la pression, la température, l'humidité ou même le pH peuvent jouer un rôle sur le processus de cicatrisation, du fait que la plaie, pour bien former le tissu cicatriciel, doit rester dans un environnement optimal.

I. Humidité, température, pression

L'humidité est un facteur important qui doit être rigoureusement régulé. Les cellules impliquées dans la cicatrisation telles que les fibroblastes, comme vu dans le paragraphe 1.1.3. Processus de cicatrisation des plaies aiguës (phases de prolifération et remodelage) ont besoin d'un taux d'eau de 70% pour avoir une activité métabolique suffisante pour permettre la cicatrisation.³⁷ Cependant, un excès d'humidité peut provoquer la formation de biofilms (amas de cellules bactériennes), qui conduisent à l'infection de la plaie.³⁸

Une hausse de la température peut favoriser le développement des bactéries sur le site de la plaie, menant à une forte infection.³⁹ De même, une pression anormale de nature physique peut jouer un rôle dans la non-reconstruction du tissu endommagé.^{40,41}

II. Hypoxie

Un autre facteur contribuant à la chronicité de la plaie est l'hypoxie des tissus. Elle est définie comme un état de réduction des niveaux d'oxygène, qui peut être due soit à une diminution des apports/réserves d'oxygène, soit à une augmentation importante de la consommation d'oxygène au sein de la plaie. Dans le processus normal de cicatrisation des plaies (cf. paragraphe 1.1.3. Processus de cicatrisation des plaies aiguës, phase de prolifération), l'hypoxie locale se retrouve généralement au stade initial de la phase d'inflammation. Ceci est dû à la stabilisation du facteur 1-alpha inductible par l'hypoxie (HIF1), qui est impliqué dans la régulation de l'homéostasie de l'oxygène régulant l'angiogenèse et la reprogrammation métabolique.

Le diabète est fréquemment associé à l'hypoxie et altère la néovascularisation induite par l'ischémie et d'autres formes de réponses adaptatives des cellules et des tissus à de faibles niveaux d'oxygène. L'hyperglycémie semble être à l'origine de cette perturbation. Cela

entraîne une réduction de la formation du HIF1, provoquant une hypoxie importante et contribuant ainsi à la chronicité de la plaie.^{42,43}

III. pH

Le pH de la peau quant à lui s'avère être également un facteur important et intervient dans le processus de cicatrisation. Le pH de la peau est autour de 5,5 alors que le pH interne est de 7,4. Lorsque la peau est lésée, le tissu interne endommagé est exposé à l'environnement immédiat. Cette différence entraîne des variations de pH dans le lit de la plaie pouvant affecter une bonne cicatrisation.⁴⁴ Quant aux plaies chroniques, elles ont généralement un pH supérieur à 7,6 ce qui semble être l'une des raisons de la chronicité de la plaie. En effet, des recherches récentes ont montré qu'un pH faible semblait augmenter l'oxygénation des plaies, diminuant les niveaux de MMP permettant d'induire la prolifération bactérienne et menant à une évolution de la cicatrisation.^{39,44}

IV. Les facteurs inflammatoires

La cicatrisation des plaies chroniques ne suit pas une séquence systématique. Au contraire, elles sont caractérisées par un stade inflammatoire prolongé, conduisant à l'accumulation de cellules inflammatoires telles que les neutrophiles, les macrophages, les lymphocytes T ou les fibroblastes sur le site de la plaie. De manière classique, chaque cellule a un rôle à jouer dans la phase d'inflammation, provoquant ainsi douleur, rougeur, chaleur et gonflement.²⁵ Au niveau moléculaire, ces cellules sécrètent des facteurs inflammatoires qui, dans le cas de plaies aiguës, déclenchent la cascade de guérison i.e. la phagocytose, l'angiogenèse, le recrutement cellulaire, l'activation et la régulation des débris de la plaie. L'objectif principal est de détruire la MEC endommagée pour permettre la formation d'une matrice provisoire.²⁵ Les fibroblastes sont, entre autres, responsables de la formation de la MEC, comme vu dans la phase de remodelage dans la Partie 1.1.3. Processus de cicatrisation des plaies aiguës. Mais, comme la plaie reste au même stade inflammatoire, les cellules s'accumulent, empêchant ainsi la cicatrisation. En conséquence, les interleukines 6 (IL-6) et 1 β (IL-1 β) sont libérées par les neutrophiles et les macrophages et empêchent la réparation des tissus. Ceci induit la libération de protéines chimio attractives des monocytes (MCP), recrutant des monocytes qui vont se différencier en macrophages pour maintenir ce stade inflammatoire.¹¹ La plaie ne va pas évoluer ni cicatriser,¹¹ et va rester ouverte et devenir plus sensible aux infections bactériennes que la normale.

Ces cytokines pro-inflammatoires sont également responsables du recrutement d'enzymes, de protéases telles que les MMP, au sein du lit de la plaie. Ce sont des endopeptidases à zinc importantes pour l'intégrité de la MEC, qui, lorsqu'elles sont en conjonction avec leurs inhibiteurs TIMP (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases), induisent la dégradation de la MEC et la reconstruction provisoire d'une matrice. Une inflammation constante des plaies chroniques induit une surexpression des MMP, entraînant une dérégulation de l'équilibre du système MMP/TIMP empêchant ainsi toute cicatrisation. Il est à noter que les MMP

constituent un marqueur important des plaies chroniques pour leur suivi au niveau moléculaire. Il s'agit d'ailleurs d'un des biomarqueurs que nous avons choisi d'étudier dans cette thèse.

Partie 2. Les pansements

2.1. Présentation et intérêt des pansements

Les pansements sont sélectionnés sur la base d'une évaluation clinique de la plaie. Il existe plusieurs prérogatives qui doivent être respectées lors du choix d'un pansement pour les plaies chroniques :

- Le maintien d'un environnement humide dans le lit de la plaie
- La minimisation de l'irritation ou de la friction de la peau
- La prévention ou le traitement de l'infection.

Le mécanisme des plaies chroniques n'étant pas entièrement connu à ce jour,⁴⁵ il en résulte une grande difficulté dans le choix des pansements. Il existe aujourd'hui une vaste gamme de pansements commercialement disponibles.

Les pansements traditionnels sont des pansements « passifs » (naturels ou gazes) dont le rôle est d'absorber l'exsudat et de protéger la plaie en la recouvrant tout simplement. Ils doivent être remplacés régulièrement et ne fournissent pas un environnement humide propice à la cicatrisation des plaies. Ils sont généralement utilisés comme pansements *primaires* (directement en contact) pour les plaies les plus bénignes ; ou *secondaires*, ce qui signifie qu'ils sont utilisés comme recouvrement pour un autre type de pansement. Cependant ce type de pansement n'offre aucune méthode active afin de favoriser la cicatrisation. Les pansements modernes sont de plus en plus conçus comme des « plateformes » permettant de fournir des structures modifiables pour la reconstruction des tissus pouvant notamment délivrer des molécules bioactives à la plaie de manière contrôlée. Ce sont des matériaux interactifs, dont l'application sera utilisée pour des pansements qualifiés de bioactifs, tels que les mousses, les sprays, les hydrogels, les hydrocolloïdes ou les hydro-fibres qui favorisent la cicatrisation et protègent les plaies contre les infections bactériennes.⁴⁶

2.2. Les pansements bioactifs

Plus récemment, les pansements bioactifs ont été développés afin de maintenir un bon environnement au sein du lit de la plaie. Leur fabrication utilise généralement des biomatériaux qui jouent un rôle important dans le processus de guérison. Ils sont connus pour leur biocompatibilité, leur biodégradabilité et sont généralement dérivés de sources naturelles telles que l'alginate,⁴⁶ le collagène,⁴⁷ l'élastine,⁴⁸ l'acide hyaluronique⁴⁹ et plus récemment le chitosane.⁵⁰ Les pansements bioactifs appartiennent à la catégorie des pansements interactifs pour plaies et brûlures de la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis.⁵¹ Chaque type de pansement bioactif mentionné ci-dessus va être détaillé dans les paragraphes suivants.

2.2.1. Alginates

Les pansements à base de matériaux alginiques sont bien connus dans la littérature et, d'un point de vue commercial, dans le traitement des plaies.⁵² Les alginates, dont la structure chimique est représentée dans la Figure 8, sont des copolymères linéaires d'acide mannuronique (ManA, M et M-block en rouge) et d'acide guluronique (GluA, G et G-block, en bleu) qui existent dans de nombreuses espèces d'algues brunes. Sur la Figure 8, en vert correspond un enchainement de G puis M et inversement (MG/GM-block).

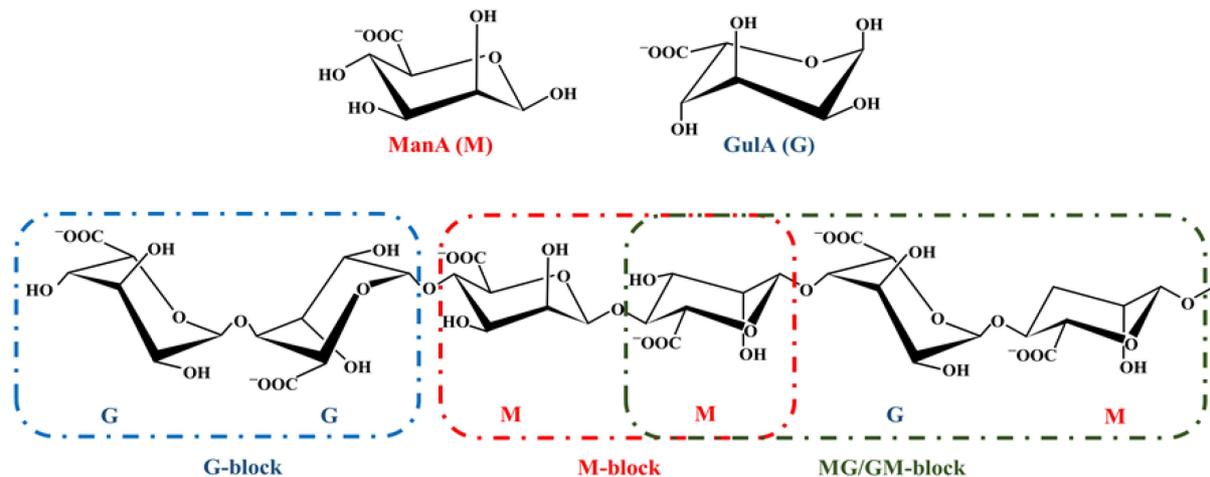


Figure 8. Structure chimique de l'alginate.⁵³

Les fibres d'alginate peuvent être préparées en extrudant des solutions d'alginate de sodium dans une solution de sel de calcium ou dans une solution acide pour produire respectivement l'alginate de calcium ou les fibres alginiques correspondantes. En général, le degré de cristallinité des fibres d'alginate est de l'ordre de 30% avec un degré d'absorption d'eau de 90% après immersion dans l'eau. Les fibres de ce type ont été largement utilisées dans les applications de pansement en raison de leur excellente biocompatibilité, de leur non-toxicité et de leur bio-activité potentielle.

Les fibres d'alginate (sous forme de sels de calcium) interagissent avec les exsudats de la plaie pour former un gel humide, protecteur,⁴⁶ ceci étant dû à l'échange d'ions entre les ions calcium dans la fibre et les ions sodium dans les exsudats⁵⁴ montrés dans la Figure 9. Au contact des exsudats (en 1), il en résulte un échange d'ions Na^+ et d'ions Ca^{2+} entre la plaie et le pansement provoquant ainsi la gélification des fibres d'alginate. Le pansement est hémostatique (en 2) car il libère des ions Ca^{2+} entraînant l'activation plaquettaire.

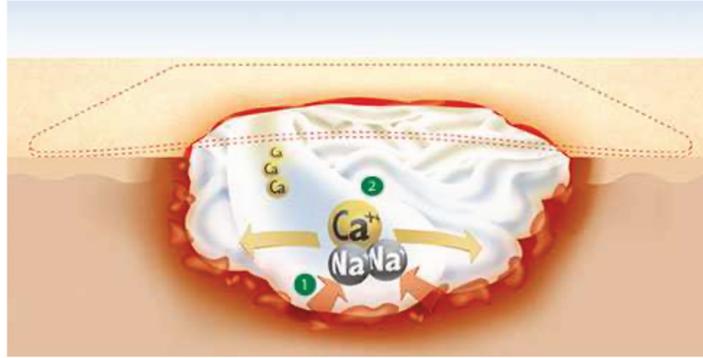


Figure 9. Mécanisme d'action du pansement d'alginate (Source : Klinion, Media).

Les pansements à base d'alginate sont largement utilisés. En effet, leur propriété gélifiante élimine le piégeage des fibres dans la plaie et permet de retirer le pansement sans traumatisme important, réduisant ainsi la douleur ressentie par le patient lors du changement de pansement. Elle fournit à la plaie un environnement humide qui favorise la guérison grâce à la rapidité de conduction de granulation et de ré-épithélialisation permettant une réparation plus esthétique de la plaie.⁵⁵ Ce type de pansement est optimal dans le cas d'une plaie à exsudation modérée. Comme ils ont besoin d'humidité pour former une structure de gel, ils ne peuvent pas être utilisés sur des plaies sèches ou sur des plaies avec des tissus nécrotiques durs, ce qui entraînerait une déshydratation supplémentaire des plaies et retarderait ainsi le processus de cicatrisation.

Comme alternative au pansement d'alginate standard, de nouveaux pansements ont également été testés tels que des pansements aux fibres d'alginate de zinc. Ces dernières sont faciles à modifier en incorporant des microéléments ou d'autres substances biologiquement actives qui accélèrent le processus de guérison ou ont des propriétés bactériostatiques.⁵⁶ Elles présentent une forte absorption d'humidité et une accélération de la cicatrisation. En plus des pansements aux fibres d'alginate de zinc,⁵⁷ les pansements d'alginate d'argent (où l'argent est sous la forme d'un complexe organique) sont particulièrement efficaces dans le traitement des brûlures.⁵⁸

Aujourd'hui, des pansements à base d'argent sont fabriqués par des entreprises de référence telles que 3M Healthcare, Smith & Nephew et ConvaTec pour traiter les plaies aiguës et chroniques en Amérique du Nord et en Europe.

Il existe de nombreux pansements à base d'alginate actuellement sur le marché et quelques-uns sont résumés dans le Tableau 2.

Pansement / Laboratoire	Composition et Fonction
ALGISITE® M <i>Smith and Nephew</i>	Fibres d'alginate de calcium. Formation d'un gel humide pouvant adsorber les bactéries
ALGOSTERIL® <i>Brothier</i>	Fibres d'alginate de calcium sous forme non tissée. Cicatrisant hémostatique diminuant le risque infectieux
ASKINA SORB®+CMC <i>P. Braun</i>	Fibres d'alginate de calcium et de carboxyméthylcellulose (CMC). Absorption des exsudats par échange ionique entraînant la formation d'un gel humide favorisant les échanges gazeux à la surface de la plaie
BIATAIN® Alginate Ag <i>Coloplast</i>	Fibres d'alginate de calcium/argent et de CMC. Effets hémostatique et antimicrobien en continu
KALTOSTAT® <i>ConvaTec</i>	Fibres d'alginate de calcium. Absorbance des exsudats favorisant l'hémostase
MELGISORB®+CMC <i>Mölnlycke</i>	Fibres d'alginate de calcium/argent et de CMC. Antimicrobien pouvant réduire l'odeur des plaies infectées et formation d'un gel maintenant un environnement humide
REALEASE® Control <i>KCI médical</i>	Fibres d'alginate de calcium/sodium. Formation d'un gel humide et contrôle des exsudats par absorption
SORBALGON® <i>Hartmann</i>	Fibres d'alginate de calcium et de CMC. Formation d'un gel humide, action hémostatique
SUPRASORB A® <i>Laumann & Rauscher</i>	Fibres d'alginate de calcium. Absorption de l'exsudat et formation d'un gel piégeant les bactéries et les débris cellulaires
TEGADERM® Alginate <i>3M Healthcare</i>	Fibres d'alginate. Pansement primaire quotidien absorbant
URGOSORB® <i>Urgo</i>	Fibres d'alginate de calcium et de CMC. Accélération de la détersion par gélification des composants du pansement au contact de la plaie

Tableau 2. Pansements bioactifs à base de matériaux d'alginate. Les remarques sont indiquées par les fabricants.

2.2.2. Hydrocolloïdes

A l'origine, les hydrocolloïdes étaient utilisés pour soigner les stomies et ce n'est que plus tard qu'ils ont été utilisés pour les plaies aiguës et chroniques peu exsudatives.⁵⁹ Ils sont composés de 40% de polyisobutylène, 20% de carboxyméthylcellulose (CMC) sodique, 20% de gélatine et 20% de pectine,⁶⁰ dont les structures sont représentées dans la Figure 10 ci-dessous.

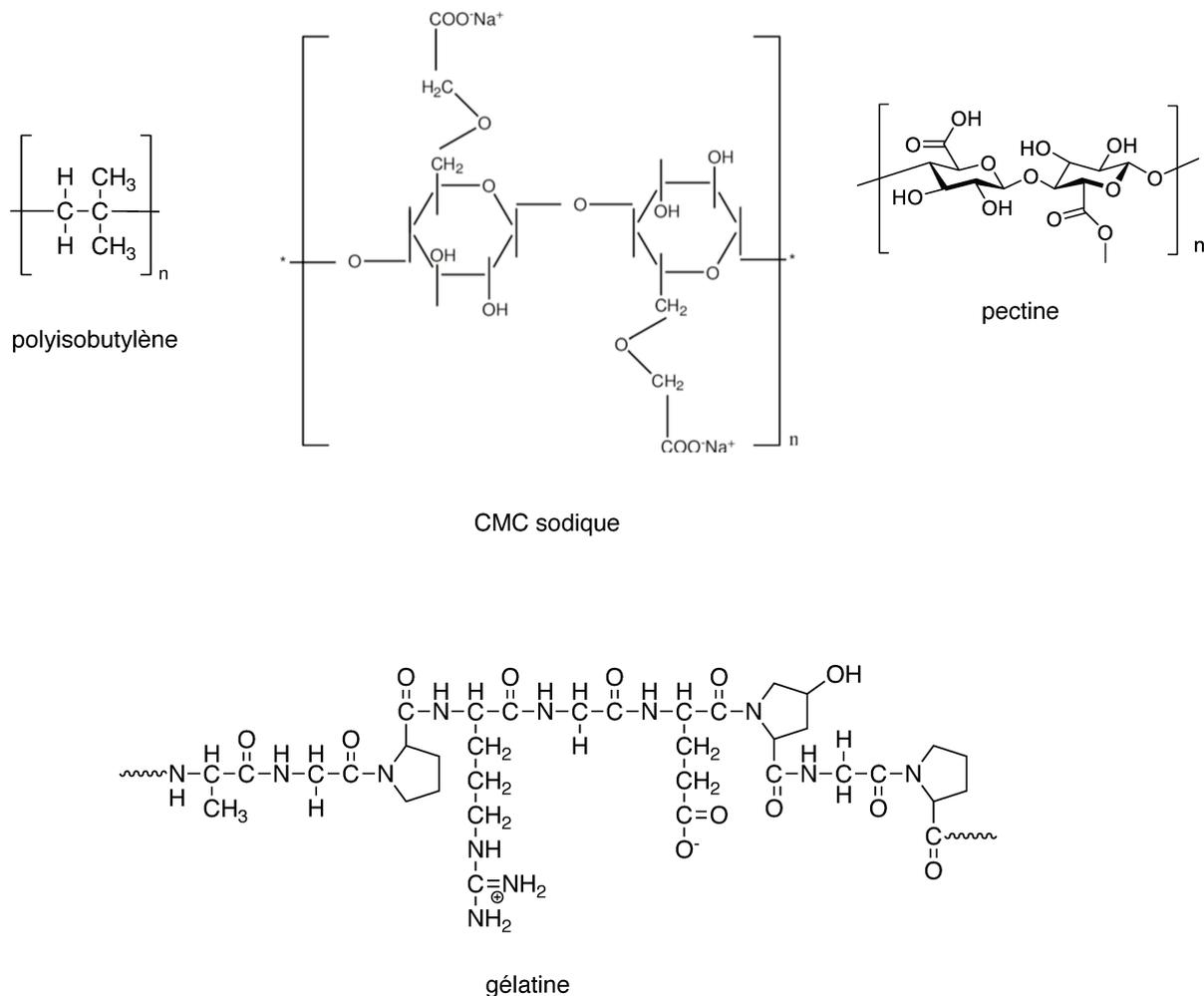


Figure 10. Représentations des structures de polyisobutylène, CMC sodique, pectine et gélatine.

Le pansement hydrocolloïde permet d'absorber le liquide de la plaie et ainsi se transforme en une masse gélatineuse. L'extérieur du pansement est recouvert d'un film de polyuréthane ou d'une mousse, qui permet l'échange gazeux et protège ainsi la plaie contre la contamination de l'extérieur. En plus de cette mousse, des hydrocolloïdes sont également disponibles sous forme de pâte ou de granulés, tels que, sur la Figure 11, Algoplaque Pâte du laboratoire Urgo, qui est utilisé pour combler les plaies profondes.⁶⁰ Ces pansements favorisent la cicatrisation en générant un environnement humide et, grâce à une intensification du processus d'autolyse, permettent de débrider la plaie à l'avance.^{60,61}



Figure 11. Hydrocolloïde sous forme de pâte, Algoplaque Pâte, Laboratoire Urgo.

Les hydrocolloïdes les plus récents sont composés entre 3,3 et 4,8 % en poids de CMC réticulée, entre 0,3 et 0,53 % en poids d'alginate et le reste, de l'eau distillée.⁶² Ils présentent un excellent débridement, de bonnes propriétés d'absorption, accélèrent le débridement des tissus nécrotiques dans les plaies chroniques, permettant ainsi une augmentation de la cicatrisation de la plaie de 20%. Les hydrocolloïdes sont fréquemment utilisés dans le traitement des plaies de pression. Pour cette application, les hydrocolloïdes sont plus efficaces que les pansements de gaze en ce qui concerne le nombre de plaies cicatrisées,⁶³ la réduction des dimensions des escarres,⁶⁴ le temps nécessaire pour le changement des pansements,⁶⁴⁻⁶⁶ la capacité d'absorption, la douleur lors du changement des pansements⁶⁷ et les effets secondaires.⁶⁶

Quelques exemples de pansements hydrocolloïdes commerciaux sont regroupés dans le Tableau 3.

Pansement / Laboratoire	Composition / Fonction
ALGOPLAQUE® Urgo	Particules de CMC insérées dans un réseau élastomère. Film supérieur en polyuréthane semi-perméable. Absorption des exsudats et formation d'un hydrogel non adhérent.
COMFEEL® Plus Contour Coloplast	Particules de CMC sodique encapsulées dans une masse synthétique absorbant l'humidité. Alginate de calcium pour augmenter absorption. Film supérieur en polyuréthane semi-perméable. Formation d'un gel visqueux absorbant l'exsudat sans adhérer à la plaie.
DUODERM® E ConvaTec	Particules de CMC insérées dans un réseau élastomère. Film supérieur en polyuréthane semi-perméable.

En contact de la plaie, formation d'un gel cohésif contenant les exsudats.

TEGASORB

Film de polyuréthane recouvert d'une couche adhésive acrylique.

3M Health Care

Formation d'un gel visqueux humide non adhérent à la plaie.

Tableau 3. Pansements bioactifs hydrocolloïdes.

2.2.3. Collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante chez les mammifères dans la MEC et est le principal composant de la peau humaine (70 à 80%) qui assure l'intégrité structurelle. Il existe plusieurs types de collagène, le collagène I qui est le plus abondant dans le corps que l'on retrouve dans la peau et les tendons. Les collagènes II, X et XI sont retrouvés dans le cartilage, le type III au niveau de la peau et des muscles, et le type IV qui est le composant structurel majeur de toutes les membranes basales. A noter ici que l'on va s'intéresser plus particulièrement au collagène de type I dont le fonctionnement et ses applications seront décrites dans les paragraphes ci-dessous.

La séquence tri-peptidique Pro-Hyp-Gly est très abondante dans le collagène et lui confère une structure en hélice allongée capable de s'auto assembler en triple hélice, puis en fibrilles et en fibres⁶⁸ (Figure 12). Sa composition est inhabituelle par rapport à d'autres protéines de l'ECM, principalement en raison de sa teneur élevée en Hyp (hydroxyproline, un aminoacide dérivé de la proline par hydroxylation via l'enzyme procollagène-proline dioxygénase).

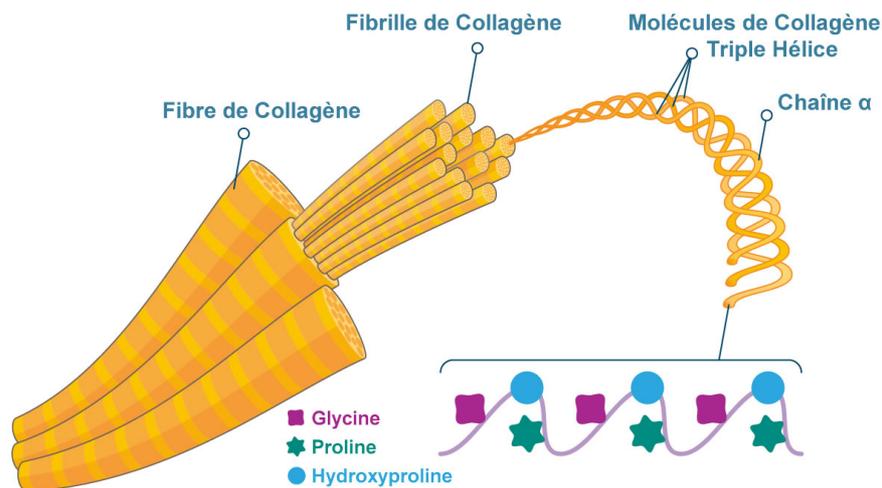


Figure 12. Représentation schématique du collagène (Source : X115® Magazine).

Parmi les matériaux constituant les pansement bioactifs et biocompatibles, le collagène est sans doute le biomatériau le plus prometteur, en raison de sa faible inflammation, de sa non-

cytotoxicité et de sa propriété à favoriser la croissance cellulaire.⁶⁹ Le collagène est la protéine extracellulaire prédominante dans le tissu de granulation de la plaie en cours de cicatrisation et une augmentation rapide de la synthèse de cette protéine dans la zone de la plaie se produit peu après une lésion.⁷⁰ En plus d'apporter force et intégrité à une matrice tissulaire, le collagène joue également un double rôle dans l'hémostase.⁷¹

Le collagène I régit de nombreuses fonctions cellulaires des fibroblastes et des kératinocytes, notamment l'adhésion, la différenciation, la migration, le dépôt de la MEC et l'angiogenèse des cellules. Le collagène I est également capable de se lier aux protéases en excès, aux cytokines inflammatoires et aux radicaux libres d'oxygène qui sévissent au sein du lit de la plaie chronique. Le rôle du collagène dans la réparation des tissus et la cicatrisation des plaies est multifactoriel, ce qui favorise l'utilisation étendue de structures à base de collagène exogène pour les applications de plaies chroniques. En effet, il présente des caractéristiques adaptées à une application médicale, telles que la biodégradabilité et une faible antigénicité, et a été utilisé au fil des années dans la préparation de sutures chirurgicales résorbables et de matériaux de pansement.⁷²

D'un point de vue commercial, les principales applications des pansements à base de collagène comprennent les films de collagène, les gels de collagène et les éponges de collagène.⁷³ Le collagène de ces pansements est généralement d'origine bovine, équine, aviaire ou porcine. En raison de son origine, le collagène collecté à partir de sources animales est ensuite purifié afin de ne pas être antigénique et est utilisé dans les pansements, où il peut varier en concentration ou en type.⁴⁷

Les pansements au collagène ont tous le même objectif : encourager le dépôt et l'organisation du collagène nouvellement formé, en créant un environnement qui permet au processus de cicatrisation de se poursuivre de manière classique. Ils ont également la capacité de maintenir une certaine humidité tout en absorbant les exsudats. Ils sont faciles à appliquer et à retirer et sont confortables pour le patient.⁷⁴ Quelques exemples de ces pansements sont listés dans le Tableau 4.

<i>Pansement / Laboratoire</i>	<i>Composition / Fonction</i>
<i>Apligraf®</i> <i>Organogenesis, Canton, MA</i>	Fibroblaste humain et collagène de tendon bovin Fournit à la plaie des cellules cutanées humaines vivantes, des facteurs de croissance et d'autres protéines produites par les cellules, ainsi qu'une matrice de collagène
<i>Biobrane®</i> <i>Smith & Nephew</i>	Membrane de silicone transparent, matrice tri-filamentaire en nylon et mélange de peptides dérivés du collagène porcine

Omnigraft®

Integra LifeSciences Corp.

Formation d'une barrière antimicrobienne, optimisation de la croissance des fibroblastes favorisant la cicatrisation

Collagène de tendon bovin et glycosaminoglycane de requin
Couche de silicone recouvrant entièrement la plaie et permettant de la garder humide

Tableau 4. Pansements à base de collagène.

2.2.4. Élastine

L'élastine, tout comme le collagène, est une protéine structurale qui participe à la composition de la MEC, représentant environ 2% du poids sec de la peau. Les fibres d'élastine forment des structures en forme de spirale principalement responsables de l'élasticité de la peau.⁷⁵ L'élastine est dégradée par une famille d'enzymes, les élastases. Elles sont sécrétées par les macrophages et les fibroblastes. La dégradation de l'élastine peut se produire lors de la formation du tissu cicatriciel ou dans les phénomènes de vieillissement de la peau. Dans le cas des plaies chroniques, étant donné que les fibroblastes et les macrophages sont présents en forte concentration dans le lit de la plaie, il est probable que l'élastase soit surexprimée, dégradant constamment les fibres d'élastine en formation et donc la MEC, retardant ainsi la cicatrisation.⁷⁶ Les matrices d'élastine sont actuellement à l'étude pour la formation de pansements d'hydrogel avec par exemple l'utilisation d'élastine d'origine bovine permettant la synthèse d'un hydrogel d'élastine poreux.⁷⁷

2.2.5. Acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (AH), représenté sur la Figure 13, est un polysaccharide naturel qui appartient à la famille des glycosaminoglycane. Il est composé de deux sucres : l'acide D-glucuronique et le D-N-acétylglucosamine.⁷⁸

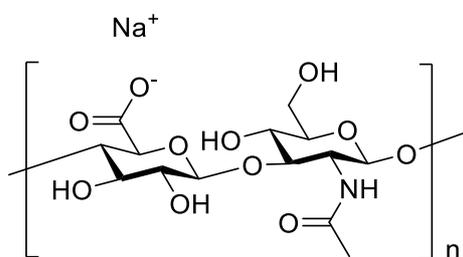


Figure 13. Structure chimique de l'acide hyaluronique.

La plupart des cellules du corps sont capables de synthétiser l'AH à un moment donné de leur cycle, ce qui démontre son rôle important dans des processus biologiques fondamentaux.

Dans des conditions physiologiques, il existe dans l'organisme sous forme de hyaluronate de sodium et a été identifié comme un composant majeur de la MEC. Il se trouve généralement dans le liquide synovial (entourant les articulations), le cartilage et les tissus de l'œil et de la peau. Il joue un rôle majeur dans le processus de guérison en raison de ses propriétés hygrosopiques, rhéologiques et viscoélastiques.⁷⁹

Il existe deux types d'AH :

- L'acide hyaluronique de haut poids moléculaire contenant plus de 25 disaccharides et contribuant à la qualité de l'environnement de guérison,⁴⁹
- L'acide hyaluronique de faible poids moléculaire contenant entre 4 et 25 disaccharides et induisant l'angiogenèse par ses produits de dégradation.⁸⁰

En raison de ces propriétés, l'AH et ses dérivés ont été largement utilisés au cours des deux dernières décennies pour divers dispositifs dermiques. Un exemple est celui du Regenecare®, un hydrogel contenant de l'AH pour humidifier les cellules permettant de reconstruire la matrice de la peau, de l'Aloe Vera pour réduire l'inflammation et stimuler la microcirculation, de la lidocaïne à 2% pour réduire la douleur et du collagène marin comme humectant et barrière naturelle.

2.2.6. Chitine et chitosane

La chitine est un polysaccharide linéaire d'unités de N-acétyl-d-glucosamine (2-acétylamino-2-désoxy-D-glucose) liées par des liaisons glycosidiques β -(1-4).⁸¹⁻⁸³

Elle est dérivée de l'exosquelette d'arthropodes, de crustacés et de mollusques dont sa facilité d'accès la rend commercialement intéressante pour une multitude d'applications biomédicales.⁸⁴⁻⁸⁶ Sa désacétylation partielle en milieu alcalin⁸⁷ dans la Figure 14 permet d'obtenir le chitosane, qui est toujours un copolymère linéaire de D-glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine.

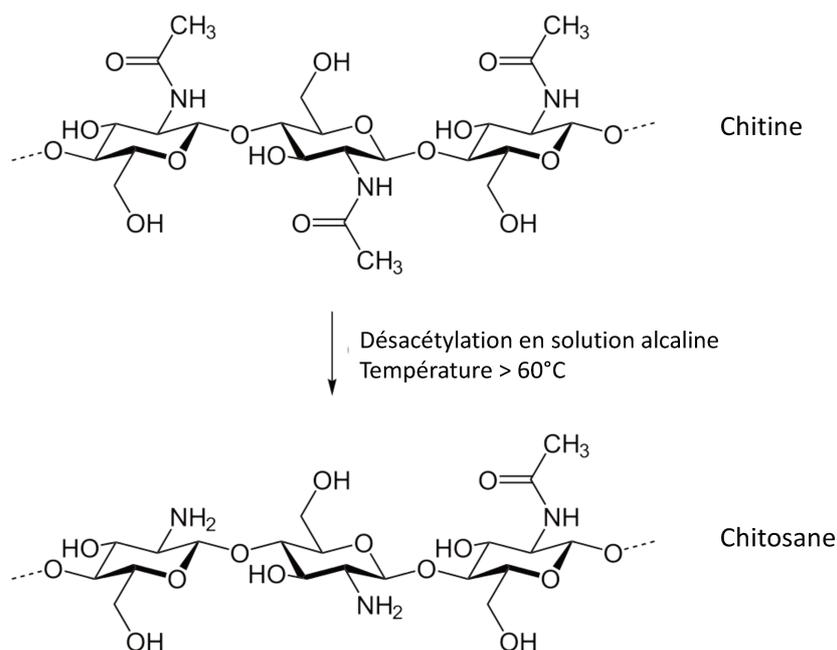


Figure 14. Désacétylation partielle de la chitine en chitosane.

Le terme chitosane est généralement employé pour décrire une série de dérivés de la chitine ayant différents degrés de désacétylation qui sont définis en termes de proportion de groupes amino primaires dans le squelette du polymère et de leur poids moléculaire moyen.⁸⁸ Ces deux aspects sont importants car il a été démontré que les propriétés fonctionnelles du polymère dépendent directement de la mesure dans laquelle les groupes acétate ont été éliminés.⁸⁹

Les principaux avantages du système, par rapport à son utilisation comme pansement, résident dans le fait qu'il s'agit d'un produit naturel, biodégradable, non antigénique et non toxique. Plus récemment, il a été démontré qu'il possédait des propriétés antimicrobiennes considérables, un facteur important si l'on considère la durée pendant laquelle une plaie chronique peut exister et la propension à l'infection.^{77,78,89} Il a été démontré que le chitosane et ses divers dérivés présentent une grande variété de propriétés particulièrement avantageuses pour leur application dans les pansements pour plaies : cationiques à des valeurs de pH typiques de la plaie, ils forment un film, présentent une légère gélification et ont de fortes propriétés adhésives pour le tissu de la plaie. Il a également été démontré qu'ils peuvent améliorer la coagulation et donc favoriser la cicatrisation.^{82,90}

Le polymère peut être facilement modifié par traitement chimique *i.e.* l'hydrolyse ou par traitement enzymatique.^{82,83} De plus, les fonctions amine et hydroxyle de la chaîne du chitosane peuvent être modifiées de différentes manières, ce qui explique en partie le grand nombre de dérivés qui abondent dans la littérature scientifique.

Commercialement, on retrouve le Chitopack C (Eisai Co.) permettant la régénération tissulaire ou encore ChitoSeal (Luna Innovations Inc.) un scellant hémostatique non toxique, biodégradable adhérent aux tissus qui ont été lésés.

2.3. Les pansements connectés ou intelligents

Actuellement, les pansements sous forme de film, de mousse et d'hydrogel, restent le choix privilégié pour la gestion clinique des plaies. Cependant, il est difficile d'obtenir simultanément l'état réel de la plaie et de répondre au besoin dynamique d'une plaie chronique dans le cadre du traitement passif des pansements actuels. La détection précoce de l'infection et le traitement en temps réel sur la base du besoin de la plaie sont d'une importance significative et doivent être envisagés dans la prochaine génération de pansements. Par conséquent, un système de pansement intelligent, permettant de surveiller l'état des plaies en temps réel et permettant de délivrer des médicaments à la demande, est particulièrement nécessaire. Ce nouveau genre de technique de prise en charge des plaies est en constante évolution afin de pouvoir être toujours plus précise et perfectionnée. À défaut d'être « intelligents » et capables de réagir à une information, des dispositifs connectés ont été imaginés pour traiter des plaies chroniques. Cette évolution a commencé avec la thérapie par pression négative (TPN) dont le dispositif est schématisé dans la Figure 15.

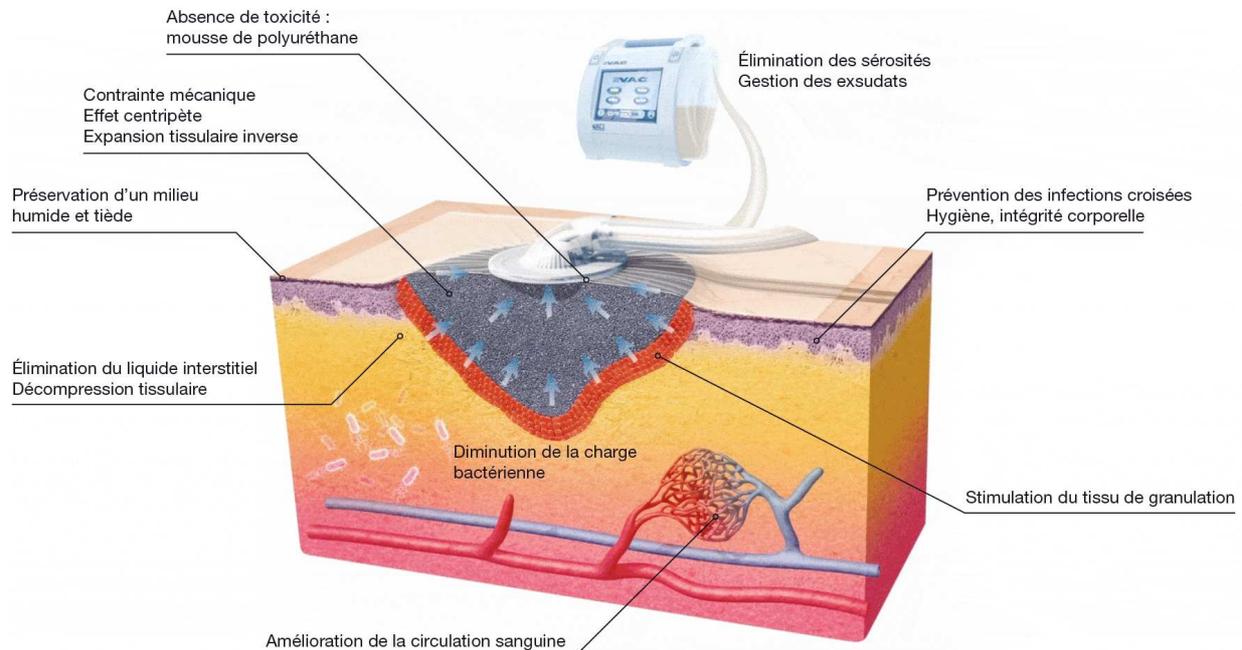


Figure 15. La thérapie par pression négative. (Source : ActuSoins)

La TPN consiste à placer la surface d'une plaie sous une pression inférieure à celle de la pression atmosphérique normale (760 mmHg). En 1997, sa commercialisation en France a

permis de faciliter la cicatrisation des plaies chroniques. Ce dispositif, détaillé dans la Figure 16, est constitué de deux parties distinctes :

- La mousse qui va être déposée au niveau du lit de la plaie, puis recouverte d'un film de polyuréthane relié à un port d'aspiration
- Puis, ce dernier est relié à un système de pompe et de recueil des exsudats, qui seront activés manuellement, une fois que la mousse et le film de polyuréthane seront en place.⁹¹

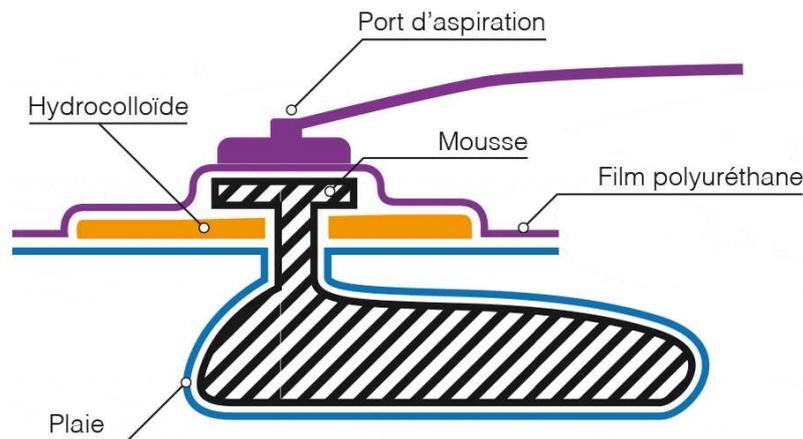


Figure 16. Schéma du dispositif de thérapie par pression négative. (Source : ActuSoins)

Ce dispositif, pionnier dans le domaine des dispositifs connectés, a permis de donner naissance à de nombreux projets qui combinent des capteurs permettant le suivi des plaies ou encore le suivi de la cicatrisation. On peut alors parler de dispositifs « intelligents » puisqu'ils réagissent à un stimulus extérieur et s'adaptent à la plaie. Ces dispositifs sont en plein essor.

Un pansement « intelligent » aurait d'abord une fonction de diagnostic des plaies grâce à l'utilisation de biocapteurs incorporés dans les pansements, pour générer un résultat en quelques minutes. Un biocapteur est un dispositif analytique qui a été conçu pour transformer un phénomène biochimique (témoigné par la présence d'un biomarqueur) en un signal mesurable. Les biomarqueurs peuvent être très simples comme la température, le pH ou l'hydrométrie. Ils peuvent être aussi de nature moléculaire, comme des protéines ou des petites molécules organiques. La Figure 17 présente le principe de fonctionnement d'un biocapteur permettant d'obtenir, à partir de l'analyte à détecter dans un échantillon, un signal témoignant de sa présence. Cette donnée pourra être traitée, enregistrée, stockée pour une utilisation ultérieure. Le biocapteur combine un élément de reconnaissance biomoléculaire (ERB) appelé biorécepteur et un transducteur, représentant le mode de détection. Le transducteur peut être de type optique, électrochimique, piézoélectrique ou encore thermique.⁹²

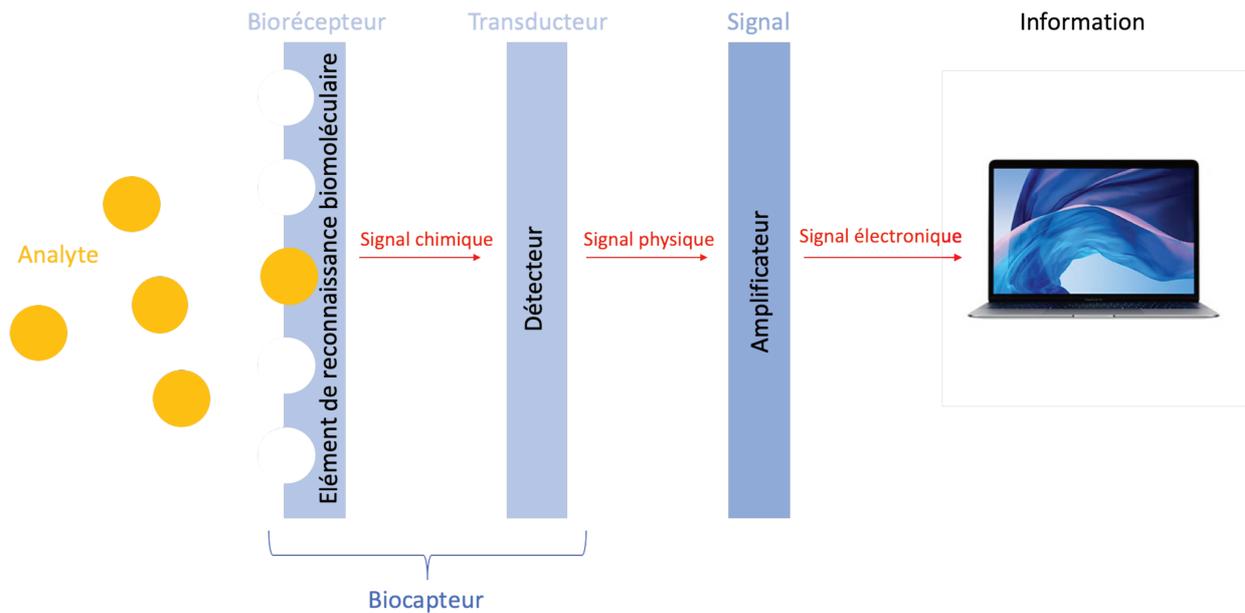


Figure 17. Principe de fonctionnement d'un biocapteur.

Le développement de dispositifs intelligents pour combler et apporter de nouvelles données sur les plaies chroniques constitue une bonne approche de ce domaine en plein essor. Les facteurs conduisant à une plaie chronique peuvent être distingués en deux catégories, (i) les facteurs physiques regroupant le pH la température et l'humidité et (ii) les facteurs biochimiques tels que la flore bactérienne, l'oxygénation, l'acide urique ou encore les MMP.⁹³

2.3.1. Les facteurs physiques

2.3.1.a. Le pH

Différents types de capteurs de pH ont été créés et d'autres sont en voie de développement pour le suivi de plaies chroniques. Lorsqu'une plaie est ouverte et exposée à l'environnement extérieur, son pH augmente dans une gamme variant de 7,15 à 8,90. Au contraire, lorsqu'une plaie se cicatrise, le pH devient neutre puis acide.⁹⁴ La plupart des systèmes de détection reposent sur une variation colorimétrique ou sur l'émission de fluorescence afin de mesurer le pH. Les valeurs obtenues sont comparées à une gamme existante, où une variation de couleur correspond à un changement de pH au niveau du lit de la plaie.

En 2016, Tamayol et son équipe ont mis au point un pansement composé de fibres d'hydrogel intégrant des microparticules de silice chargées en un colorant sensible (dans ce cas, jaune) aux variations de pH 6,4 à pH 8.⁹⁵ Les microfibrilles sont flexibles et peuvent créer un contact avec la peau et sont biocompatibles en raison du fait qu'aucun relargage des particules n'est retrouvé dans le lit de la plaie. La lecture de la variation du pH se base sur un examen visuel grâce au système de variation colorimétrique du patch. Cela peut se faire aussi avec la caméra d'un smartphone qui peut permettre de créer une carte quantitative du pH des fibres

d'hydrogel et des tissus sous-jacents. Le patch développé peut aussi servir de dispositif de monitoring du processus de cicatrisation en suivant d'autres facteurs au sein de la plaie.

En 2017, Kassal et son équipe présentent un système similaire où un indicateur coloré, le GJM-534, est incorporé à un pansement existant.⁹⁶ La lecture des variations de pH au niveau de la plaie se fait par un système RFID (Radio Frequency Identification). Ce système permet de mesurer des variations de pH de façon autonome avec le transfert des données directement sur un appareil électronique (ordinateur ou smartphone). Le système intelligent a été assemblé grâce à l'intégration de couches sensibles au pH via une sonde optoélectronique où la LED contient les spectres enregistrés du GJM-534 et de sa forme déprotonée. Le système complet possède une plage de fonctionnement allant d'une gamme de pH 6 à 9, ce qui est en corrélation avec les variations de pH observées chez les personnes atteintes de plaies chroniques.

En 2020, Vu et son équipe ont développé un dispositif jetable, le DETEC[®] pH, permettant de cartographier l'alcalinité des plaies et dont le dispositif est représenté par la Figure 18.⁹⁷

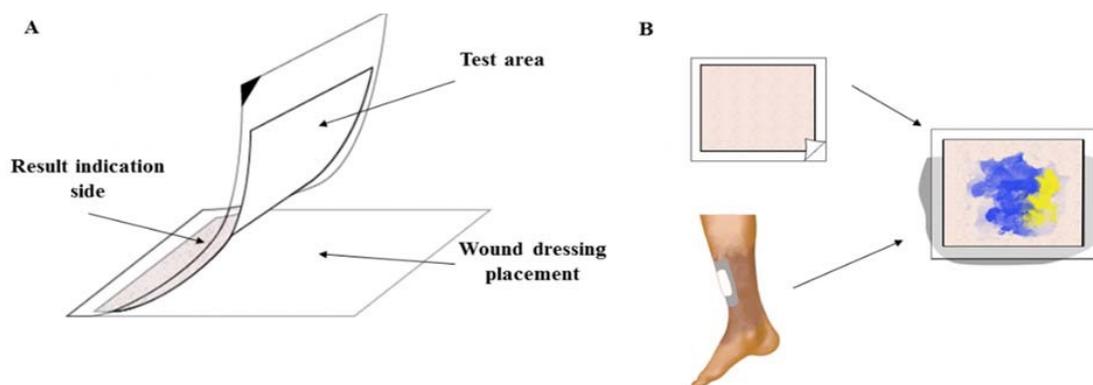


Figure 18. (A) Vue d'ensemble de DETEC[®] pH. (B) Schéma du test de DETEC[®] pH.⁹⁷

Un colorant indicateur de pH, le jaune de nitrazine, a été appliqué sur la face de membrane filtrante à base de cellulose avec une densité d'environ 10 mg/cm². La face en contact avec le pansement, la zone de test, est ensuite scellée par la fixation d'un film plastique transparent, qui sert de support pour le pansement jeté. En pressant un pansement fraîchement récupéré sur la zone de test, on peut cartographier le pH (basique en bleu ou acide en jaune) du liquide de la plaie imbibé sur le pansement et est représenté sur la Figure 19 ci-dessous. L'image 1 correspond au changement de couleur en fonction du pH du dispositif DETEC[®] pH après contact avec une gaze imbibée de fluides de plaie artificielle. L'image 2 correspond au test clinique du DETEC[®] pH sur (A) une plaie à cicatrisation normale et (B) une plaie chronique à cicatrisation retardée. Les zones de lecture du pH sont tracées avec des lignes bleues et roses sur l'image de la plaie correspondante et sur le DETEC[®] pH, respectivement.⁹⁷

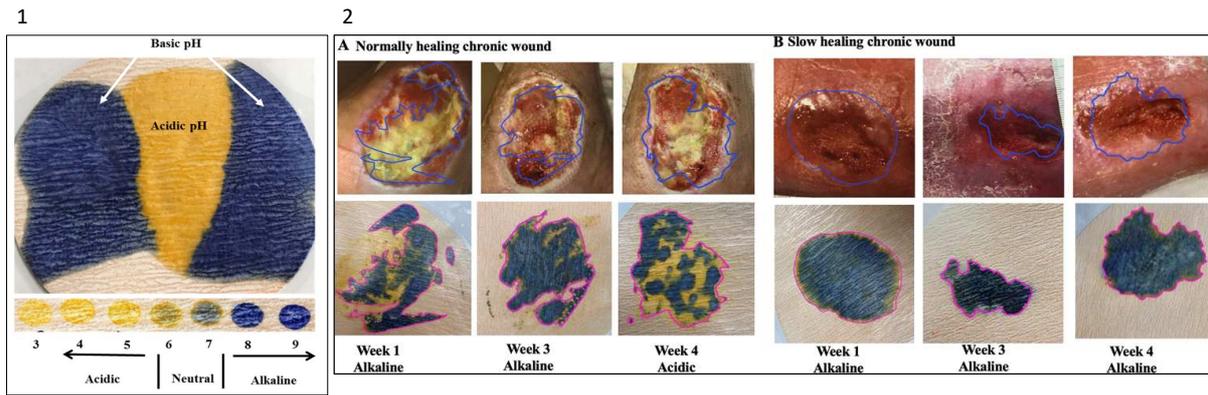


Figure 19. Test clinique de DETEC[®] pH sur une plaie à cicatrisation normale (A) et sur une plaie chronique (B).

A court terme, ce système évalue la capacité de pronostiquer la cicatrisation en mesurant le pH de la plaie. Ce test pourrait servir en routine pour l'évaluation de la cicatrisation, permettant une meilleure prise en charge.

2.3.1.b. La température

Une température élevée de la plaie augmente la vitesse de réaction enzymatique et chimique et peut être utilisée comme indicateur d'une phase inflammatoire prolongée. En général, une augmentation prolongée de la température supérieure à $1,11^{\circ}\text{C}^{98}$ au niveau du lit de la plaie exposée peut indiquer une infection due à la présence de bactéries⁹⁹ entraînant donc un retard de cicatrisation. Des dispositifs connectés ayant pour indicateur une lecture de la température sont apparus ces dernières années.

A base de nanotubes de carbone

En 2011 Matzeu et son équipe développent un capteur composé de nanotubes de carbone relié à un système RFID pour la lecture en temps réel de la température allant de 25 à 50°C avec une résolution de $0,2^{\circ}\text{C}$ au sein du lit de la plaie.¹⁰⁰

En 2017, Salvo et son équipe proposent un système double avec un capteur de température et un capteur de pH.⁹⁹ Le capteur de température est composé de nanotubes de carbone intégrés dans un polymère dérivé du polystyrène. Il permet de mesurer des variations de 25 à 50°C avec une résolution de $0,08^{\circ}\text{C}$.

A base de PDMS (polydiméthylsiloxane)

En 2020, Pang et son équipe ont développé un pansement intelligent flexible à structure de type double couche intégrant l'électronique, dont (i) la couche supérieure est constituée d'électronique flexible encapsulée dans du PDMS et intégrée à un capteur de température et à des diodes électroluminescentes ultraviolettes, et dont (ii) la couche inférieure est un hydrogel antibactérien sensible aux UV.¹⁰¹ Ce système permet un suivi en temps réel de

l'évolution de la plaie et un traitement à la demande par la libération d'antibiotiques contenus dans l'hydrogel après irradiation UV.

2.3.1.c. L'humidité

L'humidité joue un rôle clé dans la cicatrisation des plaies car elles ont besoin d'un environnement humide pour le bon fonctionnement des cellules réparatrices.

Le maintien d'un niveau approprié d'humidité à l'interface entre une plaie en cours de cicatrisation et un pansement appliqué est considéré comme essentiel pour une cicatrisation efficace. L'absence de contrôle de l'exsudat à cette interface peut entraîner une macération ou un assèchement de la surface de la plaie. La capacité à contrôler l'équilibre de l'humidité à l'interface de la plaie est donc un aspect essentiel de la performance du pansement et de la nécessité de le changer.

En 2015, Milne et son équipe ont réalisé une étude sur l'effet de l'ajout d'un capteur d'humidité commercial (WoundSense, Ohmedics Ltd UK) sur le suivi de la cicatrisation de plaies chroniques chez 30 patients.¹⁰² Il permet d'observer la saturation du pansement, optimisant ainsi son changement, en maintenant une humidité optimale au niveau du lit de la plaie. Cela permet de diminuer à la fois les coûts de matériels et le temps de personnel médical dédié. Le fonctionnement de ce capteur repose sur une mesure d'impédance qui est ensuite traduite en pourcentage d'humidité présente au niveau du lit de la plaie. Les plaies analysées sont alors classées suivant quatre stades, allant de la plaie sèche à la plaie saturée. Les résultats montrent que 45% des pansements utilisés durant cette étude étaient en conditions optimales pour un changement, dénonçant une fréquence de changement trop importante des pansements en milieu hospitalier.

En 2019, Du et Ciou ont développé une gaze intégrant à la fois un capteur de pH et un capteur d'humidité.¹⁰³ Le capteur d'humidité repose sur le même principe que celui détaillé précédemment, à savoir, une mesure d'impédance. Il est constitué de cuivre et présente une détection d'humidité de l'ordre de 0,06%/mV avec un temps de réponse de moins d'une seconde.

2.3.2. Les facteurs biochimiques

2.3.2.a. La flore bactérienne

Les plaies chroniques en phase inflammatoire prolongée présentent un risque accru d'infection bactérienne. Il est donc essentiel de développer des pansements intelligents qui peuvent détecter l'infection bactérienne à un stade précoce et fournir un traitement à la demande.

En 2001, Chan et son équipe ont développé un pansement intelligent pouvant évaluer la présence de bactéries grâce à un système colorimétrique.¹⁰⁴ Il est composé d'un biocapteur à base de silicone poreux sur lequel est greffé le TWTCP (tertryptophan ter-cyclo pentane). Il possède une grande affinité pour le lipide A, constituant lipidique d'une endotoxine qui est responsable de la toxicité du lipopolysaccharide des bactéries Gram négatif. Lorsque ces deux molécules se lient, l'indice de réfraction du silicone change et amène un décalage de la longueur d'onde d'émission de 3 à 4 nm suivant la souche bactérienne étudiée (photoluminescence). Cette variation de couleur permet donc un diagnostic de la charge bactérienne de la plaie.

En 2020, Qiao et son équipe ont développé un pansement intelligent à base d'hydrogel capable de surveiller l'infection bactérienne grâce aux effets FRET (transfert d'énergie entre molécules fluorescentes) sensibles au pH dans l'environnement bactérien et de traiter l'infection par la délivrance d'antibiotiques libérés par NIR.¹⁰⁵ L'hydrogel a été préparé par réticulation physique d'alcool polyvinylique (PVA), un poly médicament sensible aux UV, d'un médicament, le sulfate de gentamicine (GS) qui a été greffé dans un PEG via un produit clivable aux UV, le GS-Linker-MPEG¹⁰⁶, et de nanoparticules de silice modifiées par deux fluorochromes, Cy3 et Cy5 (sonde SNP-Cy3/Cy5) qui sont conjugués et servent de sonde fluorescente sensible au pH ont été chargées dans cet hydrogel. En présence des bactéries, les linkers sont coupés et les fluorochromes sont relâchés. Le FRET entre Cy3 et Cy5 présent lorsque les fluorochromes sont à proximité l'un de l'autre à la surface de la particule, ne s'exerce plus après le clivage du linker. A pH acide, Cy5 est libéré à cause du clivage de la liaison de la base de Schiff entre lui et la particule de silice, et on a ainsi une forte émission de fluorescence due à Cy3, témoignant de l'infection. De façon intéressante, en complément de ce système diagnostique, les auteurs ont introduit un système de traitement à la demande via la libération d'antibiotiques déclenchée par spectroscopie proche infrarouge (NIR) à 980 nm grâce à la conversion de la lumière émise par NIR en lumière UV de la sonde SNP-Cy3/Cy5. Le sulfate de gentamicine (GS) appartenant à la famille des aminoglycosides, aura une activité antibactérienne sur les bactéries gram négatif. Le principe de ces particules multifonctionnelles prise dans l'hydrogel est illustré sur la Figure 20.

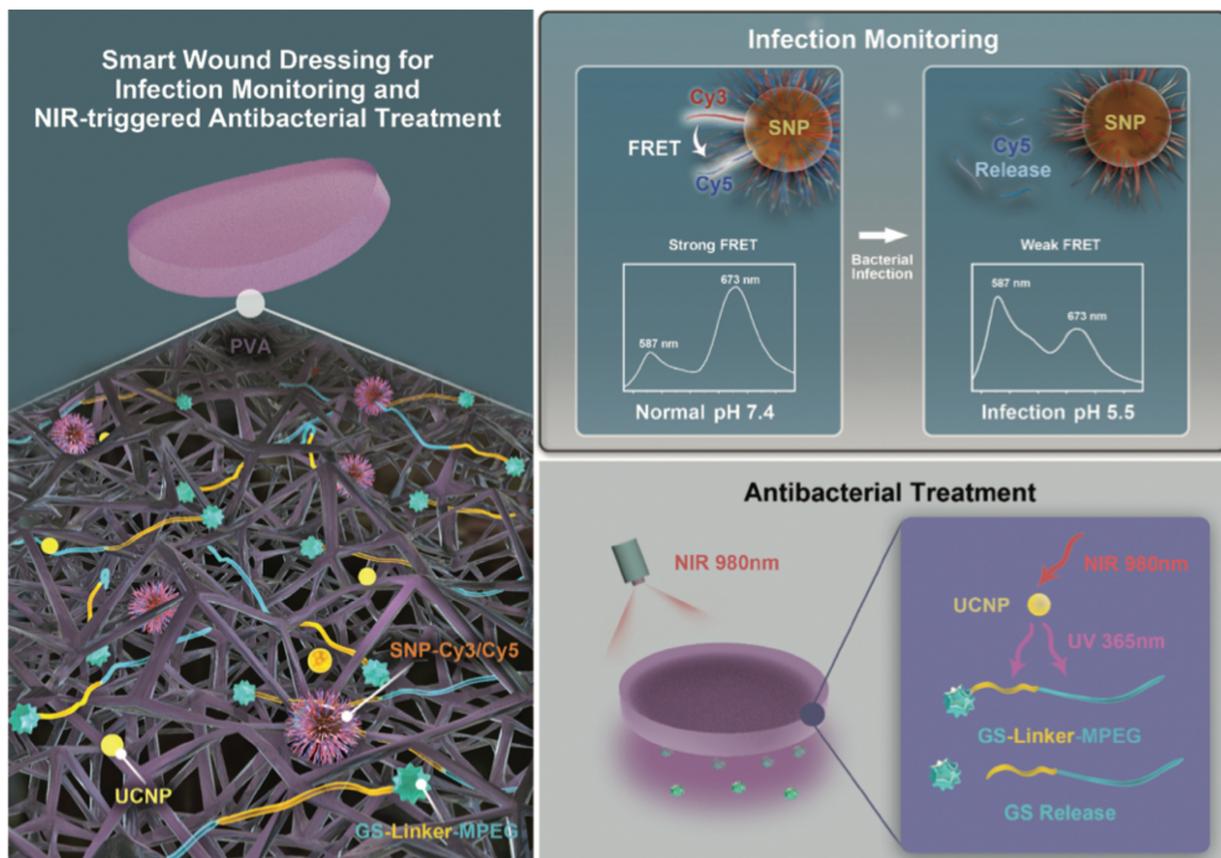


Figure 20. Un pansement intelligent multifonctionnel à base d'hydrogel et de nanoparticules multifonctionnelles pour la surveillance des infections par fluorescence et la libération d'antibiotiques déclenché par spectroscopie proche infrarouge.¹⁰⁵

Dans ce travail de thèse, nous avons également utilisé des bras clivables (linkers) sous l'effet des enzymes.

2.3.2.b. L'oxygénation

L'hypoxie tissulaire joue un rôle prépondérant dans la chronicité des plaies, comme discuté dans le paragraphe de physiopathologie des plaies chroniques plus haut.

En 2015, Mostafalu et son équipe ont développé un capteur galvanique permettant la mesure du taux d'oxygène intégré à un pansement connecté.¹⁰⁷ Celui-ci est composé de parylène-C (revêtement ultra-mince biocompatible) sur lequel des électrodes d'argent et de zinc sont installées. Entre les deux électrodes se trouve une solution d'oxyde de potassium, jouant le rôle d'électrolyte. Le tout est ensuite recouvert d'une fine couche de PDMS. La conversion de signal se fait grâce à un système d'amplification à transimpédance (un convertisseur courant-tension) et est envoyé à un système de transmission sans fil. Ainsi, le courant mesuré peut être corrélé à la concentration en oxygène de la plaie, le capteur présentant une variation linéaire de courant suivant une saturation en oxygène allant de 0 à 30%.

2.3.2.c. L'acide urique

Le suivi du taux d'acide urique est un facteur important à prendre en compte pour la cicatrisation des plaies chroniques.¹⁰⁸

En 2015, Kassal et son équipe proposent un système ampérométrique où l'enzyme urate oxydase, l'uricase, est immobilisée sur l'électrode de travail.¹⁰⁹ Cette enzyme permet l'oxydation hautement spécifique de l'acide urique, et le biocapteur est connecté à un système RFID et mesure la concentration d'acide urique. Le biocapteur a montré de bons résultats en solution contrôle, cependant, il présente une diminution de signal de 3 à 10% en conditions complexes, à cause d'interférences suivant l'environnement utilisé.

En 2018, Roy Choudhury et son équipe ont conçu un biocapteur enzymatique pour déterminer l'acide urique dans le liquide de la plaie. Ce biocapteur électrochimique comprend l'uricase piégée dans un polymère cationique à base de PVA pour une meilleure stabilité. Les résultats montrent que l'utilisation d'une plateforme électrochimique d'oxydoréduction et de l'acide ferrocène carboxylique a permis le transfert d'électrons entre l'enzyme et le transducteur. L'uricase étant immobilisée dans la matrice polymère a permis d'obtenir des mesures stables et continues à la température du corps pendant une semaine avec une déviation minimale.

2.3.2.d. Les métalloprotéases matricielles (MMP)

Les métalloprotéases matricielles jouent un rôle prépondérant dans l'inflammation prolongée des plaies chroniques. En effet, elles empêchent la reconstruction d'une MEC provisoire essentielle à la cicatrisation.

Les capteurs qui détectent les MMP peuvent être de deux types : dans la plupart des cas, ils détectent l'enzyme elle-même mais certains détectent l'activité de cette enzyme c'est-à-dire la dégradation de peptides.

L'un des tests les plus utilisés pour détecter les MMP est la méthode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). L'ELISA utilise des anticorps reconnaissant l'analyte à détecter, ici la MMP. L'un des anticorps est couplé à une enzyme qui catalyse une réaction colorimétrique et permet donc de connaître la concentration de la MMP par mesure de la densité optique par spectrométrie d'absorbance.¹¹⁰

En 2014, Milne et son équipe ont développé un biocapteur capable de détecter le pH, l'humidité ainsi que le taux de MMP au niveau du lit de la plaie.⁴⁴ Leur test est basé sur la méthode ELISA en sandwich afin de détecter spécifiquement la présence de MMP-9, à des concentrations variant de 0,1 à 100 ng.mL⁻¹.

En 2015, Biela et son équipe proposent eux aussi un capteur permettant la mesure du taux de MMP-9 où des électrodes en or sont fonctionnalisées avec un peptide clivable (LGRMGLPGK) par cette enzyme.¹¹¹ Le film ainsi créé se dégrade lorsqu'il est exposé à un milieu contenant de la MMP-9 et est détectée par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE), avec un seuil de détection de l'ordre de 200 ng.mL⁻¹. Les seuils présentés ci-dessus sont corrects

puisque les concentrations de MMP-9 pour des patients atteints de plaies du pied diabétique varient de 0,37 à 2,90 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.^{112,113}

En 2013, les laboratoires WoundCheck décrivent un test colorimétrique à flux latéral permettant de mesurer l'activité ou la suractivité des MMP mais aussi de l'élastase des neutrophiles humains (HNE) dans un échantillon liquide prélevé au niveau de la plaie.¹¹⁴

Les systèmes simples à flux latéral fournissent généralement une réponse « oui/non » et sont conçus autour d'une valeur seuil particulière. Dans le cas de ce système, les activités des protéases sont mesurées en les comparant à des valeurs seuils indiquant des plaies non cicatrisantes, donc chroniques.

Pour réaliser un tel système, le réactif sélectif, tel qu'un substrat peptidique exogène clivable ou un partenaire de liaison immunologique approprié (anticorps polyclonaux et monoclonaux), est immobilisé sur le dispositif. Les parties clivables peuvent être marquées avec un réactif détectable par analyse, un fragment indicateur comprenant une enzyme indicatrice (phosphatase alcaline), un fragment luminescent (luciférase) ou un fluorochrome (isothiocyanate de fluorescéine, rhodamine, dérivés de coumarine).

Ainsi, lors du clivage du substrat peptidique ou de l'anticorps par l'enzyme, cela permet de libérer ou d'activer le fragment. Ce même fragment « indicateur » comprend des particules colloïdales en or, conjuguées à un peptide (anticorps ou un substrat peptidique).

Les particules colloïdales sont colorées, de sorte que leur accumulation dans une zone du test ou une région de contrôle du dispositif donne une couleur visible. L'intensité augmente avec la concentration des particules, permettant ainsi une détermination colorimétrique quantitative de ladite concentration par colorimétrie et/ou une comparaison de l'intensité de la couleur observée avec une couleur de référence pour évaluer si le seuil a été dépassé.

Les MMP et l'élastase des neutrophiles humains (HNE) sont des marqueurs intéressants et sont étudiés récemment en tant que biomarqueurs pour les plaies chroniques. Dans le cadre de cette thèse, la MMP-13 et la HNE seront en particulier étudiées, et détaillées dans le Chapitre 2. Conception d'un matériau peptidique hybride sensible à une activité enzymatique.

2.4. Les pansements intelligents associés à une partie capteur

La demande croissante d'approches diagnostiques rapides et précises a entraîné une tendance à l'évolution des capteurs pour des applications biomédicales, ceci en raison de leur capacité à analyser de petits volumes de substances biologiques. Plus précisément, le développement de ces dispositifs combinant l'absence de marquage et la détection à haute sensibilité, a suscité un grand intérêt dans les applications de santé. En effet, ces derniers, plus communément appelés biocapteurs, peuvent être assimilés à des dispositifs portables de type « lab-on-chip » (petit dispositif intégré rassemblant une ou plusieurs fonctions de laboratoire sur un substrat miniaturisé) permettant de poser un diagnostic dans un délai très court, en raison du volume d'analyse, mais aussi de la possibilité de faire de l'analyse multiparamétrique. Ces « lab-on-chip » sont conçus grâce aux nanotechnologies et plus particulièrement avec la microfluidique pour miniaturiser en laboratoire. Ensuite, une association avec un élément jouant le rôle de transducteur va permettre d'en extraire une information vis-à-vis de la substance analysée. Pour y parvenir, nous pouvons citer les deux méthodes les plus utilisées qui sont de nature optique ou électrique via par exemple l'impédancemétrie.

Cette dernière est basée sur la mesure des propriétés électriques d'un milieu biologique entre deux électrodes permettant des mesures rapides, à la fois simples et continues. Un faible courant (environ 70 μA , basse fréquence) est appliqué au niveau des électrodes du capteur, et va traverser le matériau / la substance se trouvant sur le capteur. Le rapport entre la tension et le courant est appelé impédance, celle-ci peut être assimilée ou modélisée par une association de composants électriques passifs tels qu'une résistance R et une capacité C . Ces composants seront décrits dans le Chapitre 4. Étude par mesure d'impédance du capteur modifié avec le matériau peptidique hybride.

Une structure de capteur particulière a été choisie pour modèle d'étude afin de caractériser le matériau peptidique hybride synthétisé pour l'application au niveau du pansement : un capteur à électrodes interdigitées. Ce modèle est choisi pour les raisons suivantes, d'abord (i) il possède plusieurs électrodes planaires côte à côte où les distances entre chaque électrode sont faibles, ceci permettant d'augmenter la sensibilité de mesure électrique du capteur, et (ii) en raison de la géométrie coplanaire des électrodes, le capteur permettra de réaliser une mesure facilement intégrable puisqu'elle est caractérisable sur un seul côté. Les détails de cette structure interdigitée seront expliqués dans le Chapitre 4. Étude par mesure d'impédance du capteur modifié avec le matériau peptidique hybride.

Partie 3. Les protéases

3.1. Généralités sur les protéases

Les protéases, aussi nommées peptidases, protéinases ou enzymes protéolytiques, sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons amides d'une protéine entre le carbonyle et l'atome d'azote formant une amine et un acide carboxylique. Elles constituent l'une des plus vastes familles d'enzymes codée par 2% des gènes du génome humain, soit environ 550 gènes. Ces enzymes protéolytiques possèdent une activité d'hydrolase, car elles utilisent une molécule d'eau pour effectuer ce clivage. Elles interviennent dans la régulation de la vie des organismes, en participant à l'apoptose, à la digestion, à l'autophagie et à l'activation / désactivation de différents processus biologiques.

Il existe deux groupes de protéases, (i) les endopeptidases (en bleu) qui hydrolysent les liaisons peptidiques au milieu de la séquence d'une protéine et (ii) les exopeptidases qui décrochent l'acide aminé terminal de la séquence de la protéine permettant : soit la libération de l'acide aminé N-terminal dans le cas d'une amino peptidase (en violet) soit la libération de l'acide aminé C-terminal dans le cas d'une carboxy peptidase (en orange). Ces deux groupes sont représentés dans la Figure 21 ci-dessous. S correspond au sous-site de l'enzyme qui se lie à un résidu correspondant dans la séquence du substrat P.

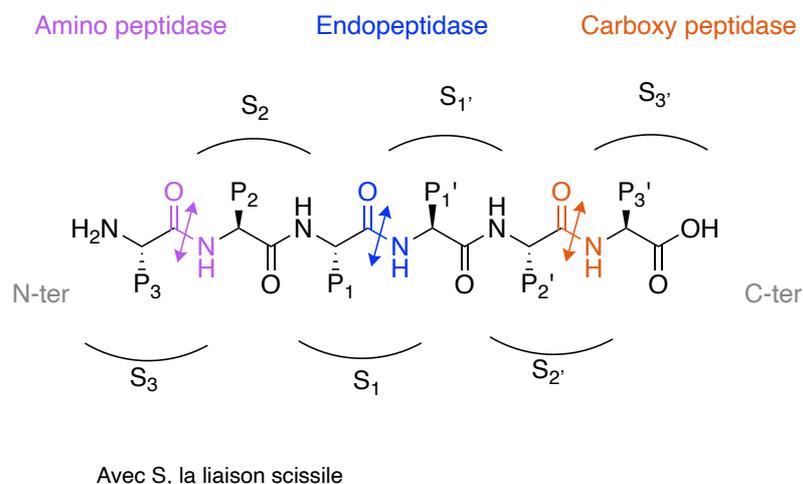


Figure 21. Les différents types de protéases. Le placement des sous-sites correspond à ceux de l'endopeptidase.

De manière générale, la nomenclature des enzymes s'écrit sous la forme : E.C. X.X.X.X. Chaque code d'enzyme correspond aux majuscules « EC » (« Enzyme Commission ») puis sont suivies de 4 nombres (X) séparés par des points. Le 1^{er} X correspond aux types de réactions catalysées par les enzymes.

Les résidus de sites actifs au niveau de la protéase sont composés de poches continues appelées sous-sites. Chaque sous-site se lie à un résidu dans la séquence du substrat, d'après la nomenclature de Schechter et Berger.¹¹⁵ Ainsi, les résidus d'acides aminés de la séquence du

substrat sont numérotés de part et d'autre de la liaison scissile (liaison chimique covalente qui peut être rompue par une enzyme) : P3-P2-P1-P1'-P2'-P3' tandis que les sous-sites correspondants dans le site actif de la protéase sont notés : S3-S2-S1-S1'-S2'-S3'.

En fonction du pH dans lequel les protéases ont une activité optimale, on distingue les protéases alcalines, neutres ou acides. Selon la zone dans laquelle elles se trouvent, on les classe en 3 groupes : (i) extracellulaires, (ii) intracellulaires et (iii) les protéases transmembranaires.

Les protéases sont aussi classées en fonction de leur mécanisme catalytique. On les regroupe en 6 classes, (i) les protéases à sérine, (ii) les protéases à cystéine, (iii) les protéases à acide aspartique (iv) les métalloprotéases, (v) les protéases à thréonine et (vi) les protéases à acide glutamique.

Les protéases à cystéine, sérine et thréonine possèdent un résidu nucléophile au niveau de leur site actif (fonction thiol ou alcool) qui participe directement à l'hydrolyse des liaisons peptidiques. Ces protéases possèdent un mécanisme qui s'effectue en 2 étapes, représenté sur la Figure 22. Tout d'abord, le résidu nucléophile attaque la fonction carbonyle, entraînant ainsi la formation d'une forme intermédiaire de l'enzyme : l'acyl-enzyme. Deux résidus, acide et basique, forment un réseau de relais de charge pour polariser et activer le nucléophile au niveau du site actif, que l'on appelle la triade catalytique. Puis, dans une seconde étape, l'intermédiaire acyl-enzyme est hydrolysé par une molécule d'eau qui a été activée.

Les protéases à acide aspartique et glutamique, utilisent un résidu possédant une chaîne latérale avec un acide carboxylique, qui active une molécule d'eau participant ainsi à l'hydrolyse. Les métalloprotéases utilisent un métal coordonné, généralement le zinc, dans leur mécanisme catalytique. Leurs mécanismes d'action sont représentés dans la Figure 23.

Dans le cas des métalloprotéases de la matrice qui sont solubles, cette coordination s'effectue avec 3 histidines ou 2 histidines et une chaîne latérale acide. Une molécule d'eau est un ligand supplémentaire du zinc qui permet d'établir une liaison hydrogène avec un glutamate qui lui arrache le proton. L'ion de zinc permet de stabiliser l'oxyanion.

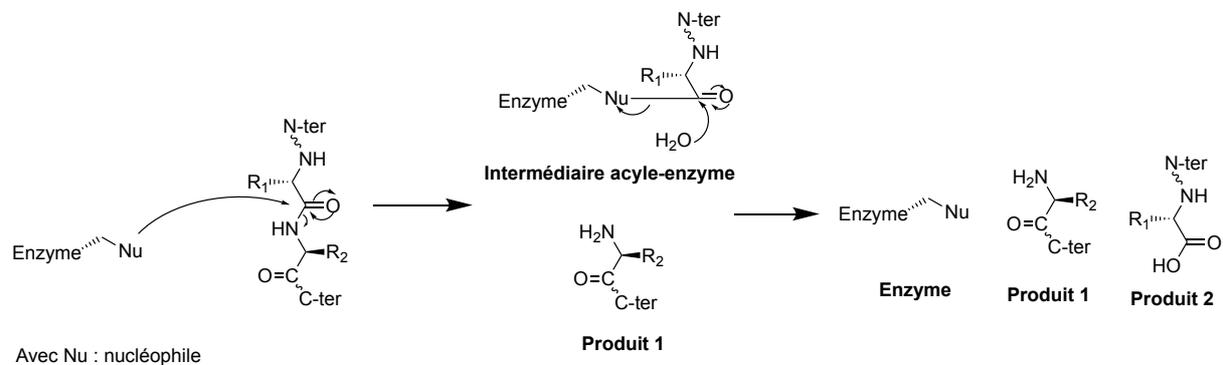


Figure 22. Mécanisme d'action des protéases à cystéine, sérine et thréonine.



Figure 23. Mécanisme d'action des protéases à acide aspartique, glutamique et les métalloprotéases.

3.2 Les métalloprotéases matricielles (MMP)

3.2.1. Historique et classification

C'est en 1962 que Gross et Lapiere ont découvert l'existence d'une activité protéolytique capable de cliver le collagène natif pour expliquer l'étape de métamorphose de la queue des têtards.¹¹⁶ Cette activité s'exerce sur le collagène entre des résidus Gly-Leu/Ile dans un site spécifique de la triple hélice.

Mais ce n'est qu'en 1970 que la première MMP fut isolée sous forme pure à partir d'extraits de peau humaine.¹¹⁷

L'identification de cette protéase, appelée collagénase et métalloprotéase de la matrice 1 (MMP-1) a constitué la première étape dans une recherche qui a connu une croissance exponentielle au cours de ces dernières années, aboutissant à l'identification et à la caractérisation de 23 MMP chez l'homme (Figure 24).

Depuis, les recherches ont porté sur la biochimie (purification, activation, inhibition, structure), la biologie moléculaire (clonage, régulation de l'expression des gènes) et la biologie des MMP dans les processus normaux et pathologiques.

Les MMP sont groupées en 6 classes en fonction de leur structure et décrites dans le Tableau 5 : (i) les collagénases, (ii) les gélatinases, (iii) les stromélysines, (iv) les matrilysines, (v) les MMP membranaires et enfin (vi) les autres métalloprotéases. Chaque MMP est identifiée avec un numéro ou un nom descriptif en rapport avec ces différentes classes.

Classe	Numérotation	Structure
<i>Collagénases</i>	MMP-1 : collagénase interstitielle MMP-8 : collagénase neutrophile MMP-13 : collagénase-3	Pré-domaine—Pro-domaine avec son résidu C—Domaine catalytique avec 3 résidus H—Région charnière riche en P—Domaine homologue à l'hémopexine
<i>Gélatinases</i>	MMP-2 : gélatinase-A MMP-9 : gélatinase-B	Pré-domaine—Pro-domaine avec son résidu C—Domaine catalytique avec 3 résidus H avec une séquence analogue à la fibronectine—Région charnière riche en P—Domaine homologue à l'hémopexine
<i>Stromélysines</i>	MMP-3 : stromélysine-1 MMP-10 : stromélysine-2 MMP-11 : stromélysine-3	Pré-domaine—Pro-domaine avec son résidu C—Domaine catalytique avec 3 résidus H—Région charnière riche en P—Domaine homologue à l'hémopexine
<i>Matrilysines</i>	MMP-7 : matrilysine-1 MMP-26 : matrilysine-2	Pré-domaine—Pro-domaine avec son résidu C—Domaine catalytique avec 3 résidus H
<i>MMP membranaires</i>	MMP-14 à 17	Pré-domaine—Pro-domaine avec son résidu C—Domaine catalytique avec 3 résidus H—Région charnière riche en P—Domaine homologue à l'hémopexine contenant un site hydrophobe transmembranaire
<i>Autres</i>	MMP-12 : métallo-élastase MMP-20 : énamelysine MMP-18, 19, 21, 22, 23A/B, 27, 28	NA

Tableau 5. Classification des MMP.

I. Les collagénases

Elles interviennent dans la dégradation du collagène fibrillaire, ce qui entraîne la formation de gélatine (collagène dénaturé) qui sera dégradé par la suite par les gélatinases.

Un exemple de ces MMP est la MMP-13 (collagénase-3), qui est caractérisée par un spectre enzymatique large et est essentiellement exprimée dans les zones nécessitant un remaniement rapide de la MEC, comme le tissu osseux fœtal en développement ou bien sur les sites d'inflammation chronique. Différents carcinomes ont été associés à une hyperactivité de cette collagénase-3.¹¹⁸

II. Les gélatinases

Elles ont une activité protéolytique dirigée contre la gélatine et les collagènes IV et V de la membrane basale (dont son composant principale est la laminine). Elle présente dans son domaine catalytique, 3 séquences peptidiques répétitives analogues au motif II de la fibronectine qui forment un domaine à part entière n'altérant pas la structure du domaine catalytique, qui permettent la liaison à la gélatine, les collagènes et la laminine.

III. Les stromélysines

Dans le cas des stromélysines-1 et 2, elles sont produites par les cellules épithéliales saines mais ont aussi été impliquées dans certains carcinomes. A titre d'exemple, la stromélysine-3 est exprimée dans le cancer du sein conduisant à un mauvais pronostic pour la survie du patient.¹¹⁹

IV. Les matrilysines

Ce sont les MMP les plus simples structurellement et sont exprimées de manière spécifique par les cellules cancéreuses d'origine épithéliales. Un exemple, la MMP-7 (matrilysine-1), diminue l'apoptose et joue un rôle important dans la survie. Cependant, elle est impliquée dans le phénomène d'invasion dans la progression tumorale par un de ses substrats : l'E-cadhérine.^{118,120}

V. Les MMP membranaires

Ces MMP sont liées à la membrane plasmique soit par un pont inositol phosphate soit par l'intermédiaire d'un domaine hydrophobe transmembranaire en C-ter. Elles ont un rôle dans la dégradation de la MEC.

VI. Les autres MMP

Récemment découvertes, leurs rôles restent encore incertains. Dans le cas de la MMP-12, son substrat principal est l'élastine et est sécrétée par les macrophages. Son implication dans le cancer reste encore à être démontré.

3.2.2. Structure des métalloprotéases

Le terme « métalloprotéase » regroupe l'ensemble des enzymes dont l'activité catalytique nécessite un ion métallique, généralement Zn^{2+} . Parmi les différentes classes qui constituent le groupe MMP, certaines possèdent un motif consensus de type **HEXXH** qui sont appelées les zincines. Alors que les deux aminoacides d'histidine (H) constituent les deux premiers ligands de l'atome de zinc, l'acide glutamique (E) va polariser la molécule d'eau qui sera impliquée dans l'hydrolyse de la liaison peptidique.¹²¹

La classification générale des MMP est représentée dans la Figure 24.

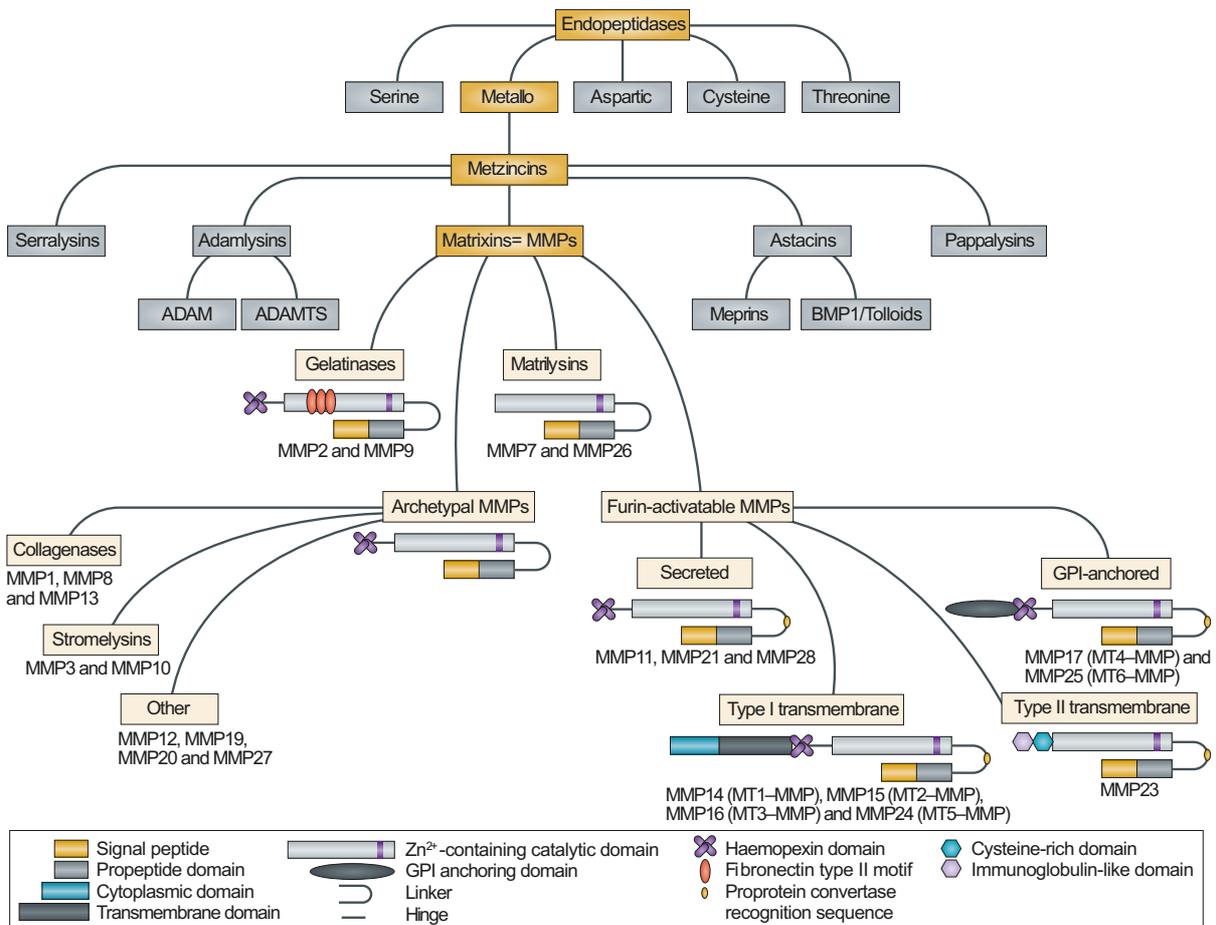


Figure 24. Classification générale des MMP.¹²²

Le séquençage complet du génome humain a permis d'identifier 24 gènes codant pour des MMP donnant lieu à la traduction de 23 protéases de type MMP. En effet, comme vu dans le tableau 5, deux gènes distincts codent pour la même MMP : les gènes A et B de la MMP-23 donnant la MMP-23A et la MMP-23B présentant des séquences en aminoacides strictement identiques.¹²³⁻¹²⁵

Concernant les 23 autres MMP, elles présentent une structure homologue avec 40 à 60% d'identité de séquences en aminoacides. Ce sont donc des protéines qui présentent tout de même une combinaison variable de différents modules sur une même chaîne peptidique.

On identifie donc 5 structures principales : (i) le pré-domaine (ou peptide signal) (ii) le pro-domaine (ou domaine N-terminal), (iii) le domaine catalytique, (iv) la charnière et (v) le domaine homologue à l'hémopexine (ou domaine C-terminal).

I. Le pré-domaine

Toutes les séquences de MMP commencent par une vingtaine de résidus hydrophobes permettant de diriger le peptide synthétisé vers les voies de sécrétion, sauf la MMP-23 qui posséderait une voie de sécrétion alternative d'après Velasco.¹²⁴

II. Le pro-domaine

Composé de 80 aminoacides, il présente une séquence hautement conservée de type PRCGXPD. Comme il recouvre le domaine catalytique, il permet d'empêcher l'accès d'un substrat au site actif. Il contient un résidu cystéine du « cysteine switch » dont son groupement thiol est capable d'interagir avec l'atome du zinc catalytique, maintenant ainsi les pro-MMP sous une forme inactive.¹²⁶ L'activation des MMP implique un clivage dans une zone non structurée du pro-domaine, fragilisant l'interaction du résidu Cys avec l'atome de zinc. Si cette interaction est rompue, l'élimination complète du pro-domaine pourrait être réalisée par autolyse.

Il est à noter ici que seule la MMP-23 ne possède pas cette séquence.¹²⁷ Les MMP seront ensuite synthétisées sous forme de pro-enzymes qui s'activeront dans le milieu extracellulaire par protéolyse, libérant le site actif de la molécule (cf. partie activation et régulation des MMP).

III. Le domaine catalytique

Ce domaine est caractérisé par un site de liaison de l'atome de zinc catalytique HEXGHXXGXXH qui est bien conservé entre les différentes MMP où les 3 résidus histidine de ce motif jouent un rôle important dans l'interaction avec l'atome de zinc. Le domaine catalytique est composé d'environ 170 résidus. Il se présente sous une forme de sphère compacte contenant 3 hélices α et 5 feuilletts β et est stable grâce à la présence de cations interagissant avec des résidus portés par des boucles situées à la surface de la protéine. En plus de l'atome de zinc, ce domaine possède plusieurs ions métalliques structuraux, à savoir : un atome de zinc non-échangeable et un atome de calcium, et selon la nature de la MMP, 2 ou 3 atomes de calcium qui sont nécessaires à la stabilité et à l'activité de l'enzyme.

IV. La charnière

La charnière relie le domaine catalytique des métalloprotéases à leur domaine C-ter, sauf dans le cas des matrilysines où leurs structures primaires contiennent uniquement le pro-domaine et le domaine catalytique. Elle est flexible et est variable en terme de taille, allant de 16 à 65 résidus.¹²⁸ Elle joue un rôle dans les interactions intermoléculaires des MMP impliquant le domaine catalytique et le domaine homologue à l'hémopexine.

V. Le domaine homologue à l'hémopexine

Composé de 210 résidus, il ressemble à une hélice à 4 pales, chacune étant formée d'une hélice α et de 4 brins β antiparallèles. Il est indispensable aux collagénases pour la dégradation de la triple hélice de collagène interstitiel.

3.2.3. Fonctions biologiques des métalloprotéases

Les MMP ont été initialement décrites comme des protéases agissant exclusivement sur les composants de la matrice extracellulaire, avec des conséquences sur le remodelage tissulaire. Il a été montré que les MMP sont capables de traiter un large éventail de substrats matriciels et non matriciel, à savoir, les protéines d'adhésion, les médiateurs d'apoptose, les récepteurs, les chimiokines, les cytokines, les facteurs de croissance et les protéines de liaison entre cellules. En conséquence, ces protéases sont impliquées dans de nombreux processus biologiques comme l'embryogenèse, la cicatrisation des plaies ou encore l'angiogenèse.

Au niveau cellulaire, les MMP sont responsables de la migration et du recrutement cellulaire, de l'inflammation ou encore de l'apoptose de certaines cellules.¹²⁹ Lorsque cette activité endopeptidase est dérégulée, les MMP ont aussi un rôle dans le développement de lésions endovasculaires, d'anévrismes, de néphropathies, d'arthrite ou encore d'ulcérations tissulaires. Cette dérégulation contribue aussi au développement de certains types de cancers.¹³⁰

Pour ajouter une complexité à la biologie des MMP, il est à noter que chaque MMP ne présente pas de spécificité stricte pour un seul substrat. Par conséquent, le collagène peut être dégradé par les collagénases mais aussi par la MMP-9 et la MMP-14.

3.2.4. Activation et régulation des MMP

Les MMP sont synthétisées sous la forme de pré-pro-enzymes par le réticulum endoplasmique (RE) où, elles suivent par la suite une voie de transport intracellulaire afin d'être adressées à leurs cibles extracellulaires, grâce au peptide signal qui permet d'adresser l'enzyme à un compartiment cellulaire déterminé.

Les enzymes, encore sous une forme inactive (zymogène), sont maintenues à ce stade grâce au résidu Cys du pro-domaine qui interagit avec l'ion de zinc. Afin de libérer son site actif et

donc d'exposer son substrat au site catalytique de l'enzyme, celle-ci a besoin de cliver le pro-domaine qui peut être déclenché soit par une réaction chimique entraînant la modification de l'atome de soufre de la séquence PRCGXPD du pro-domaine des formes latentes des MMP ou bien de subir un clivage protéolytique.

Cependant il est à noter que leur activation répond à une régulation compliquée où différentes protéases de différentes classes vont être capables d'activer les MMP, montrant que leur activation *in vivo* peut être réalisée dans le contexte de cascade protéolytique.

Puis, une fois qu'elles sont activées, elles peuvent interagir soit avec leurs substrats, soit devenir à leur tour des « activateurs » permettant de continuer la cascade d'activation.

3.2.5. Inhibition des MMP : les TIMP

L'activité des MMP est contrôlée aussi par une activité inhibitrice endogène, appelée anti-collagénase fibroblastique.¹³¹ Ces inhibiteurs des MMP forment une famille de 4 protéines appelées les TIMP ou « Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases », allant du TIMP-1 à TIMP-4. Le TIMP-1 a été le premier inhibiteur à être isolé et purifié ; son interaction avec la MMP-3 montrait qu'au niveau du site actif, les 5 premiers résidus se positionnaient de façon identique dans le site actif du substrat. Ce type d'interaction a été aussi observé chez la MMP-13 (en gris) quand elle interagit avec TIMP-2 (en bleu),¹³² et est représentée sur la Figure 25 en représentation tridimensionnelle. Les 5 résidus du domaine N-terminal de TIMP (en jaune) se positionnent de façon identique dans le site actif du substrat. L'atome de zinc catalytique est représenté en rose-violet.

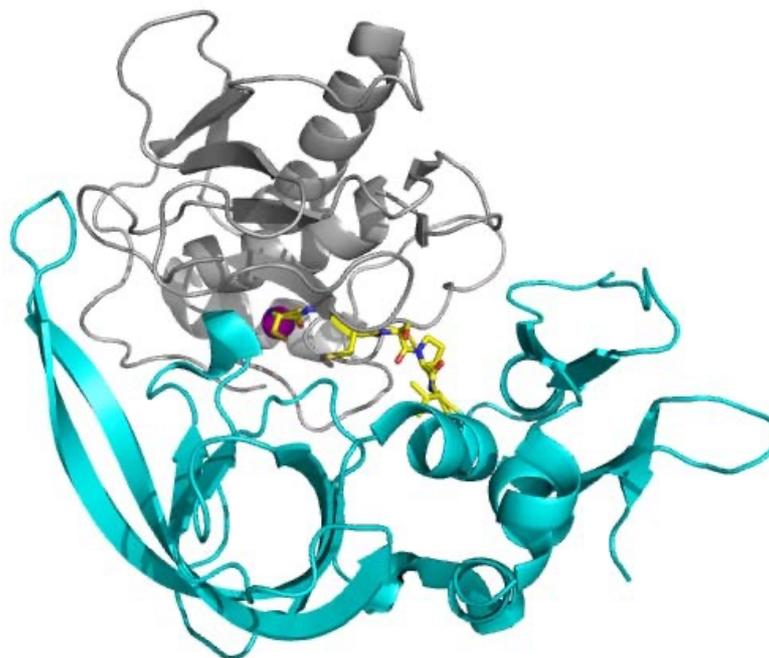


Figure 25. Représentation 3D de l'interaction entre le domaine catalytique de la MMP-13 et des 5 résidus du domaine N-terminal de TIMP-2.¹³³

Plusieurs boucles appartenant à la TIMP-2 projettent des résidus venant en contact avec une grande surface du domaine catalytique. Un très grand nombre de résidus se trouvent donc impliqués entre ces protéines. Il faut aussi noter que la spécificité entre les MMP et les TIMP pourrait être due justement à ces interactions inter-protéines au niveau des boucles qui sont modulées par la nature des résidus des MMP qui participent à cette interaction.

Outre leur rôle de régulation de l'activité protéolytique des MMP et leur activité permettant la survie et la prolifération de lignées hématopoïétiques, les TIMP sont impliquées dans le contrôle d'autres processus biologiques, montrant ainsi leur rôle multifonctionnel.¹³⁴

3.3. Les MMP dans la cicatrisation

Comme nous l'avons déjà vu, de nombreuses MMP interviennent dans le processus de cicatrisation en dégradant la MEC endommagée au niveau des plaies. Elles ont notamment une activité très importante lors de la phase d'inflammation du processus de cicatrisation qui permet le débridement de la plaie. Les principales MMP qui interviennent sont les collagénases, les gélatinases ainsi que les MMP-3, MMP-7 et MMP-10. Afin de permettre la migration des neutrophiles et des monocytes au niveau de la plaie, les MMP vont dégrader l'épithélium qui a été endommagé. Les cellules épithéliales vont aussi intervenir dans le recrutement de certaines MMP telles que celles de la gélatinase et les MMP-1, MMP-3, MMP-7 ou encore la MMP-10. Puisque les MMP sont présentes en grand nombre au sein de la plaie, elles vont entraîner une cascade de réactions via la régulation de certaines chimiokines par protéolyse.

Dans le cas d'une plaie de type aiguë, le taux de MMP est à son maximum durant les 2-3 premiers jours, puis va baisser en fin de phase d'inflammation grâce à la fois aux inhibiteurs TIMP mais aussi à une diminution de leur synthèse par les cellules inflammatoires et/ou épithéliales. Ceci dans le but de permettre la continuité du processus de cicatrisation et donc de laisser place aux protéines impliquées dans la phase de prolifération tissulaire.

3.4. Les MMP dans les plaies chroniques

Dans le cas d'une plaie de type chronique, le taux de MMP va être en plus grande quantité que pour une plaie aiguë qui va subsister et donc maintenir la plaie dans un état inflammatoire prolongé bloquant ensuite le processus de cicatrisation. Cependant des stimuli favorisent cette activité protéasique tels que les bactéries, la présence de corps étrangers ou encore la formation de biofilms. Les collagénases et les gélatinases vont ainsi dégrader les fibres non détériorées de la MEC mais aussi les tissus néoformés, endommageant le lit de la plaie et ceci retardant le processus de cicatrisation. La lésion au niveau du lit de la plaie augmente davantage, entraînant une hausse du recrutement cellulaire et rendant ainsi la plaie chronique.

Partie 4. Stratégie et cahier des charges de ce projet de thèse

Ce premier chapitre traitant de l'étude bibliographique a permis de décrire l'organisation de la peau à la fois dans sa complexité naturelle mais aussi fonctionnelle. Nous avons vu que la peau est la première barrière de protection de l'organisme face au milieu extérieur, et dont l'intégrité de cet organe est primordiale. Ainsi, lorsqu'une plaie est formée, l'organisme va réagir en déclenchant de manière immédiate différentes voies cellulaires programmées et coordonnées qui correspondent au processus de cicatrisation. Cette dernière se déroule généralement en 14 jours en passant par les 4 phases vues dans la première partie, l'hémostase, l'inflammation, la prolifération et le remodelage. Cependant, en conséquence de différents facteurs contribuant à la non-cicatrisation de la plaie (étiologie, état de santé et âge du patient, taille et profondeur de la plaie), sa guérison peut être prolongée, et au-delà de 6 semaines, elle est considérée comme une plaie chronique dont la physiopathologie a été décrite.

Ainsi, les pansements utilisés dans la gestion de ces plaies chroniques allant du simple pansement au pansement intelligent, ont été évoqués dans la deuxième partie de ce chapitre. Il a été aussi décrit les facteurs amenant à la chronicité d'une plaie. Ceux-ci sont de deux types, des facteurs physiques et des facteurs chimiques.

Plusieurs aspects dans la gestion de ces plaies chroniques ont été retenus.

Le premier, est le besoin actuel en outil de diagnostic et de monitoring de l'état d'une plaie. En effet, on a une tendance à l'évolution de capteurs intégrés dans des pansements pour des applications biomédicales, dans le but d'analyser en temps réel l'état de la plaie. Comme le capteur est intégré à un pansement, le personnel médical n'est pas contraint de retirer le pansement pour observer l'état de la plaie ou réaliser des prélèvements. On a besoin d'outils de diagnostic simples et rapides, donc un capteur intégré à un pansement, pouvant monitorer la plaie mais aussi instiller des médicaments au sein de la plaie est un outil très intéressant qui a suscité notre intérêt de développement. Nous avons choisi de travailler avec un capteur à électrodes interdigitées (IDE) car sa structure est petite et permettra d'analyser électriquement par mesure d'impédance et de capacité électrique la structure du capteur lorsqu'elle sera modifiée ou altérée de n'importe quelle façon.

Le second, est l'identification de marqueurs spécifiques des plaies chroniques. Deux en particulier ont retenu notre attention. La première est une métalloprotéase de la matrice, la collagénase-3 (MMP-13) qui témoigne d'une inflammation. Nous avons constaté que celle-ci est essentielle dans le remaniement rapide de la matrice extracellulaire et lorsque celle-ci est en excès, notamment dans les plaies chroniques, le système MMP/TIMP est dérégulé bloquant ainsi toute cicatrisation et bloquant la plaie en phase inflammatoire. La seconde est l'élastase des neutrophiles humain (HNE) qui témoigne d'une infection. Cette élastase a un rôle essentiel dans la réponse immunitaire innée, dans les processus de remodelage tissulaire et dans l'apparition et la résolution de l'inflammation. Ainsi, lorsque cette enzyme est

surexprimée, tout comme la MMP-13, elles empêchent la bonne cicatrisation de la plaie et la maintenance chronique.

Dans le cadre de ce travail de thèse, un capteur IDE fonctionnalisé permettant d'identifier et de mesurer les activités protéasiques de la MMP-13 et de la HNE a été réalisé. Ce capteur sera, in-fine, associé à une étiquette RFID et formera ainsi un capteur-RFID associé au pansement intelligent.

Pour réaliser un tel dispositif, ce manuscrit de thèse s'articule autour de 4 objectifs principaux qui constitueront un cahier des charges.

Le premier, est de concevoir un matériau peptidique hybride spécifique et sensible à l'activité protéasique de chaque enzyme. Pour ce faire, des séquences spécifiques ont été sélectionnées puis réalisées grâce à la synthèse peptidique pour obtenir des peptides hybrides silylés. Une particularité des peptides hybrides réalisés est qu'ils possèdent un groupement métallocène, en particulier le ferrocène, qui permettrait, une fois le matériau greffé sur la surface du capteur d'augmenter les propriétés électriques mesurées.

Une fois les peptides hybrides silylés conçus, un deuxième objectif sera de rendre ces peptides hybrides fonctionnels par l'ajout d'un ou plusieurs groupes alkoxy-silanes qui leur permettront de former un réseau tridimensionnel qui correspondra au futur matériau. Ce matériau sera d'abord étudié en solution, grâce à des groupes triméthylsilyles l'empêchant de former un réseau tridimensionnel et donc ne pouvant pas rentrer dans un procédé sol-gel d'hydrolyse d'alkoxy-silane et de condensation. Le tout sera analysé par LC/MS.

Le troisième objectif sera d'étudier le matériau greffé sur la surface du capteur IDE. Le matériau sera greffé grâce à des groupements triéthoxysilyles qui lui permettra de former le réseau tridimensionnel en entrant dans le procédé sol-gel d'hydrolyse d'alkoxy-silane et de condensation. Ce matériau sera étudié grâce à différentes techniques d'analyses physico-chimiques. On peut citer la spectrométrie photoélectronique X (XPS), le microscope à force atomique (AFM), la microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à la microanalyse par énergie dispersive de rayons X (EDX) et par épifluorescence.

Enfin, lorsque tous ces critères seront validés, le quatrième et dernier objectif de ce projet de thèse sera d'étudier les propriétés électriques du capteur IDE avant et après le greffage du matériau peptidique hybride et d'étudier la résistance du matériau en solution et contrôler que cela ne change pas ou du moins de manière insignifiante les mesures électriques enregistrées. Puis d'étudier et de vérifier que l'activité enzymatique qui agit sur le matériau entraîne une modification irréversible des propriétés électriques enregistrées et qu'elles puissent être significativement importantes.

La représentation schématique combinant à la fois les propriétés électriques enregistrées sur le capteur IDE et le matériau peptidique hybride greffé sur sa surface sont représentés sur la Figure 26 ci-dessous.

La partie **A** correspond au modèle de mesure d'impédance électrique sur le capteur IDE avec un matériau peptidique hybride. La partie **B** correspond au modèle de mesure d'impédance électrique sur le capteur IDE après l'action d'une activité enzymatique sur le matériau peptidique hybride. L'étoile verte correspond à un groupement ferrocène sur le peptide hybride représenté par des serpents bleus. C, R et Z correspondent respectivement à la capacité, la résistance et l'impédance électrique.

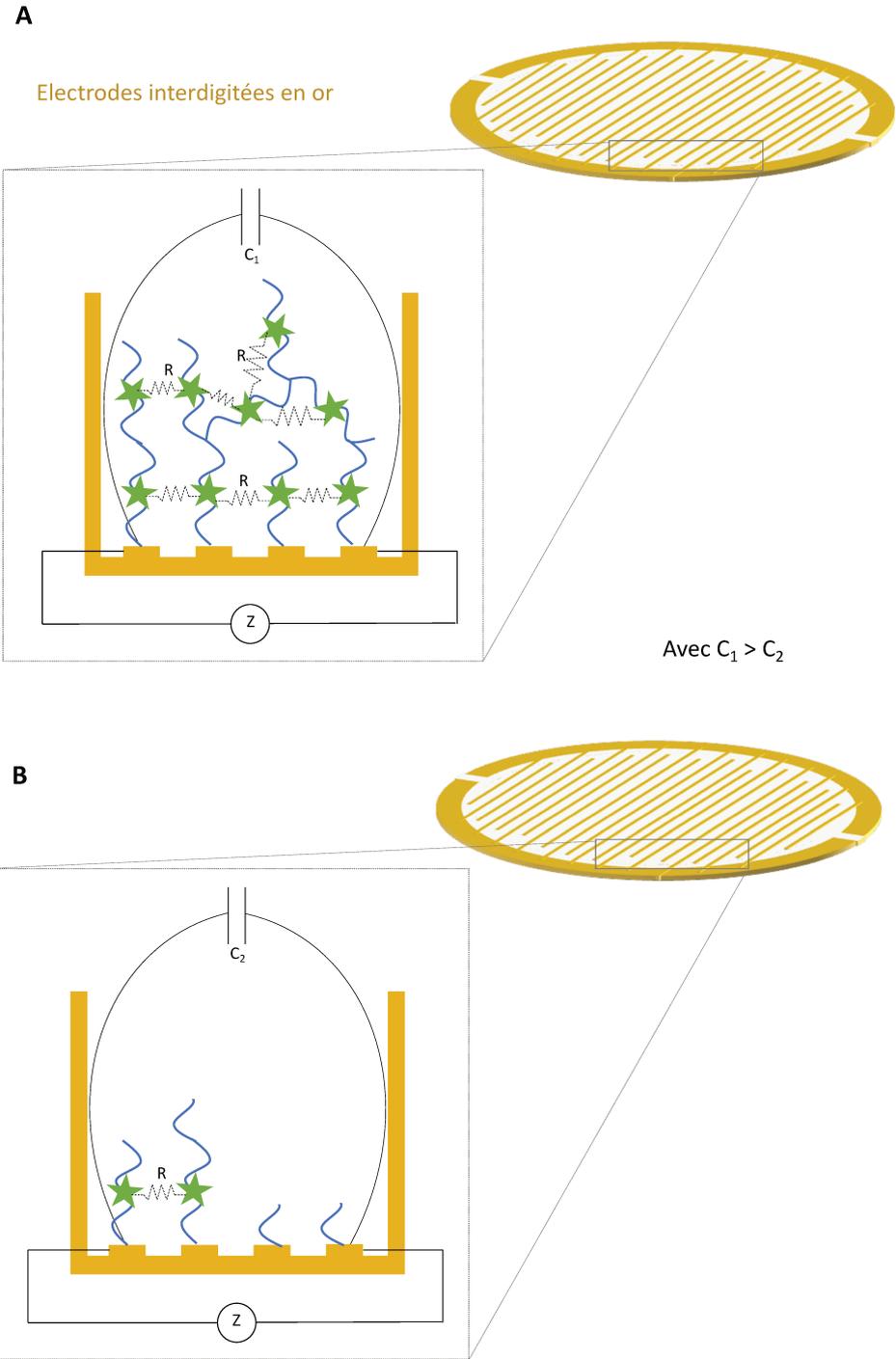


Figure 26. Modèle combinant les propriétés électriques du capteur IDE sur le matériau avant et après une activité enzymatique.

Chapitre 2 :

Conception d'un matériau peptidique sensible à une activité enzymatique

Chapitre 2. Conception d'un matériau peptidique hybride sensible à une activité enzymatique

La première étape dans la conception d'un pansement connecté capable de détecter une activité enzymatique, était de concevoir un matériau sensible à une activité enzymatique donnée et de l'utiliser pour fonctionnaliser le capteur. Les enzymes pertinentes dans le suivi des plaies étant des protéases (i.e. Élastase des neutrophiles humains HNE, témoignant d'une infection, et MMP-13 humaine témoignant d'une inflammation), nous avons choisi d'élaborer ce matériau à partir de peptides dont les séquences étaient reconnues et spécifiques de ces enzymes.

Nous avons émis l'hypothèse que la dégradation de ce matériau (contenant des groupements bien choisis) entraînerait une modification suffisante des propriétés électriques du capteur pour qu'elle puisse être détectée par un analyseur d'impédance, témoignant de la présence d'enzymes actives. Afin d'améliorer la sensibilité de notre dispositif, nous avons envisagé d'introduire un métallocène dans le matériau qui doit améliorer la conductivité lorsqu'il est présent.¹³⁵

Grâce à un travail mené en collaboration entre l'équipe « Aminoacides, Hétérocycles, Peptides et Protéines » (AHPP) de l'IBMM et l'équipe « Chimie Moléculaire et Organisation du Solide » (CMOS) de l'ICGM, une nouvelle famille de matériaux peptidiques hybrides a été développée. Ces matériaux sont préparés par le procédé sol-gel à partir de molécules hybrides, des peptides possédant un ou plusieurs groupes alkoxy-silanes capables par leur hydrolyse et leur condensation chémosélective, de former un réseau hybride tridimensionnel. Dans notre dispositif, cette polymérisation inorganique devra se faire à la surface du capteur afin de former la couche dégradable par les enzymes.

La première partie de ce chapitre est consacrée aux principes fondamentaux de la polymérisation minérale par procédé sol-gel inorganique et souligne ses principaux atouts pour la préparation de peptides hybrides polymérisés.

La seconde partie présente les séquences peptidiques choisies afin qu'elles puissent être reconnues et clivées par la MMP-13 et par l'élastase, ainsi que les peptides contrôles.

La synthèse des peptides hybrides, utilisant d'abord la synthèse peptidique sur support puis l'ajout de groupes alkoxy-silanes sur ces séquences sont présentés dans la troisième partie.

Enfin, la quatrième partie sera consacrée à l'étude de la dégradation de peptides hybrides silylés en solution par une activité enzymatique.

Partie 1. Polymérisation par procédé sol-gel

1.1. Généralités

Le procédé sol-gel a été découvert au 19^{ème} siècle par Ebelmen^{136,137} et Graham¹³⁸. Ils ont alors observé que l'hydrolyse du TEOS (tétraéthyle orthosilicate) dans des conditions acides générait de la silice sous la forme d'un matériau semblable au verre.

L'appellation sol-gel correspond à la contraction des termes solution-gélification. Le principe de ce procédé, souvent appelé « chimie douce »¹³⁹, fait référence à une polymérisation inorganique de précurseurs moléculaires afin de former un réseau d'oxydes à basse température et dans des conditions douces, par opposition avec les préparations de céramiques à haute température par exemple. Les précurseurs généralement utilisés sont des alcoxydes métalliques dont la formule générale est $M(OR)_n$ où M correspond à un métal (Si, Al, Ti, etc.) et R à un groupe alkyle (Me, Et, etc.).

Le métal qui est le plus utilisé pour ce type de procédé reste le silicium, dont ses précurseurs $Si(OR)_4$ sont assez stables et se manipulent très facilement.

Le procédé est caractérisé par une transition sol-gel, représenté sur la Figure 27 ci-dessous. Le « sol » est une suspension stable de particules colloïdales dans un liquide. Ces particules sont en constant mouvement brownien ce qui leur permet de rester en suspension. Elles sont donc ainsi soumises aux forces d'interaction de Van der Waals et aux forces électrostatiques. Le « gel » est un réseau solide tridimensionnel et réticulé qui renferme de grandes quantités de solvant. L'eau est impliquée en tant que réactif et peut être aussi utilisée comme solvant.

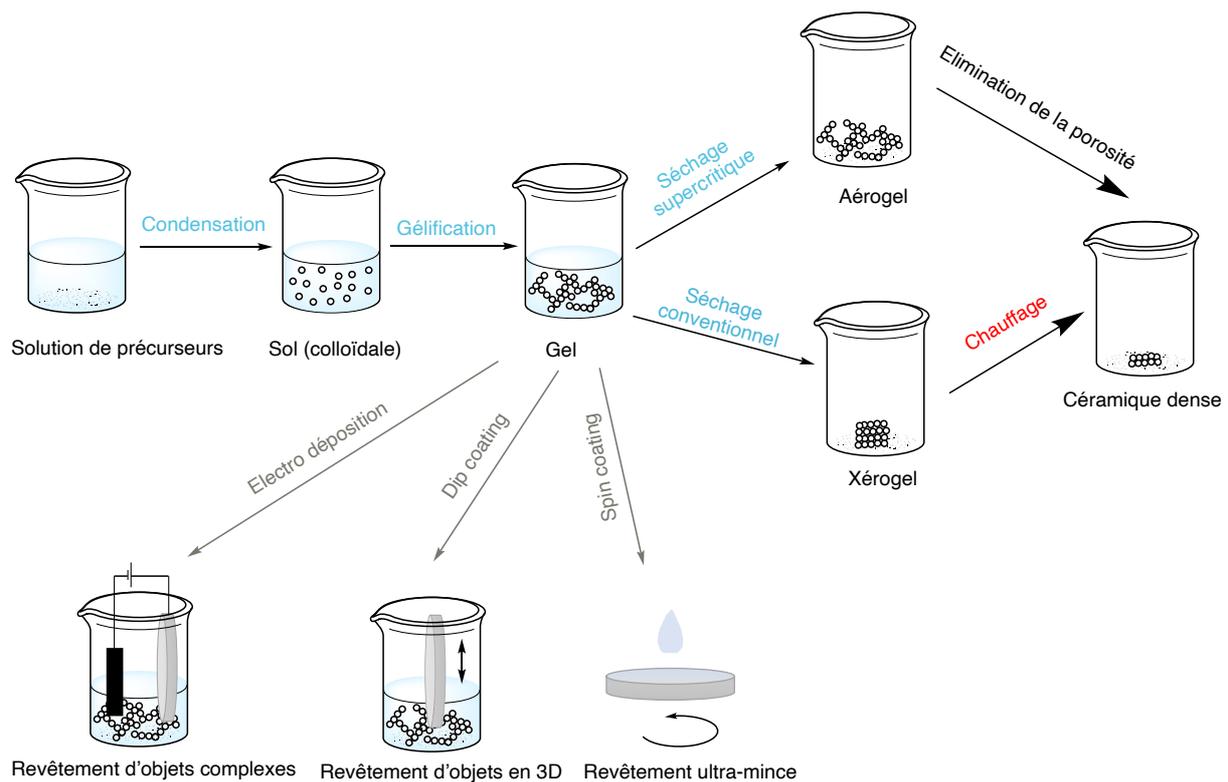


Figure 27. Principe du procédé sol-gel et mises en forme possible.

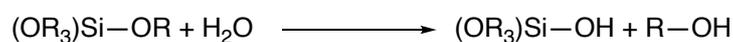
Les conditions relativement douces permettent d’imaginer de nombreux types de mises en forme : par exemple l’électro déposition, le spin ou encore le dip-coating.

Le dip-coating est particulièrement intéressant pour déposer une couche fine et uniforme de biomatériau sur un substrat. J’ai utilisé cette technique de mise en forme pour obtenir une couche de biomatériau sur un substrat durant mon travail de thèse. J’ai également travaillé avec une technique de simple dépôt, par casting, où après évaporation des solvants une couche plus dense de biomatériau est obtenue sur le substrat.

Le procédé sol-gel implique deux grands types de réactions, (i) l’hydrolyse et (ii) la condensation, qui se déroulent simultanément.

1.2. Étape d’hydrolyse

Le procédé sol-gel commence par la formation de groupements silanols (Si-OH) par hydrolyse des groupements alcoxydes (Si-OR) formant un silanol et libérant un alcool (ROH) selon l’Équation 1 ci-dessous :



Équation 1. Réaction d’hydrolyse.

A pH neutre (pH 7), cette réaction d'hydrolyse est lente voire nulle mais peut être catalysée de manière acide, basique ou nucléophile.¹⁴⁰ D'une manière générale, la condensation est la plus lente à pH 2 et est plus rapide en dessous et au-dessus de pH 2 avec une vitesse maximale à environ pH 11 comme le montre la Figure 28.

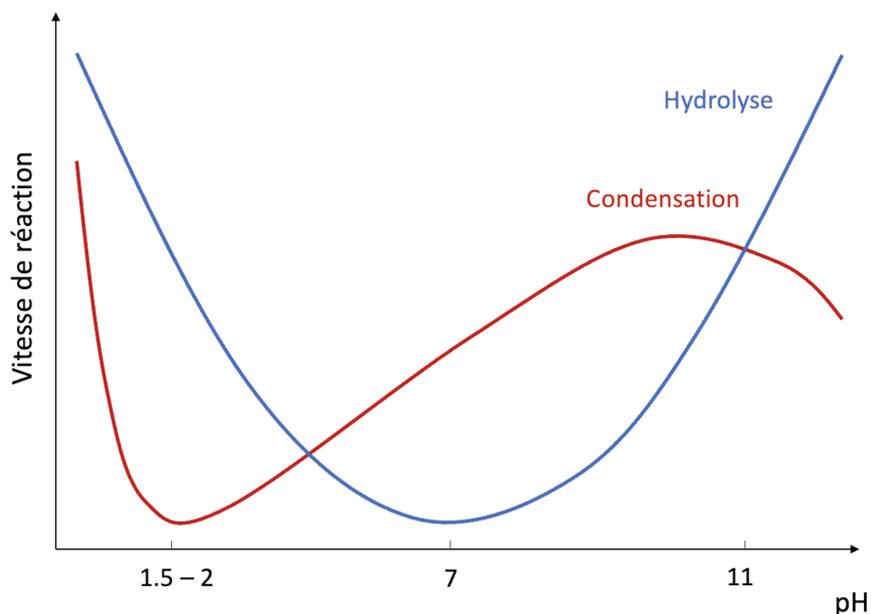
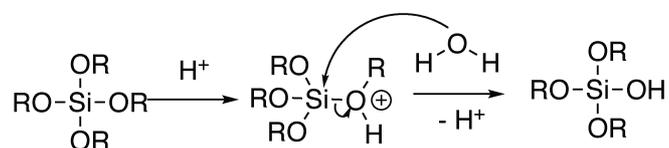


Figure 28. Taux de réaction de l'hydrolyse (courbe bleue) et de la condensation (courbe rouge) du TEOS en fonction du pH.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons choisi de travailler uniquement avec une catalyse de type acide, dont le mécanisme est présenté sur l'Équation 2, car la solution colloïdale sera stable (peu ou pas de condensation) et pourra être déposée sur le substrat. Le pH acide permet d'accélérer l'hydrolyse et de ralentir la condensation contrairement au pH basique.

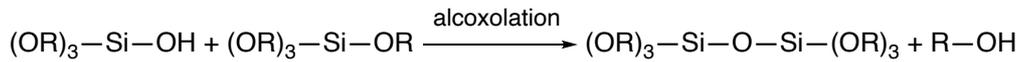


Équation 2. Réaction d'hydrolyse en catalyse acide.

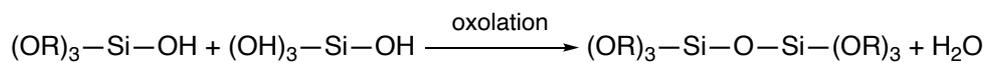
Sur cette Équation 2, l'oxygène provenant d'un groupe alcoxyde est protoné. La protonation permet d'augmenter l'électrophilie de l'atome de silicium et favorise l'attaque nucléophile de l'eau. Elle permet notamment d'augmenter aussi le caractère nucléofuge du groupe partant R-OH.

1.3. Étape de condensation

Cette étape mène à la formation de liaisons siloxanes (Si-O-Si). Il existe deux types de réactions de condensation, (i) l'alcoxolation (Équation 3) qui correspond à la condensation entre des groupements hydroxyles et alcoxydes avec une libération d'alcool, et (ii) l'oxolation (Équation 4) qui correspond à la condensation entre des groupes hydroxyles, avec une libération d'eau.



Équation 3. Réaction d'alcoxolation.



Équation 4. Réaction d'oxolation.

Tout comme l'étape d'hydrolyse, la catalyse (acide, basique, nucléophile) va jouer un rôle important. Le mécanisme de la réaction va être exactement le même que pour celui de l'hydrolyse mais les silanols sont les espèces nucléophiles dans ces conditions acides.

Dans le procédé sol-gel, la Figure 29 montre que le choix du catalyseur est important et va influencer la texture (surface, porosité) du matériau résultant. Ainsi, un pH acide (taux d'hydrolyse élevé) va favoriser la croissance du réseau et va conduire à un gel polymérique. On va qualifier le gel de colloïdal lorsque le réseau va être de taille importante. En revanche, on va le qualifier de gel polymérique lorsque le réseau est constitué de macromolécules.

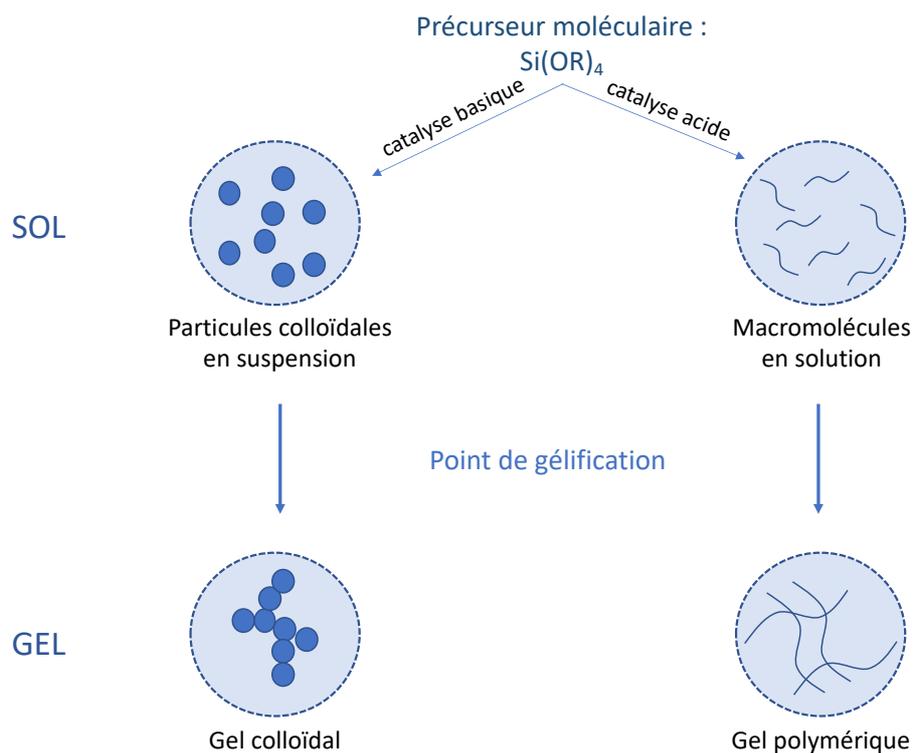


Figure 29. Effets du pH sur la croissance et la structure d'un gel.

Il est à noter que d'autres paramètres interviennent aussi lors de ce procédé, tels que, la nature du précurseur et du solvant, la concentration et la température.

Au lieu d'utiliser des tétra-alkoxysilanes, il est possible d'utiliser des précurseurs organosilanes (i.e. $(\text{RO})_3\text{Si-R}'$, $\text{R}' =$ partie organique), possédant une liaison Si-C covalente et totalement stable. En fonction de la nature de R' , les propriétés du matériau final seront modifiées. On obtient donc des matériaux hybrides organique/inorganique.

L'un des précurseurs organosilanes le plus courant est l'aminopropyltriéthoxysilane (APTES) qui intervient dans la préparation d'un très grand nombre de matériaux à base de silice (e.g. nanoparticules, monolithes, empreintes moléculaires).^{141,142} Il permet de présenter une fonction amine primaire sur le matériau. Celle-ci modifie la charge de surface de la silice, la rendant plus électropositive et sert également de point de fonctionnalisation pour l'accrochage, via des liaisons amides, d'entités organique d'intérêt comme des peptides ou des bras de polyéthylène glycol (PEG).¹⁴³

Bien au-delà de ces organosilanes très simples, nous nous sommes intéressés aux peptides en tant que partie organique (i.e. $(\text{RO})_3\text{Si-peptide}$) pour ce travail de thèse. Les séquences de ces peptides sont des substrats d'enzymes (métalloprotéase de la matrice MMP-13 et élastase des neutrophiles humains HNE). Des précurseurs hybrides de type « peptides silylés » ont

donc été préparés puis utilisés pour synthétiser un biomatériau hybride par le procédé sol-gel.

Deux méthodes ont été principalement utilisées pour la mise en forme du matériau. D'une part, nous avons utilisé la méthode de dip-coating qui permet obtenir une couche mince uniforme dont l'épaisseur est dictée par la vitesse de tirage, comme illustré sur la Figure 30.

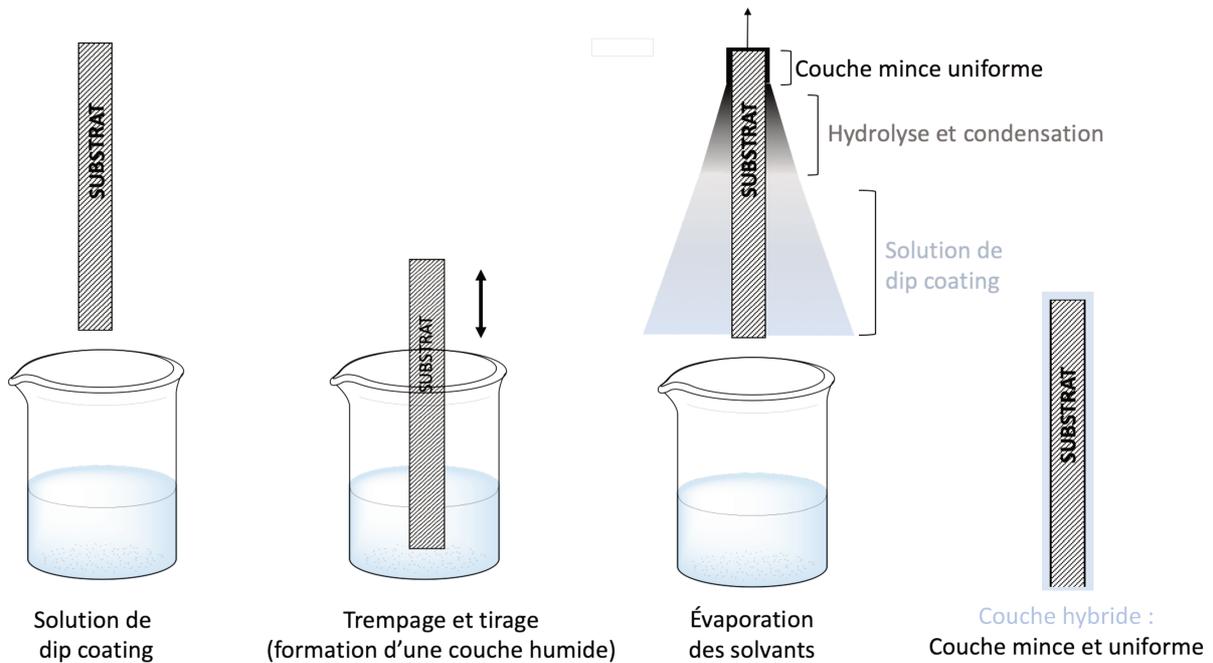


Figure 30. Schéma général du procédé de dip-coating.

D'autre part, le biomatériau hybride a été mis en forme par la méthode de « casting » (ou dépôt), afin d'obtenir une couche plus épaisse, schématisée sur la Figure 31.

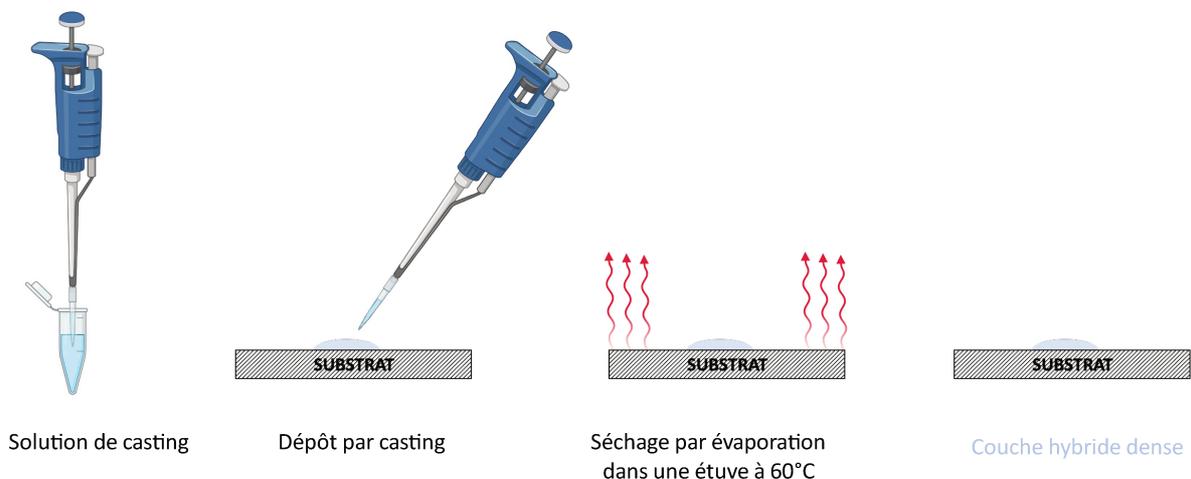


Figure 31. Dépôt du biomatériau par casting. Créé à partir de biorender.com.

Quelle que soit la méthode utilisée, la condensation du matériau hybride à partir des précurseurs, est favorisée par l'évaporation des solvants (eau, alcools) qui pousse la réaction vers la formation des liaisons siloxane Si-O-Si.

Partie 2. Choix des séquences et conception des substrats peptidiques

Comme nous l'avons décrit dans le Chapitre 1. État de l'art : du papyrus au pansement multifonctionnel connecté, de nombreuses enzymes interviennent dans la cicatrisation, certaines sont aussi impliquées dans la colonisation bactérienne. Notre choix s'est porté sur deux enzymes humaines qui témoignent d'une mauvaise cicatrisation : la MMP-13 et l'élastase des neutrophiles humains (HNE) qui peuvent être liées respectivement à une inflammation et à une infection.

2.1. Choix des substrats peptidiques

2.1.1. La métalloprotéase matricielle 13 : MMP-13

Il existe de nombreuses MMP qui exercent un rôle physiologique important dans les processus de cicatrisation, notamment dans la phase de remodelage où elles dégradent l'ancien collagène et participent à la différenciation cellulaire. Ce n'est pas le cas de la MMP-13 qui est exprimée par les fibroblastes dans les cancers cutanés et les inflammations chroniques, mais pas dans les plaies cutanées qui se cicatrisent normalement.¹⁴⁴ Sa présence est donc synonyme d'un mauvais pronostic de cicatrisation.

La MMP-13 (en vert), représentée sur la Figure 32, est une endopeptidase à zinc et joue un rôle dans la dégradation de la MEC. Les billes vertes correspondent aux ions de calcium et les 2 plus petites correspondent aux ions chlorure. Les 2 billes violettes indiquées par des flèches sont les atomes de zinc catalytique et structural. La partie violette correspond au peptide du pro domaine.

Comme la plupart des MMP, la MMP-13 est sécrétée sous la proforme inactive, avec un poids moléculaire d'environ 53,82 kDa. La pro enzyme est activée par l'APMA (4-aminophenyl mercuric acid) qui va ainsi générer l'enzyme sous sa forme active avec un poids moléculaire de 48 kDa. L'APMA est un composé organomercuriel qui agit sur le groupe sulfhydryle formant le thiol du résidu cystéine, entraînant le déplacement du site actif de la MMP. Celle-ci s'auto clive très facilement sous une forme active avec un poids moléculaire plus faible (30 kDa) qui est toujours capable de cliver le collagène de type II. Elle présente une activité gélatinolytique et est inhibée par les TIMP (Chapitre 1 Partie 3.2.5. Inhibition des MMP : les TIMP).

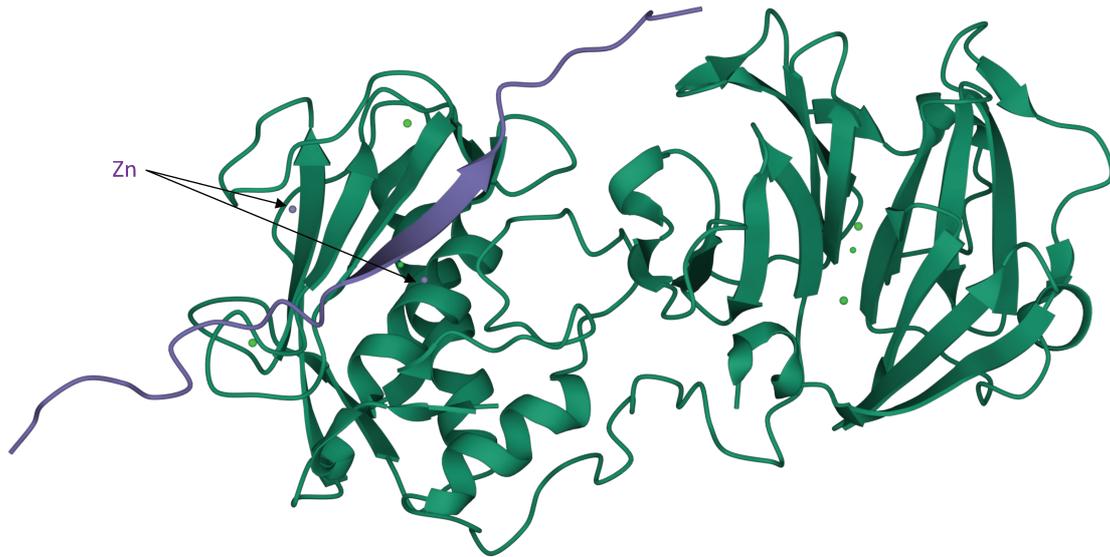


Figure 32. Représentation de la MMP-13 avec son peptide provenant du pro domaine ¹⁴⁵ (Source : rcsb.org).

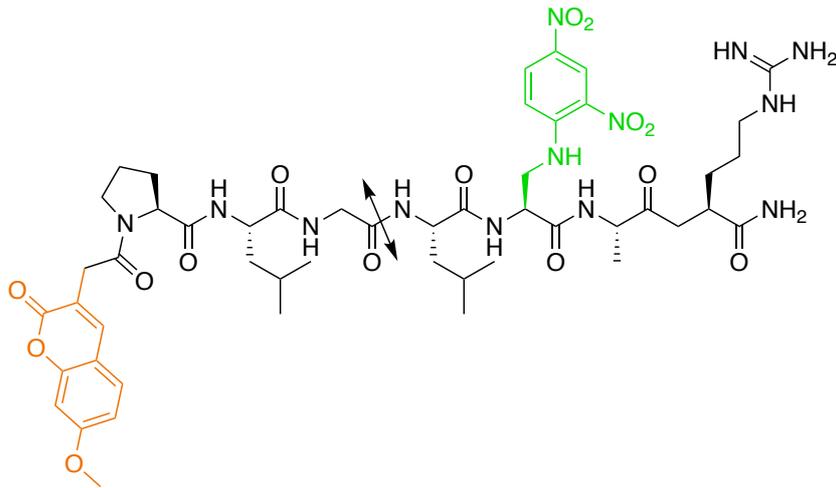
La MMP-13 comprend un peptide signal de 19 aminoacides surligné en jaune (Figure 33). Le pro domaine (en vert) est constitué de 84 aminoacides et possède un résidu cystéine qui permet de maintenir l'activité enzymatique sous forme latente en réagissant comme un quatrième ligand de l'atome de zinc Zn. Ainsi, le clivage protéolytique du pro domaine élimine cette cystéine, libérant ainsi une place de ligand sur le zinc et activant le site catalytique. Ce dernier va polariser la molécule d'eau qui sera impliquée dans l'hydrolyse de la liaison peptidique.

Le domaine catalytique avec trois résidus histidine permettent de maintenir l'atome de zinc. Le domaine homologue (4 séquences répétées notées de 1 à 4) à l'hémopexine (HPX) en position C-terminale, relié au domaine catalytique par la région charnière. Il est nécessaire à la MMP-13 pour la dégradation de la triple hélice du collagène interstitiel.¹⁴⁶ Il se situe de la position 281 (résidu P) jusqu'à la position 471 (résidu C) de la Figure 33.

Peptide signal	10	20	30	40	50
	MHPGVLAAFL	FLSWTHCRAL	PLPSSGGDEDD	LSEEDLQFAE	RYLRSYYHPT
Pro peptide	60	70	80	90	100
	NLAGILKENA	ASSMTERLRE	MQSFFGLEVT	GKLDDNTLDV	MKKPRCGVPD
	110	120	130	140	150
	VGEYNVFPRT	LKWSKMNLTY	RIVNYTPDMT	HSEVEKAFKK	AFKVWSDVTP
	160	170	180	190	200
	LNFTRLHDLGI	ADIMISFGIK	EHGDFYPPFDG	PSGLLAHAFAP	PGPNYGGDAH
	210	220	230	240	250
	FDDDETWTSS	SKGYNLFLVA	AHEFGHSLGL	DHSKDPGALM	FPIYTYTGKS
	260	270	280	290	300
	HFMLPDDDDVQ	GIQSLYGGPD	EDPNPKHPKT	PDKCDPSLSL	DAITSLRGET
Domaine HPX 1	310	320	330	340	350
	MIFKDRFFWR	LHPQQVDAEL	FLTKSFWPEL	PNRIDAAYEH	PSHDLIFIFR
Domaine HPX 2	360	370	380	390	400
	GRKFWALNGY	DILEGYPKKI	SELGLPKEVK	KISAAVHFED	TGKTLFSGN
Domaine HPX 3	410	420	430	440	450
	QVWRYDDTNH	IMDKDYPRLI	EEDFPGIGDK	VDAVYEKNGY	IYFFNGPIQF
Domaine HPX 4	460	470			
	EYSIWSNRIV	RVPANSILW	C		

Figure 33. Représentation des différents domaines de la MMP-13 d'après BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).¹⁴⁷

Plusieurs substrats synthétiques de cette enzyme ont été décrits. Le Tableau 6 récapitule les séquences de clivage les plus fréquentes ainsi qu'un substrat à fluorescence quenché. Il s'agit du composé Mca-Mat (Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂) dont sa séquence est clivée par la MMP-13 entre la glycine et la leucine (Figure 34). Mca correspond au (7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl), et Dpa correspond au N3-(2,4-dinitrophenyl)-l-2,3-diaminopropionyl qui bloque la fluorescence du Mca. Ce substrat est dilué en solution dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et est commercialisé par Enzo Life Science. Il sera utilisé dans la suite de ce manuscrit afin de tester l'activité enzymatique de la MMP-13. Lorsque l'enzyme clive le substrat, la partie N-terminale comprenant le Mca émet de la fluorescence mesurable facilement à 405 nm ($\lambda_{exc} = 320\text{nm}$).



Molecular Weight: 1092,18 g.mol⁻¹

Figure 34. Représentation du substrat Mca-Mat. Le groupement émetteur de fluorescence (Mca) est en orange et le groupement inhibiteur de fluorescence (Dpa) en vert. La double flèche noire correspond à l'endroit de clivage reconnu par la MMP-13.

Les séquences des substrats ont été obtenues à partir de la base de données MEROPS qui regroupe des informations sur les peptidases et leurs inhibiteurs.¹⁴⁸ La classification des enzymes est fondée sur des similitudes des structures tertiaire et primaire. Les comparaisons des structures sont appliquées aux séquences impliquées dans les réactions comprenant notamment le site actif des peptidases mais aussi le site réactif de leurs inhibiteurs.

Le site WebLogo permet de créer des logos de séquence.¹⁴⁹ Cela correspond à une représentation graphique d'un alignement de séquences multiples d'acides aminés ou d'acides nucléiques. Chaque logo est constitué d'une pile de symboles, chaque pile correspondant pour chaque position dans la séquence. Sa hauteur totale détermine la conservation de la séquence à cette position tandis que la hauteur des symboles dans la pile indique la fréquence relative de chaque acide aminé ou acide nucléique à cette position. De manière générale, un logo de séquence fournit une description plus riche et plus précise qu'une séquence consensus comme un site de liaison ou de clivage.

Pour générer ces logos, les séquences autour des sites de clivage (dix ou plus) sont alignées, et un modèle de Markov caché (MMC) est généré (modèle statistique composé d'états cachés et de transitions unidirectionnelles qui matérialisent la possibilité de passer d'un état à un autre). Le MMC est converti en un logo à l'aide du site WebLogo qui va ainsi permettre de montrer la fréquence à laquelle chaque acide aminé a été trouvé dans chaque position autour de la liaison clivable. Les résidus d'acides aminés préférés dans chaque site sont représentés dans le code habituel à une lettre, et codés par couleur selon le type chimique : vert pour les acides aminés polaires (Gly, Ser, Thr, Tyr, Cys, Gln, Asn), rouge pour les acides aminés acides

(Asp, Glu), bleu pour les acides aminés basiques (Arg, Lys, His) et noir pour les acides aminés hydrophobes (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, Phe, Met). Chaque motif de clivage est également représenté en texte clair, avec des traits obliques indiquant les positions P4-P4'. Des lettres plus grandes et plus petites, en majuscules ou en minuscules, sont utilisées pour donner une sensation intuitive de la force de la préférence de spécificité. Un exemple pour le cas de la MMP-13 est représenté dans la Figure 35 ci-dessous.

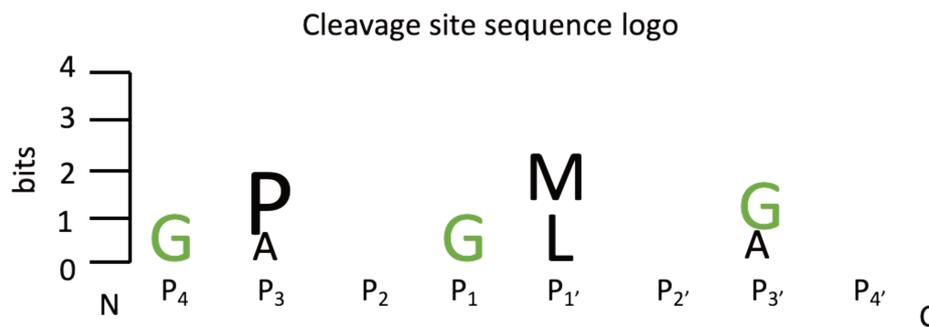


Figure 35. Tableau de spécificité de la MMP-13. Inspiré à partir de MEROPS.

On obtient ainsi le modèle de clivage suivant : G/PA/-/G † L/-/G A/- (basé sur 147 clivages).

Ce tableau de spécificité montre la fréquence à laquelle chaque aminoacide a été trouvé dans chaque position autour de la liaison scissile, représentée par la croix rouge.

Cela nous montre que la MMP-13 clive préférentiellement entre une glycine (P₁) et une leucine (P_{1'}) (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Le Tableau 6 ci-dessous liste un résumé des sites de clivage par la MMP-13 sur des séquences peptidiques ainsi que sur le substrat fluorescent Mca-Mat.

Notation	Séquence	Remarques
A	G-P-X-G † M-X-G-X	Site de coupure entre G et M
B	G-P-X-G † L-X-G-X	Site de coupure entre G et L
Mca-Mat	Mca-P-L-G † L-Dpa-A-R-NH ₂	Substrat fluorescent

Tableau 6. Exemples de substrats de la MMP-13. Avec X correspondant à un aminoacide variable.

Nous nous sommes intéressés à deux sites de clivage par la MMP-13. D'abord, entre une glycine et une méthionine (séquence A) et entre une glycine et une leucine (séquence B).

Nous avons choisi de travailler avec la séquence A car cette dernière est décrite dans les brevets des laboratoires WoundCheck¹¹⁴ décrit dans le Chapitre 1. État de l'art : du papyrus au pansement multifonctionnel connecté.

Le substrat à fluorescence quenchée Mca-Mat sera utilisé comme contrôle de l'activité enzymatique de la MMP-13 commerciale que nous avons utilisée dans ce travail de thèse.

2.1.2. Élastase des neutrophiles humains (HNE)

L'élastase des neutrophiles humains, ou HNE (Figure 36), est une endopeptidase protéolytique appartenant à la famille des protéases à sérine de type chymotrypsine.

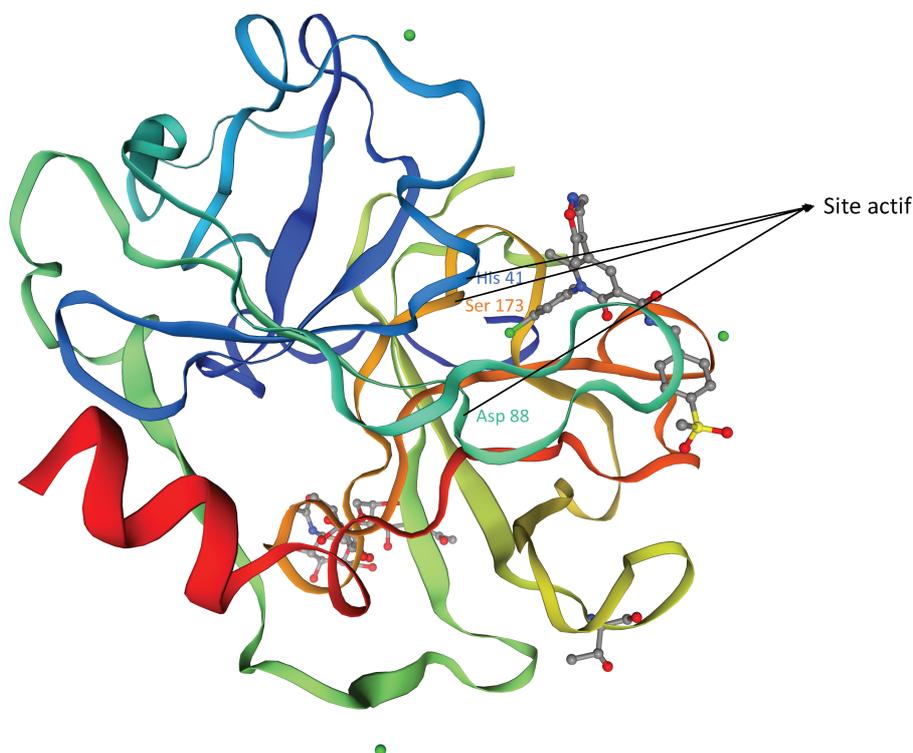


Figure 36. Structure tridimensionnelle de l'élastase des neutrophiles humains (HNE) (Source : ExPASy). Le site actif de l'HNE est indiqué par les aminoacides His 41 Ser 173 et Asp 88. Les billes vertes correspondent aux ions chlorure.

Cette protéase très active a révélé une large spécificité de substrat et est l'une des rares protéases capables de dégrader l'élastine, protéine de la matrice extracellulaire, d'où son nom. Elle est capable de décomposer des structures mécaniquement importantes de (i) la propre matrice cellulaire du corps (par exemple, des protéines comme le collagène et la fibronectine) et (ii) des protéines étrangères (par exemple, les protéines de la paroi cellulaire externe des bactéries Gram-négatives). En outre, la HNE clive une variété de protéines

endogènes et exogènes, modulant ainsi leur activité biologique, y compris (i) l'activation d'autres protéases bioactives, (ii) la libération de facteurs de croissance et la libération de récepteurs liés à la surface cellulaire, et (iii) l'inactivation d'inhibiteurs de protéases endogènes et de facteurs de virulence exogènes.

En résumé, elle joue un rôle central dans la réponse immunitaire innée (défense de l'hôte contre les bactéries), dans les processus de remodelage tissulaire et dans l'apparition et la résolution de l'inflammation.

Les produits résultants de la dégradation de la fibronectine vont permettre de stimuler la libération des MMP.^{150,151} Il est à noter que lorsque la fibronectine est intacte celle-ci est absente dans les plaies chroniques mais présente au début de la cicatrisation dans le lit de la plaie. Ceci entraîne donc une activité protéasique élevée au sein du lit de la plaie.¹⁵²

Nous l'avons choisie comme marqueur d'une mauvaise cicatrisation puisqu'elle est l'une des protéinases neutres les plus abondantes présentes dans les plaies chroniques.¹⁵³⁻¹⁵⁵ Par ailleurs, son activité est très élevée dans les liquides plaies chroniques (environ 22.97 ± 13.27 U/mL) et est très réduite dans les plaies en cours de cicatrisation (2.89 ± 1.27 U/mL).¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

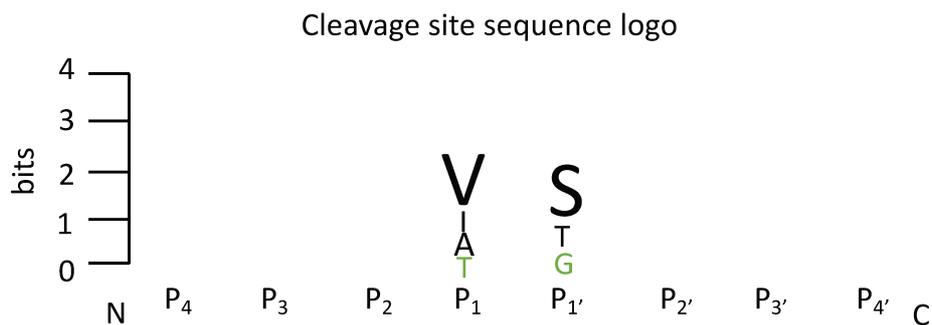
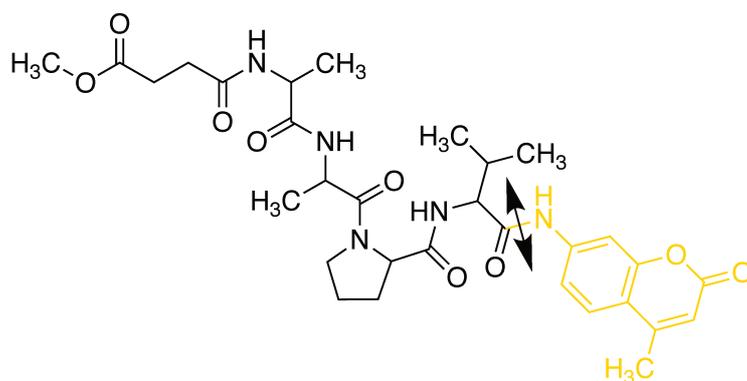


Figure 37. Tableau de spécificité de la HNE. Inspiré à partir de MEROPS.

La Figure 37 permet d'obtenir le modèle de clivage de la HNE suivant : -/-/ -/V I A T⁺ S T G/-/-/- (basé sur 483 clivages). Comme on peut le voir au contraire de la MMP-13, la HNE tolère tout type d'acide aminé en position P1'. Elle montre toutefois une grande préférence pour la valine en position P1. La HNE clive à de multiples endroits comme entre une valine et une glycine, entre une isoleucine et une thréonine et entre une valine et une sérine. Elle montre une sélectivité particulière pour cette dernière liaison et c'est pour cela que nous avons Val-Ser comme point de clivage dans les peptides que nous avons conçus.

Le substrat fluorescent MeOSuc-AAPV-AMC permet de tester l'activité enzymatique de l'HNE et représenté sur la Figure 38. MeOSuc est un résidu d'ester méthylique succinyl et AMC est un résidu de 7-amino-4-méthyl coumarine. Lorsqu'elle est acylée, ici par un résidu valine,

l'AMC n'est pas fluorescente. Une fois clivée par la HNE et sous forme amine libre, elle le devient.



Molecular Weight: 627,70 g.mol⁻¹

Figure 38. Substrat fluorescent MeOSuc-A-A-P-V-AMC. Le groupement émetteur de fluorescence est l'AMC en jaune, une fois clivée par la HNE au niveau de la double flèche noire.

Quatre séquences reconnues par l'acylée HNE et présentes de nombreuses fois dans MEROPS sont décrites dans le Tableau 7 avec le substrat fluorescent MeOSuc-AAPV-AMC, noté plus simplement MeOSuc.

Notation	Séquence	Remarques
C	X-E-P-V † S-L-X-X	Site de coupure entre V et S
D	X-E-L-I † T-L-X-X	Site de coupure entre I et T
E	X-X-P-V † G-L-X-X	Site de coupure entre V et G
F	X-X-P-I † S-L-X-X	Site de coupure entre I et S
MeOSuc	MeOSuc-A-A-P-V † AMC	Substrat fluorescent

Tableau 7. Exemples de séquences consensus de substrats de la HNE. Avec X correspondant à une variété d'acides aminés différents.

Nous avons donc choisi d'utiliser la séquence C, puisque d'après la base de données de MEROPS, la sélectivité de clivage par la HNE est plus importante entre une valine et une sérine.

2.2. Design des peptides hybrides

Afin de concevoir un matériau dégradé par les enzymes nous avons utilisé les séquences A et C décrites dans la partie précédente pour avoir une spécificité pour la MMP-13 et la HNE, respectivement.

Nous avons ensuite décidé de les fonctionnaliser éventuellement avec un métallocène, le ferrocène carboxylique acide (Figure 39) qui, une fois couplé à une amine libre présente dans la séquence du peptide (i.e. chaîne latérale de la lysine), fera partie du morceau de séquence découpé par les enzymes et libéré de la surface. Nous avons émis l'hypothèse que cette perte du métallocène entraînerait une modification de la capacité et de la résistance électrique, dont le fonctionnement sera décrit dans le Chapitre 3. Matériaux peptidiques hybrides dégradables par l'activité enzymatique de la MMP-13.

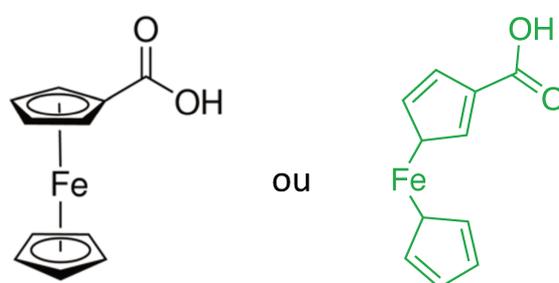


Figure 39. Deux représentations du ferrocène carboxylique acide ($C_{11}H_{10}FeO_2$) - $M_w = 230,04 \text{ g.mol}^{-1}$. La représentation de gauche en noir correspond à la représentation conventionnelle du ferrocène. La représentation de droite, en vert, sera utilisée dans ce manuscrit.

Deux types de géométries de blocs peptidiques permettant de préparer le matériau hybride ont été imaginés : des peptides mono silylés et bi silylés.

Les peptides mono silylés seront ancrés à la surface du matériau, et pourront former une couche relativement fine. Par exemple, une densité de greffage de 0.1 peptide/nm^2 a pu être obtenue par greffage de ce type de peptide sur des surfaces de verre¹⁵⁹, de silice¹⁶⁰ ou de silicone.¹⁶¹

Le groupement trialkoxysilane sera placé du côté N-terminal via un isocyanatopropyle trialkoxysilane, formant ainsi une liaison urée. Si un ferrocène est introduit, il sera placé à l'autre extrémité du peptide, sur la chaîne latérale d'une lysine introduite en C-terminale de la séquence. La Figure 40 représente pour exemple le substrat peptide de la MMP-13 mono silylé.

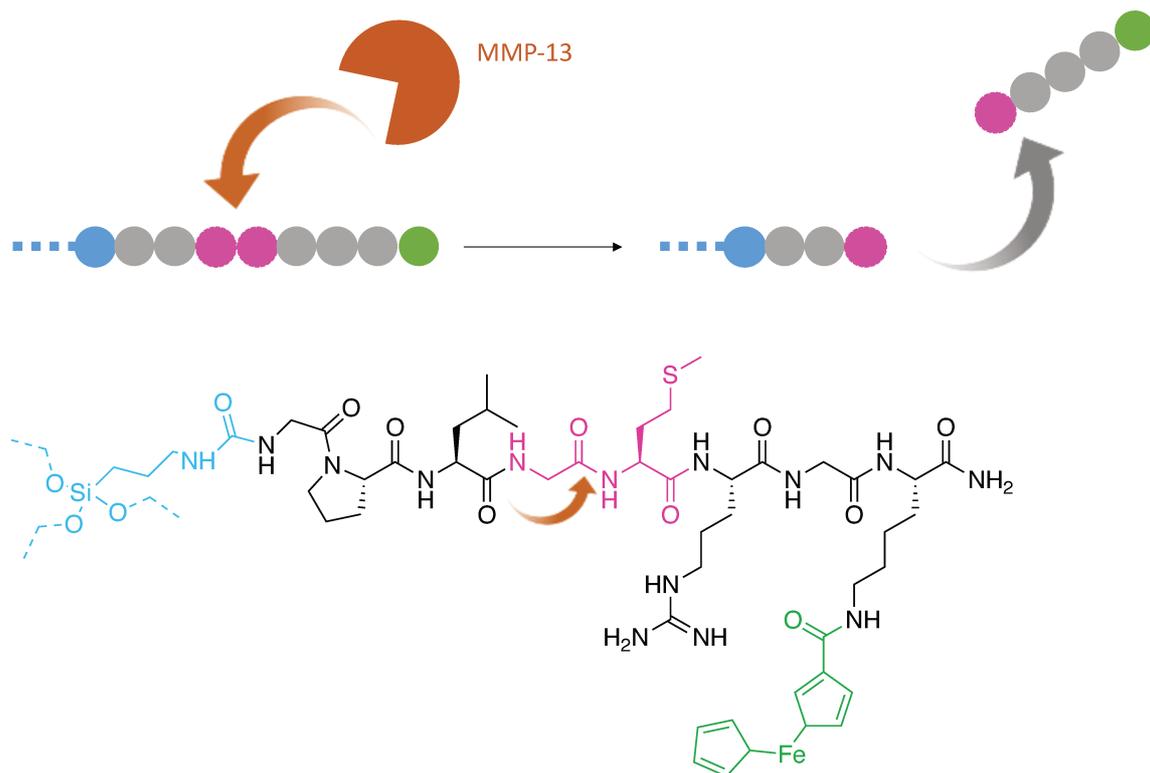


Figure 40. Peptide mono fonctionnel silylé. Le groupe ferrocène est en vert et le groupe trialkoxysilane est en bleu. Les parties pointillées bleues correspondent au greffage sur un matériau. Le site de coupure reconnu par la MMP-13 (orange + flèche) est indiqué en rose.

Les peptides bis-silylés ont été conçus par répétition de deux séquences de substrat, encadrant et permettant ainsi de libérer une partie centrale de la séquence en cas de coupure. Possédant deux fonctions polymérisables, on s'attend à la formation de couches plus épaisses et d'un réseau tridimensionnel plus important à la surface du matériau.

La Figure 41 représente le substrat bi fonctionnel de la MMP-13. C'est sur cette partie, via une lysine, que le ferrocène sera introduit après l'enlèvement sélectif d'un groupement protecteur bloquant la fonction amine de la chaîne latérale de la lysine.^{162,163}

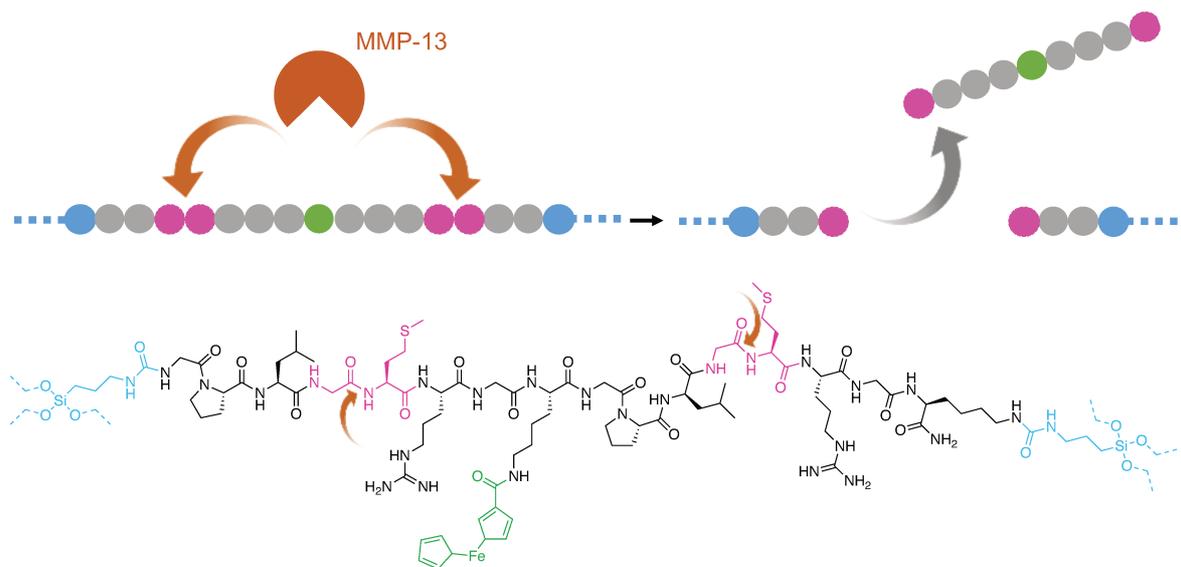


Figure 41. Peptide bi fonctionnel bis-silylé. Les groupes trialkoxysilanes polymérisables sont représentés en bleu, en vert le groupe ferrocène et en rose les sites de coupure de la MMP-13 (représentée en orange + flèches).

Le Tableau 8 présente tous les peptides hybrides synthésés durant cette thèse.

Réf	Code composé	Séquence	MW (g.mol ⁻¹)	m/z exp. [M+2H] ²⁺	Rdt
1	Mono MMP-13 Fe	Si(OEt) ₃ (CH ₂) ₃ NHCO-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Lys(Fc)-NH ₂	1273.4	635.3	43%
2	Mono MMP-13 Fluo	Si(OEt) ₃ (CH ₂) ₃ NHCO-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Lys(Fluo)-NH ₂	1366.61	681.5	39%
3	Mono MMP-13 Fe (D)	Si(Me) ₃ (CH ₂) ₃ NHCO-βala-pro-leu-βala-met-arg-βala-lys(Fc)-NH ₂	1315.5	656.3	40%
4	Bi MMP-13 Fe	Si(OEt) ₃ (CH ₂) ₃ NHCO-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Lys(Fc)-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Lys[CONH(CH ₂) ₃ Si(OEt) ₃]NH ₂	2149.4	1070.1	21%
5	Bi MMP-13 Fe Contrôle solution	Si(Me) ₃ (CH ₂) ₃ NHCO-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Lys(Fc)-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Lys[CONH(CH ₂) ₃ Si(Me) ₃]NH ₂	2137.6	1069.8	21%
6	Bi MMP-13 Fluo	Si(OEt) ₃ (CH ₂) ₃ NHCO-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Lys(Fluo)-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Lys[CONH(CH ₂) ₃ Si(OEt) ₃]NH ₂	2326.8	1161.5	17%
7	Bi MMP-13 Nle	Si(OEt) ₃ (CH ₂) ₃ NHCO-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Nle-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Lys[CONH(CH ₂) ₃ Si(OEt) ₃]NH ₂	1922.4	959.4	23%
8	Bi MMP-13 Fe (D)	Si(OEt) ₃ (CH ₂) ₃ NHCO-βala-pro-leu-βala-met-arg-βala-lys(Fc)-βala-pro-leu-βala-met-arg-βala-lys[CONH(CH ₂) ₃ Si(OEt) ₃]NH ₂	2401.93	1199.1	15%
10	Partie coupée 1 par MMP-13	Si(OEt) ₃ (CH ₂) ₃ NHCO-Gly-Pro-Leu-Gly-OH	588.78	293.3	70%

11	Partie coupée 2 par MMP-13	Ac-Met-Arg-Gly-Lys[CONH(CH ₂) ₃ Si(OEt) ₃]NH ₂	779.04	388.5	67%
12	Bi HNE Fe	Si(OEt) ₃ (CH ₂) ₃ NHCO-Gly-Glu-Pro-Val-Ser-Leu-Leu-Pro-Lys(Fc)-Gly-Glu-Pro-Val-Ser-Leu-Leu-Pro[CONH(CH ₂) ₃ Si(OEt) ₃]NH ₂	2269.51	1133	13%
13	Bi HNE Fe Contrôle solution	Si(Me) ₃ (CH ₂) ₃ NHCO-Gly-Glu-Pro-Val-Ser-Leu-Leu-Pro-Lys(Fc)-Gly-Glu-Pro-Val-Ser-Leu-Leu-Pro[CONH(CH ₂) ₃ Si(Me) ₃]NH ₂	2257.68	1127.08	13%
14	Bi HNE Fe (D)	Si(OEt) ₃ (CH ₂) ₃ NHCO-βala-glu-pro-val-ser-leu-leu-pro-lys(Fc)-βala-glu-pro-val-ser-leu-leu-pro[CONH(CH ₂) ₃ Si(OEt) ₃]NH ₂	2437.83	1217.1	9%
15	Bi HNE Fluo	Si(OEt) ₃ (CH ₂) ₃ NHCO-Gly-Glu-Pro-Val-Ser-Leu-Leu-Pro-Lys(Fluo)-Gly-Glu-Pro-Val-Ser-Leu-Leu-Pro[CONH(CH ₂) ₃ Si(OEt) ₃]NH ₂	2435.03	1215.6	11%
16	Bi HNE Fluo (D)	Si(OEt) ₃ (CH ₂) ₃ NHCO-βala-glu-pro-val-ser-leu-leu-pro-lys(Fluo)-βala-glu-pro-val-ser-leu-leu-pro[CONH(CH ₂) ₃ Si(OEt) ₃]NH ₂	2615.18	1305.5	10%
17	Partie coupée 1 par HNE	Si(OEt) ₃ (CH ₂) ₃ NHCO-Gly-Glu-Pro-Val-OH	562.24	280.1	66%
18	Partie coupée 2 par HNE	Ac-Ser-Leu-Leu-Pro[CONH(CH ₂) ₃ Si(OEt) ₃]NH ₂	590.75	294.1	64%

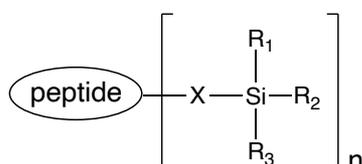
Tableau 8. Liste des peptides hybrides synthétisés durant cette thèse.

Fc en vert désigne l'acide carboxylique Ferrocène et Fluo en jaune désigne la fluorescéine introduite via l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Ils ont été introduits tous les deux à l'extrémité de la chaîne latérale de la lysine. Les aminoacides en roses correspondent aux zones de coupure par l'enzyme. Le rendement est calculé après purification à partir de la charge de résine de départ.

Partie 3. Synthèse de peptides hybrides silylés

3.1 Généralités

Les peptides hybrides silylés sont définis comme des peptides fonctionnalisés par un ou plusieurs groupes de type silyle, comme représenté sur la Figure 42 ci-dessous.



R₁, R₂, R₃ : Cl, OH, Me, OR et X : espaceur

Figure 42. Formule générale d'un peptide hybride silylé.

L'atome de silicium est lié à la partie peptidique par un bras espaceur qui contient une liaison covalente C-Si stable. Les groupements de type triéthoxysilylane (R₁=R₂=R₃=OEt) ont été plus particulièrement étudiés au cours de ce travail de thèse car ils peuvent être isolés sous forme alcoxysilane puis subir des réactions d'hydrolyse et de condensation conduisant à la formation d'un réseau inorganique tridimensionnel par procédé sol-gel.

Pour synthétiser les peptides hybrides, nous avons d'abord synthétisé les peptides sur support solide puis introduit la fonction silane en déprotégeant sélectivement une des chaînes latérales du peptide.

La synthèse peptidique sur support solide est détaillée dans les paragraphes ci-dessous.

3.2. La synthèse peptidique sur support solide (SPPS)

La synthèse des peptides a été effectuée par la synthèse peptidique sur support solide (SPPS) dont le principe est représenté sur la Figure 43. Mise au point par Robert Bruce Merrifield en 1963,¹⁶⁴ cette méthode est devenue la méthode de référence pour la synthèse de peptides et de protéines en laboratoire.

Elle consiste en la répétition de cycles de synthèse qui comprennent (i) la formation d'une liaison amide entre l'amine N-terminale d'un peptide en croissance et l'acide C-terminal d'un aminoacide protégé et (ii) la déprotection de l'amine N-terminal après la réaction de couplage peptidique. La répétition de n cycles conduit à la formation d'un peptide. Le premier aminoacide est ancré dans à une matrice de polymère insoluble par sa fonction acide C-terminale. Lorsque le peptide est terminé, une réaction de clivage libère le peptide du support solide. Suivant la nature des protections utilisées, différents types de support solide et de stratégies ont été définies.

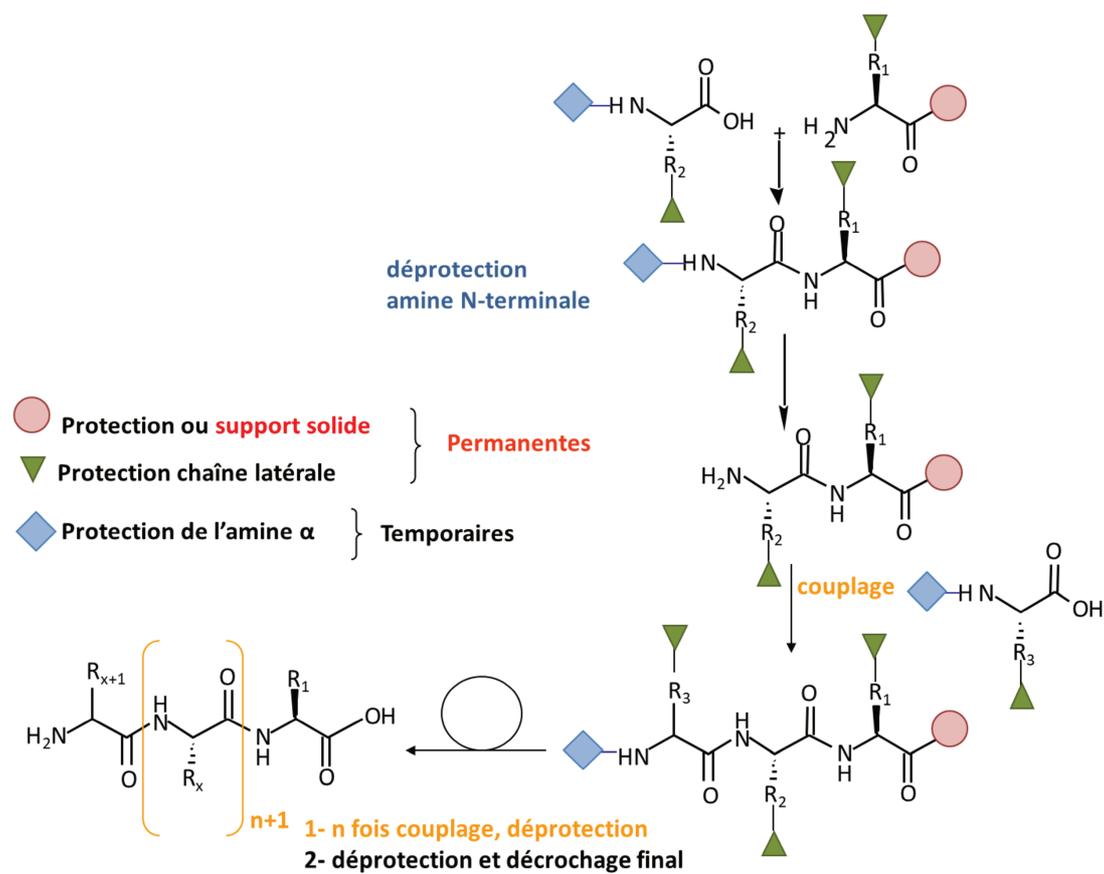


Figure 43. Principe de la SPPS.

3.2.1. Généralités sur les stratégies en SPPS, choix de la stratégie Fmoc/tBu

Les deux principales stratégies pour le SPPS sont Fmoc/tBu ou Boc/Bzl.

Cette notation x/y fait référence à la nature du groupement protecteur de l'amine alpha des aminoacides qui vont être activés lors du cycle (ici, x = groupement uréthane de type Fmoc fluorénylméthoxycarbonyl ou Boc tert-butoxycarbonyl), puis du groupement protecteur qui bloque les fonctions des chaînes latérales (ici y = tBu ou Bzl).

« x » est appelé une protection temporaire car elle est enlevée à la fin de chaque cycle de synthèse peptidique et « y » est appelé protection permanente car elle est enlevée à la fin de la synthèse en même temps que le peptide est libéré du linker placé du côté C-terminal.

Le linker correspond à la position où le premier aminoacide est ancré, la plupart du temps par sa fonction acide carboxylique en position C-ter. Le choix du linker va dépendre (i) de la fonction C-ter du peptide après clivage, par exemple, amide ou acide carboxylique et de (ii) l'élimination des groupements des chaînes latérales après clivage.

Dans la stratégie Boc/Bzl, un traitement à l'acide trifluoroacétique (TFA) est nécessaire après chaque étape de couplage pour éliminer le groupement protecteur temporaire de la fonction

amine Boc. Au contraire, les protections des chaînes latérales (de type Bzl) ainsi que le linker du support solide sont résistants au TFA mais peuvent être clivés par un traitement à l'acide fort comme l'acide fluorhydrique anhydre.

Dans ce travail de thèse, nous avons choisi la stratégie Fmoc/tBu qui nécessite à chaque étape l'utilisation d'une solution d'amine secondaire (par exemple la pipéridine dans le N, N-diméthylformamide (DMF) pour éliminer le groupe protecteur Fmoc.

Normalement, le clivage des linkers et l'élimination des groupes protecteurs des chaînes latérales sont effectués simultanément par un traitement au TFA. On parle alors « d'orthogonalité » des protections Fmoc et tBu car on peut ôter l'une sans déprotéger l'autre et vice versa.

Le schéma général de cette stratégie est représenté sur la Figure 44 avec l'exemple de la préparation de peptides C-terminaux amidés, immobilisés sur le linker Rink amide.

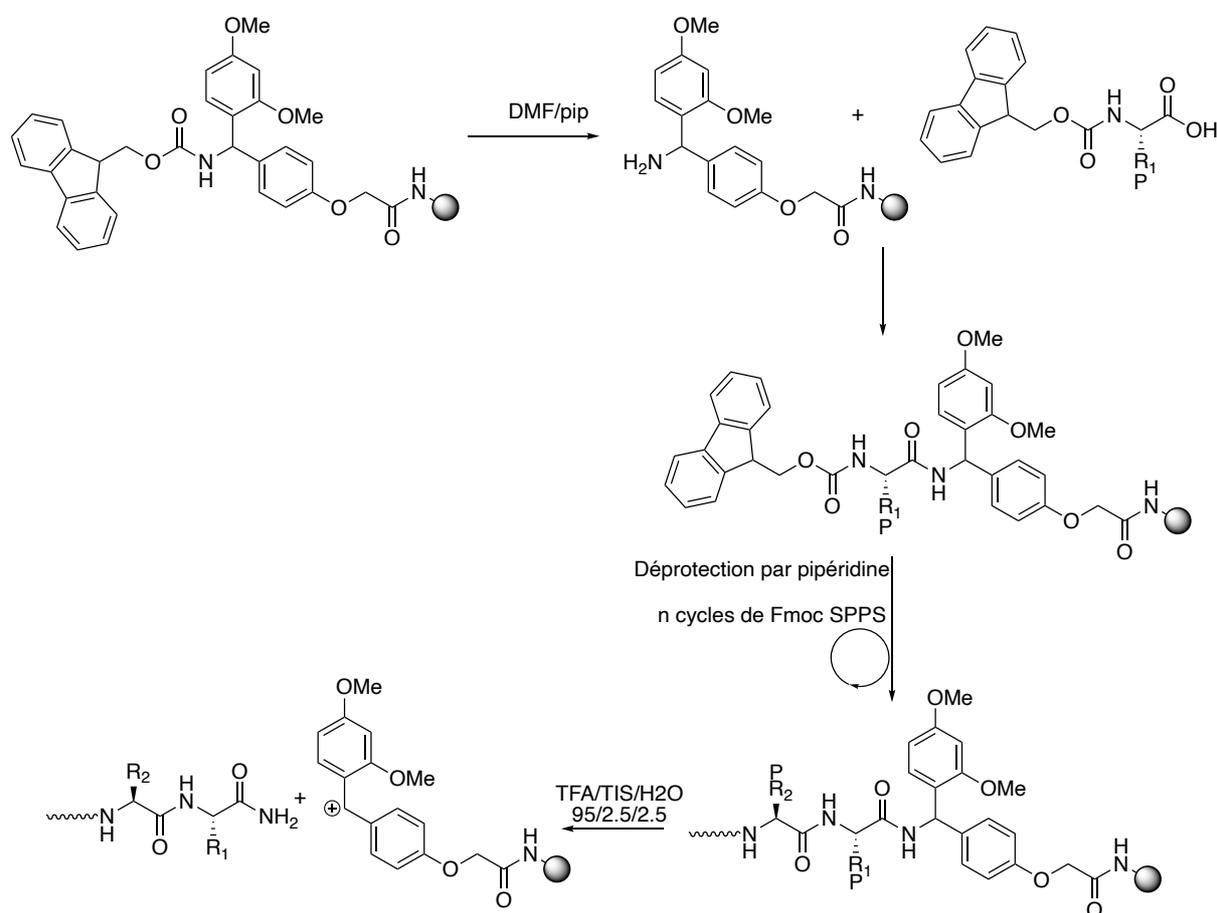


Figure 44. Principe général de la SPPS par stratégie Fmoc/tBu pour la préparation de peptide C-terminaux amidés sur une résine portant un linker Rink Amide. 'P' représente des protection permanentes, acidolabiles.

Par ailleurs, il est possible d'obtenir une orthogonalité chimique supplémentaire utile pour fonctionnaliser le peptide avant son clivage final du support grâce à des groupes protecteurs

de chaînes latérales insensibles au TFA ou à la pipéridine (comme le groupe Alloc qui se déprotège par réduction en présence de Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) et de phénylsilane (PhSiH_3)).

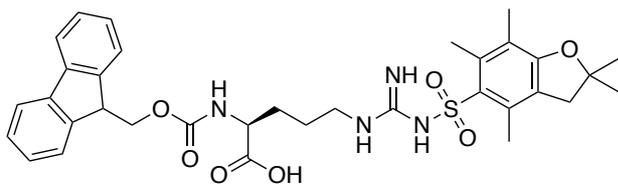
3.2.2. *N-Fmoc Aminoacides utilisés dans cette thèse*

Comme nous l'avons vu, les aminoacides possédant des chaînes latérales réactives requièrent des groupes protecteurs dits « permanents » (notés « P » sur la Figure 44) qui doivent rester en place durant toute la synthèse afin d'éviter les réactions secondaires.

Les N-Fmoc aminoacides utilisés durant cette thèse sont regroupés dans la Figure 45. Ils portent des protections acido-labiles classiques, à savoir : le Pbf (2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl) pour protéger la chaîne latérale guanidine de l'arginine sous forme d'une sulfo guanidine (i.e. Fmoc-Arg(Pbf)-OH), le tBu (tert-butyle) pour protéger la chaîne latérale de la sérine sous forme d'ether terbutylique (i.e. Fmoc-Ser(tBu)-OH) et le Boc pour protéger l'amine primaire de la chaîne latérale de la lysine sous forme uréthane (i.e. Fmoc-Lys(Boc)-OH). Tous ces groupes protecteurs sont déprotégés par un traitement au TFA.

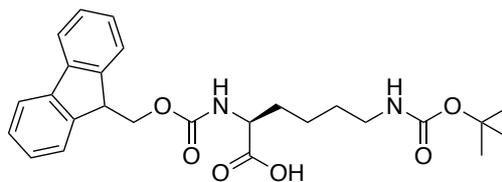
Un autre type d'acide aminé de type Lysine a été utilisé dans ce travail. Il s'agit de la Fmoc-Lys(Alloc)-OH (Alloc : allyloxycarbonyl). Le groupement Alloc est orthogonal au Boc et au Fmoc et peut être enlevé sélectivement par réduction à l'aide du $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$. Son utilisation lors de la synthèse de peptides hybrides est expliquée dans le paragraphe 3.2.4. Cycles de synthèse peptidique : déprotection et couplage en stratégie SPPS.

Fmoc-Arg(Pbf)-OH



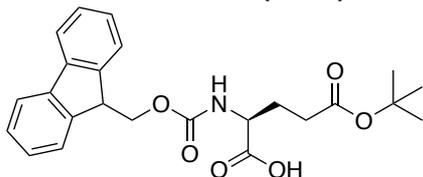
Molecular Weight: 648,78 g.mol⁻¹

Fmoc-Lys(Boc)-OH



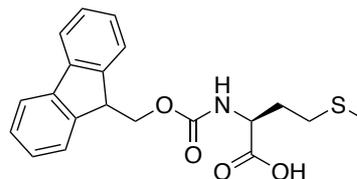
Molecular Weight: 468,55 g.mol⁻¹

Fmoc-Glu(OtBu)-OH



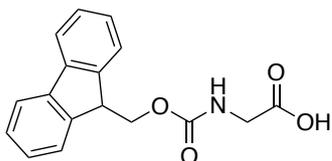
Molecular Weight: 425,48 g.mol⁻¹

Fmoc-Met-OH



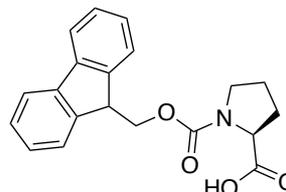
Molecular Weight: 371,45 g.mol⁻¹

Fmoc-Gly-OH



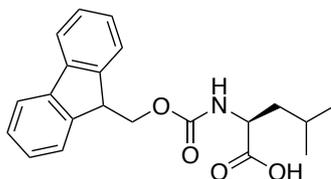
Molecular Weight: 297,31 g.mol⁻¹

Fmoc-Pro-OH



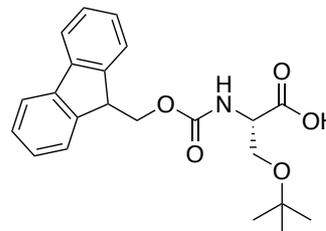
Molecular Weight: 337,38 g.mol⁻¹

Fmoc-Leu-OH



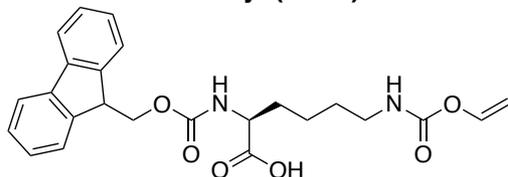
Molecular Weight: 353,42 g.mol⁻¹

Fmoc-Ser(tBu)-OH



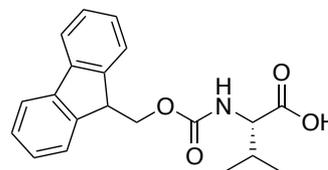
Molecular Weight: 383,44 g.mol⁻¹

Fmoc-Lys(Alloc)-OH



Molecular Weight: 436,51 g.mol⁻¹

Fmoc-Val-OH



Molecular Weight: 339,39 g.mol⁻¹

Figure 45. Liste des aminoacides utilisés durant ce travail de thèse.

3.2.3. Résine / Linker

Le choix de la matrice des billes de résine pour la méthode SPPS se fait principalement en fonction de la taille du peptide. Pour les peptides les plus longs dont la séquence contient plus de 15 acides aminés, une résine à base de PEG (polyéthylène glycol) est préférée à la matrice PS (polystyrène), la plus classique. LE PEG gonfle très bien dans les solvants organiques utilisés en synthèse peptidique (i.e. DMF) ce qui facilite l'accessibilité des réactifs. Plus important et contrairement au PS, le PEG peut établir des liaisons hydrogène avec la chaîne peptidique en croissance, ce qui limite les phénomènes d'agrégations des peptides ancrés. L'agrégation correspond à l'établissement d'un réseau de liaisons hydrogènes inter-chaînes peptidiques qui conduit à des repliements sous forme de feuillets bêta, une mauvaise accessibilité de l'amine N-terminale et à des couplages incomplets. L'agrégation est donc responsable de l'apparition de peptides tronqués ou de délétion (une ou plusieurs aminoacides manquants dans la séquence) qui diminuent la pureté du peptide après clivage de la résine.

Dans cette thèse, nous avons utilisé un seul type de matrice, l'Amphisphere, qui est un copolymère de PEG/PS.

En stratégie Fmoc/tBu, les linkers utilisés se clivent en présence de TFA de façon concomitante aux protections des chaînes latérales. Afin d'obtenir des peptides dont le côté C-terminal est sous forme acide carboxylique, on utilise le linker trityl.

Dans ce travail de thèse, le linker Rink amide a été choisi pour obtenir après clivage un peptide avec une fonction amide en position C-ter. Le linker Rink amide est installé sur la matrice polymère de la bille de résine, sous forme protégée par un groupement protecteur Fmoc. Après déprotection du Fmoc en présence de pipéridine dans le DMF, l'ancrage du premier aminoacide sur l'amine primaire du linker Rink amide, s'effectue par un couplage classique (Figure 46).

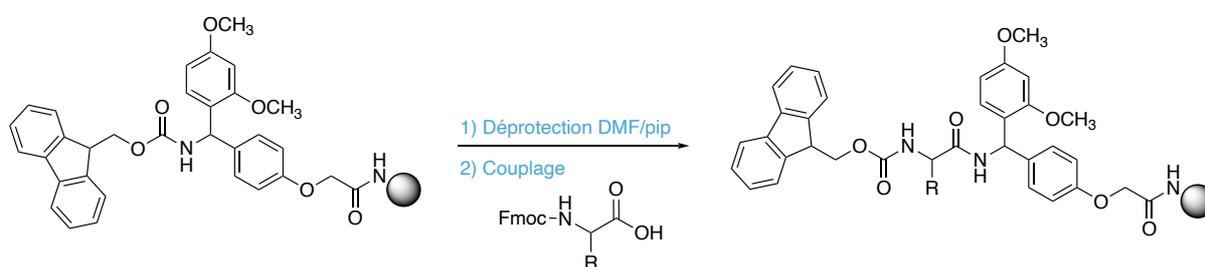


Figure 46. Ancrage du premier aminoacide C-terminal sur un support solide fonctionnel avec le linker Fmoc-Rink Amide.

3.2.4. Cycles de synthèse peptidique : déprotection et couplage en stratégie SPPS

Comme nous l'avons vu, un cycle de synthèse peptidique correspond à l'ajout d'un aminoacide du côté N-terminal d'un peptide en élongation. Il se compose de deux étapes : (i) la déprotection du groupement protecteur de l'amine de l'acide aminé qui se trouve du côté de la résine (C-terminal), puis (ii) du couplage de l'acide aminé suivant.

I. Déprotection

Le Fmoc est déprotégé par l'action d'une amine secondaire qui peut arracher le proton en alpha du cycle fluorenyl, conduisant à la formation du dibenzofulvène (DBF) et d'un acide carbamique, représenté dans la Figure 47 ci-dessous. Ce dernier se décarboxyle spontanément. Le DBF relargué est éliminé par filtration de la résine et peut même être dosé par UV pour contrôler la quantité d'acide aminé prêt à réagir sur la résine. Certains robots de synthèse réalisent cette mesure automatiquement.

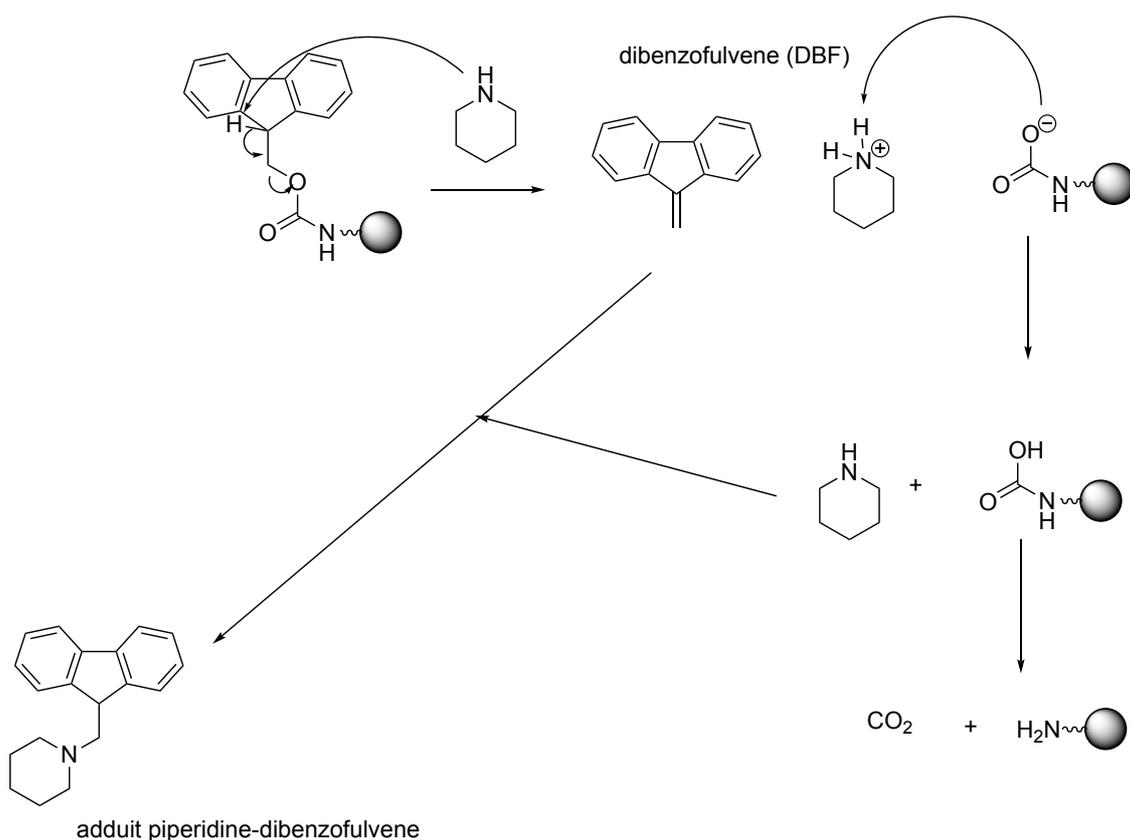


Figure 47. Déprotection du groupement Fmoc.

Les groupements Fmoc ont été déprotégés par deux traitements DMF/pipéridine successifs (80/20 ; v/v) de 10 minutes.

II. Couplage

Afin de former une liaison peptidique (amide) entre un acide carboxylique et une amine, il est nécessaire d'activer la fonction acide.

Cela consiste en la formation, à partir de l'acide carboxylique, d'un ester actif COOX avec X un groupe électroattracteur qui rend le carbonyle électropositif et permet au doublet de l'amine de l'attaquer. X est aussi un bon groupe partant, représenté sur la Figure 48. La formation de l'ester actif passe par la formation du carboxylate de l'acide ce qui nécessite l'usage d'une base lorsque l'on utilise un agent de couplage.

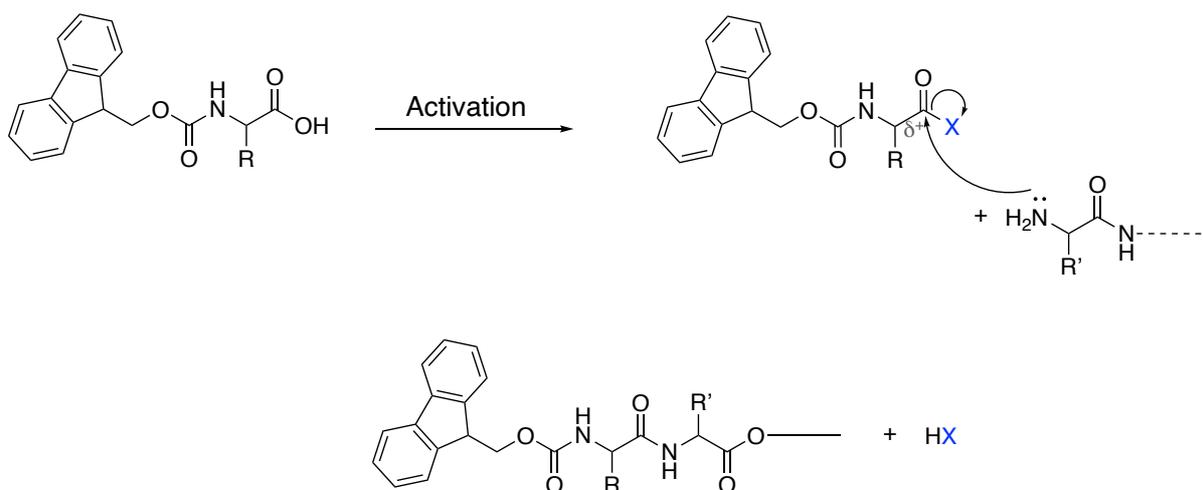


Figure 48. Activation et couplage peptidique.

Au cours de cette thèse, les peptides ont été généralement synthétisés à une échelle de 0,25 mmol, quantité théorique de linker présent sur la résine. Le DMF a été utilisé comme solvant de couplage. L'agent de couplage utilisé lors de la SPPS est l'O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU), un puissant activateur des acides carboxyliques. Le mécanisme de couplage de l'acide via l'activation de HATU est détaillé sur la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

L'HATU a été utilisé en quantité équimolaire par rapport à l'acide protégé (Fmoc-AA-OH) et à 5 eq par rapport à l'amine libre présente sur la résine. Il convient de noter que l'HATU ne doit jamais être utilisé en excès par rapport à l'acide à activer. En effet, l'excès pourrait entraîner une réaction de guanilylation indésirable de l'amine N-ter libre.

La réaction d'activation par HATU procède à partir du carboxylate de l'acide à activer et nécessite donc l'usage d'une base non nucléophile (pour que la base ne réagisse pas avec l'acide activé lui-même). Une amine tertiaire, soluble dans les solvants organiques est utilisée. La base organique permet à la fois de former le carboxylate à partir de l'acide (réaction acide/base) mais également de garder l'amine sous forme non protonée, disposant ainsi de son doublet électronique libre pour attaquer le carbonyl électropositif.

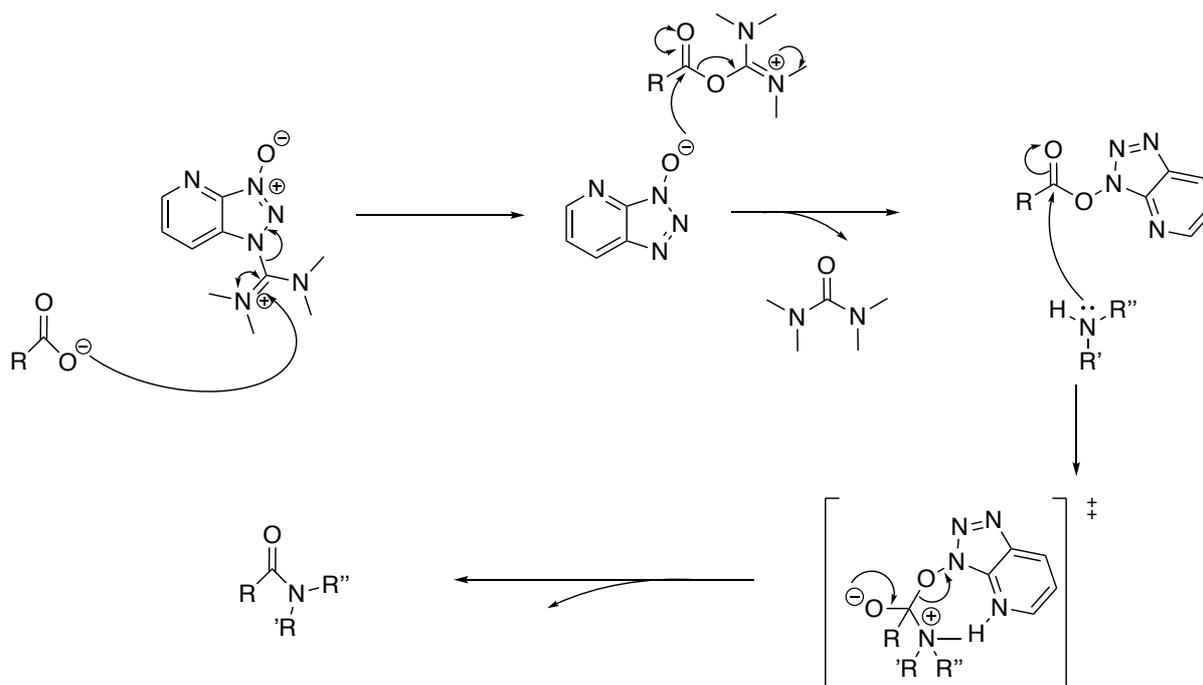


Figure 49. Mécanisme de couplage de l'amide par l'activation de l'HATU.

De même, nous avons systématiquement réalisé des doubles couplages ; c'est-à-dire que la réaction de couplage a été conduite durant deux fois 5 minutes avec une vidange du réacteur de support solide contenant la résine entre les deux.

Toutes les étapes de couplage ont été réalisées à pH basique (environ 10) afin de former l'ion carboxylate et garder l'amine non protonée. Pour cela, la base de Hünig, l'amine tertiaire N,N-diisopropyléthylamine (DIEA) soluble dans le DMF a été utilisée sur l'acide aminé protégé à 10 eq. A l'issue du couplage, la résine est ensuite rincée deux fois avec du DMF.

3.2.5. Déprotection sélective du groupement Allyloxycarbonyl (Alloc) et introduction sélective de groupes fonctionnels (métallocène ou fluorescéine)

En milieu de séquence, l'acide aminé Fmoc-Lys(Alloc)-OH a été couplé. Cela va permettre de pouvoir rajouter sur la chaîne latérale de la lysine un groupement métallocène ou un groupement fluorescent. Le couplage se fait classiquement par SPPS, puis l'Alloc est déprotégé dans des conditions neutres avec 0.25 eq de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ en présence de 24 eq de PhSiH_3 dans du DCM durant deux fois 30 minutes. Le PhSiH_3 permet de fixer le système allylique, ceci induisant une orthogonalité avec les groupements protecteurs les plus courants.

Ensuite pour coupler le métallocène, le ferrocène carboxylique acide celui-ci est ajouté à 1.25 eq dans une solution de 1 eq de HATU et de 3 eq de DIEA dans du DMF pendant 2h.

Pour coupler le fluorochrome, 1 eq d'isocyanate de fluorescéine (FITC) a été utilisé en présence de 10 eq de DIEA dans du DMF et mis en présence de la résine possédant une amine libre durant 2h.

Les schémas de déprotection de l'alloc et de couplage du métallocène ou du fluorochrome sont représentés sur la Figure 50 ci-dessous.

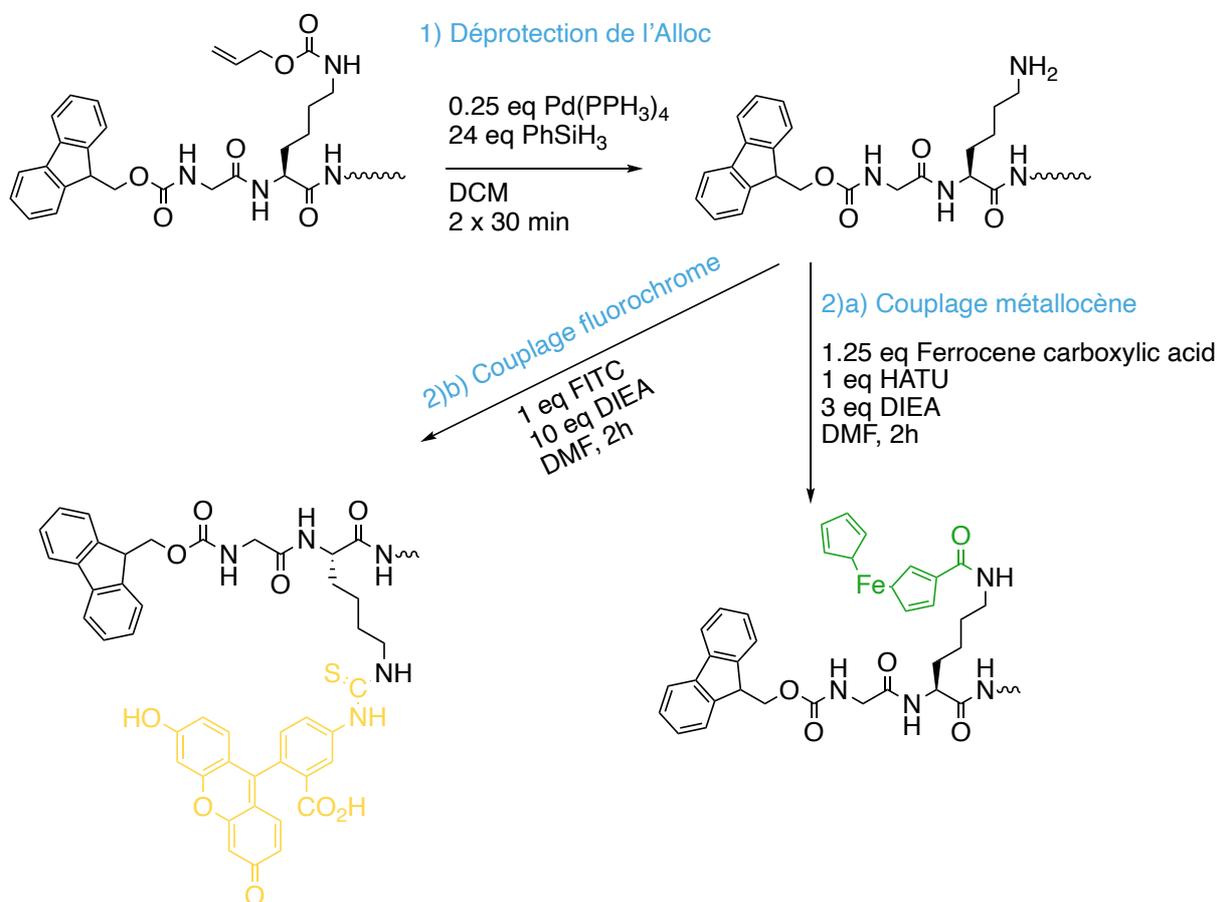


Figure 50. Déprotection de l'Alloc et couplage du groupement métallocène ou du groupement fluorescent.

Puis les étapes de déprotection et de couplage s'enchaînent jusqu'à obtenir le peptide attendu et la résine est rincée deux fois avec du DCM.

3.2.6. Clivage

Le clivage du peptide permet de détacher le peptide du linker. Les groupes protecteurs des chaînes latérales sont également retirés à ce stade. Le clivage du peptide est réalisé durant 45 minutes à 38°C avec un mélange de TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v). Le triisopropylsilane (TIS) et l'eau sont utilisés comme piègeurs de carbocations afin d'éviter les réactions secondaires lors de la déprotection du peptide en réagissant avec les carbocations créés lors de la déprotection des chaînes latérales pouvant être alkylées (en particulier sur les noyaux aromatiques riches en électrons de Tyr et Trp et sur l'atome de soufre de Met et Cys).

La résine clivée est éliminée par filtration et le peptide désiré déprotégé est obtenu en solution dans le TFA. Après concentration du TFA sous vide, le peptide est précipité dans l'éther diéthylique (Et₂O) et lavé deux fois avec le même solvant.

3.3. Purification

Le peptide est purifié par RP-HPLC (Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography) sur une HPLC Gilson 2250 équipée d'une colonne C18 phase inverse. Les conditions standards sont les suivantes : système éluant A (0,1% de TFA dans H₂O) et système B (0,1% dans acétonitrile). Un débit de 50 mL/min et un gradient de (0-100) % B avec des temps adaptés ont été utilisés, à une longueur d'onde de détection de 214 nm. Après analyse, les fractions correspondant au peptide attendu sont regroupées, analysées par LC/MS et lyophilisées.

3.4. Silylation

3.4.1. Généralités

La silylation consiste en l'introduction d'un groupement silane sur le peptide.

Deux types de silylation ont été réalisées : introduction d'un groupe triméthylsilyle ou d'un groupe triéthoxysilyle. Le groupe triéthoxysilyle permet d'obtenir des peptides hybrides pouvant réagir par sol gel par hydrolyse et condensation. Au contraire, les peptides hybrides possédant un groupe triméthylsilyle ne peuvent pas condenser et sont destinés à servir de contrôles en solution afin d'étudier les différents sites de coupure de l'enzyme (MMP-13 ou élastase).

La silylation est réalisée après la synthèse du peptide, sur le peptide purifié. En effet, le groupement silane est fragile et s'hydrolyse et se condense facilement en présence d'eau. La purification HPLC dans des conditions conventionnelles eau/acétonitrile est donc exclue.

Le réactif silylé que nous avons choisi dans ce travail de thèse pour introduire le groupe silane est un isocyanate. Ce choix a été dicté par différentes raisons.

Tout d'abord, les dérivés silylés d'isocyanates sont des réactifs disponibles dans le commerce. Par exemple, le 3-(Triéthoxysilyl)propyl isocyanate (ICPTES) provient d'Alfa Aeser et le isocyanato propyl triméthylsilane (ICPTMeS) de SIKÉMIA.

Ensuite, l'isocyanate est très réactif vis-à-vis des nucléophiles. La réaction rapide entre un isocyanate et une amine libre limite les risques d'hydrolyse prématurée des groupes alcoxysilanes qui pourraient entraîner une condensation indésirable. Aucun agent de couplage n'est nécessaire, seule une base (DIEA) est ajoutée pour déprotomer les éventuels ammoniums et former des amines nucléophiles prêtes à attaquer la fonction isocyanate. La réaction d'un isocyanate avec une amine primaire ou secondaire résulte en une liaison urée entre le linker qui présente l'atome de silicium et le peptide.

3.4.2. Synthèse de peptides hybrides

Les peptides hybrides mono silylés ont été préparés en faisant réagir l'amine N-terminale des avec un isocyanate silylé : ICPTES pour les peptides hybrides polymérisables et l'ICPTMeS pour les peptides modèles non polymérisables (Figure 51A). Pour obtenir des peptides bis-silylés, une lysine a été introduite du côté C-terminal, en début de synthèse. Ces peptides possèdent donc deux amines réactives, l'amine primaire en N-ter et la chaîne latérale de la Lysine C-terminale. Ces deux amines réagissent avec les deux types d'isocyanates (ICPTES et ICPTMeS) de la même façon pour donner des peptides hybrides bis-silylés (Figure 51B).

Il convient de noter que les séquences de peptides choisies ne présentant aucun autre groupe amino que celui/ceux destiné(s) à réagir avec l'isocyanate, ils ont donc été fonctionnalisés après clivage et purification dans leur forme totalement déprotégée.

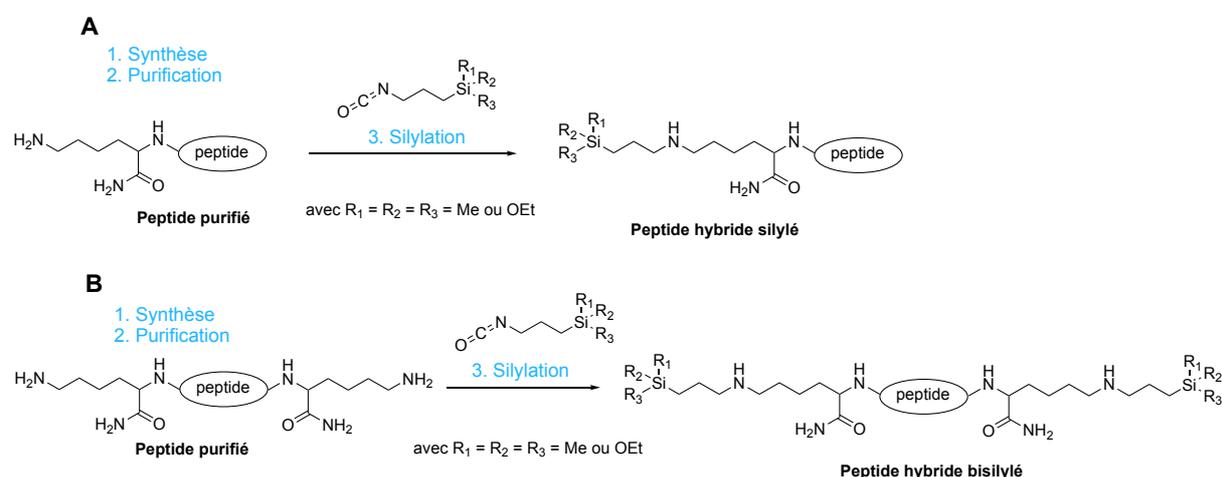


Figure 51. Synthèse de peptide hybride hydrolysable. En A, le peptide monosilylé. En B, le peptide bis-silylé.

Les peptides hybrides triéthoxysilane sont les précurseurs des biomatériaux greffés sur le substrat capteur.

Les peptides hybrides triméthylsilane sont des composés utilisés lors des contrôles réalisés en solution afin d'étudier les différents sites de coupure de l'enzyme (MMP-13 ou HNE).

3.4.3. Analyses des peptides hybrides

La silylation des peptides hybrides a pu être contrôlée par LC/MS (Liquid Chromatography / Mass Spectrometry). Le système LC/MS est constitué d'un système HPLC Waters Alliance 2695, couplé à un spectromètre ZQ Waters-Micromass (Manchester, UK) (mode d'ionisation électrospray, ESI⁺) qui est analyseur de masse quadripolaire permettant de déterminer le rapport masse/charge (m/z) de divers analytes. Le principe de fonctionnement de la LC/MS est schématisé sur la Figure 52.

Les échantillons pour les analyses LC/MS sont préparés dans un mélange eau/acétonitrile (50/50 v/v), contenant 0.1% de TFA. L'analyse est effectuée juste après la préparation des échantillons qui s'hydrolysent très rapidement, y compris pendant l'analyse LC/MS. L'identification a été effectuée à l'aide d'une colonne à phase inversée Chromolith Speed rod C18, 25 × 4,6 mm de chez Merck. Un débit de 3 mL/min et un gradient de (0-100) % B sur 2,5 minutes ont été utilisés. L'éluant A correspond à de l'eau avec 0.1 % d'acide formique ; et l'éluant B correspond à l'acétonitrile avec 0.1 % d'acide formique. La détection par UV a été réalisée à 214 nm. Les temps de rétention sont toujours indiqués en minutes. Les spectres de masse d'électrospray à ions positifs ont été acquis à un débit de solvant de 200 µL/min. L'azote a été utilisé comme gaz de nébulisation et de séchage. Les données ont été obtenues dans un mode de balayage allant de 200 à 1600 m/z par intervalles de 0.1 seconde. 10 scans ont été additionnés pour obtenir le spectre final.

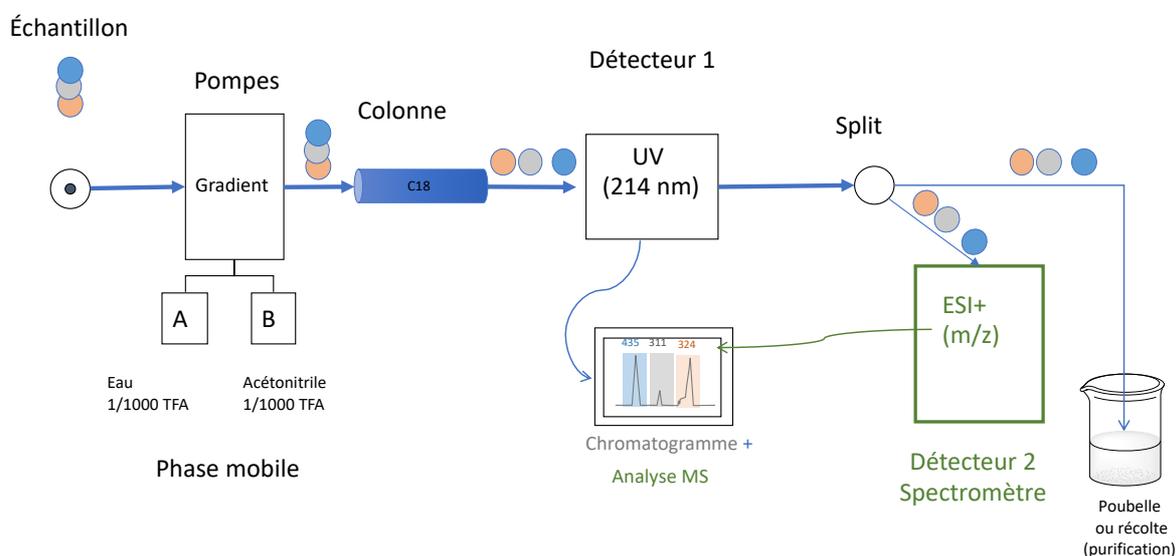


Figure 52. Schématisation du principe d'analyse LC/MS.

Lors des analyses LC/MS les éthoxysilanes sont hydrolysés plus lentement, mais ils sont à peine observés, sauf s'ils sont injectés très rapidement après leur dissolution et sur des gradients très courts, inférieurs à 3 minutes. La plupart du temps sur l'analyse LC/MS on ne va observer que les fonctions silanols. En spectrométrie de masse, nous pouvons nous attendre à détecter

la valeur m/z du silanol protoné ou cationisé, avec la forte présence d'un ion de silicium provenant de la perte d'une molécule d'eau de l'espèce protonée.

L'analyse LC/MS du peptide hybride bis-silylé avec le groupement ferrocène, correspondant au peptide hybride 4 (Tableau 8) est représentée sur la Figure 53 ci-dessous.

Sur le chromatogramme, le peptide sort à un temps de rétention (t_R) de 1.18 minutes.

Les formes di, tri et quadri chargées du peptide sont affichées, avec $[M+2H]^{2+}$ m/z 1075.8, $[M+3H]^{3+}$ m/z 705.7, $[M+4H]^{4+}$ m/z 533.7, respectivement.

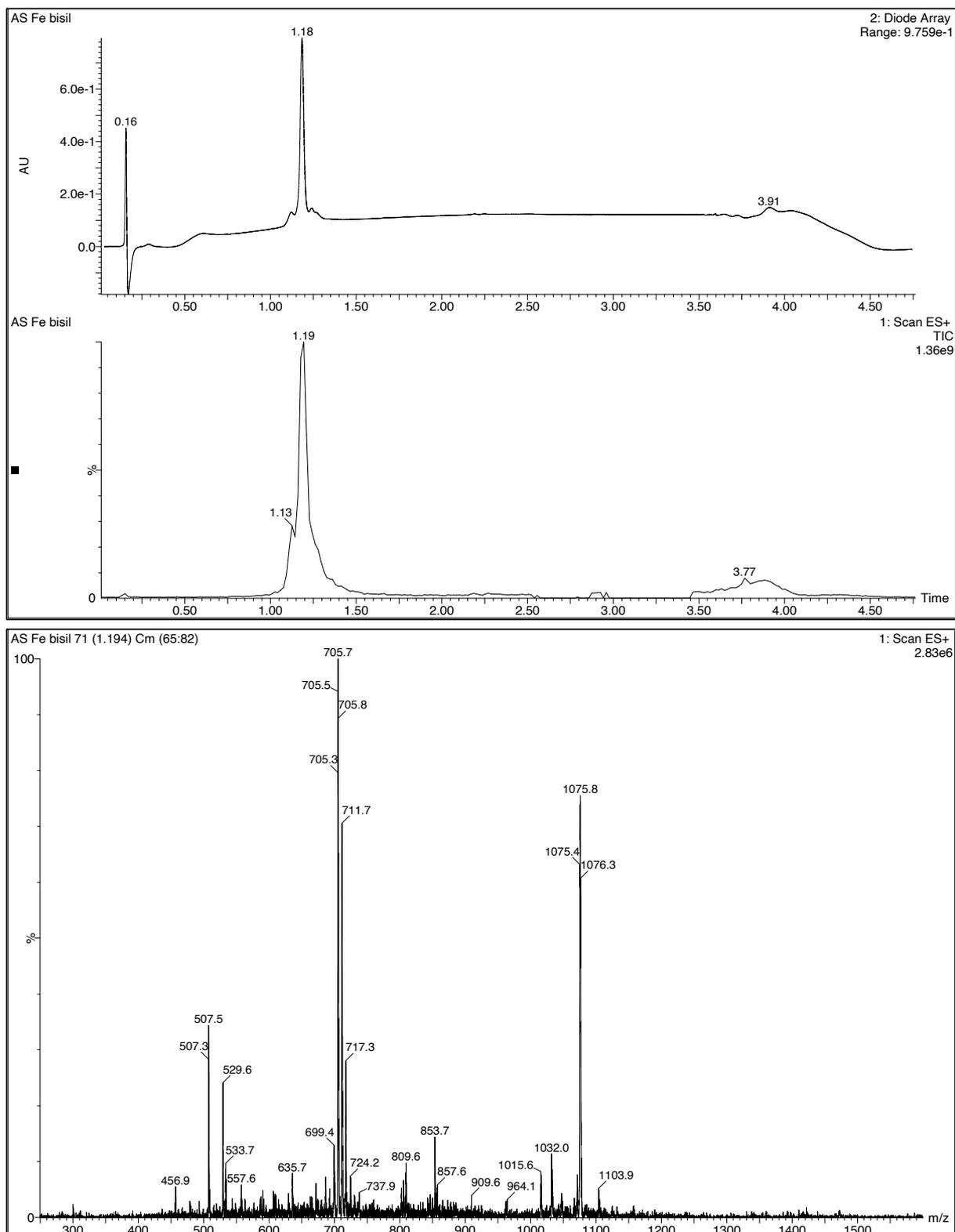


Figure 53. LC/MS peptide hybide 4 bis-silylé. LC/MS (ESI+) of peptide 2. MW = 2149.45 g/mol.
LC/MS (ESI+) : $t_R = 1.87$ min, $[M+2H]^{2+}$ m/z 1075.8, $[M+3H]^{3+}$ m/z 705.7, $[M+4H]^{4+}$ m/z 533.7.

Partie 4. Étude de la dégradation des peptides hybrides silylés en solution par une activité enzymatique : la MMP-13

Une fois les peptides choisis, nous avons vérifié que les enzymes étaient capables de reconnaître les séquences et de les cliver. Nous avons d'abord réalisé cette étude en solution, en utilisant des peptides hybrides triméthylsilylés ne pouvant pas former de matériau car ils ne peuvent pas se condenser. Les peptides hybrides silylés choisis pour la MMP-13 sont les peptides 5 et 8 (Tableau 8) correspondant respectivement aux peptides hybrides silylés en configuration (L) et (D). Ceux choisis pour la HNE sont les peptides hybrides silylés 13 et 14 (Tableau 8) correspondant respectivement aux peptides hybrides silylés en configuration (L) et (D). Les peptides en configuration (D) vont correspondre aux contrôles négatifs, l'enzyme ne devrait pas cliver la séquence du peptide. Nous avons utilisé des enzymes isolées commercialement disponibles.

4.1. Activation de la pro MMP-13

La métalloprotéase matricielle 13 est commercialisée (R&D systems) sous sa forme inactive (rhMMP-13) où son site actif est bloqué par son domaine pro-peptidique. L'APMA, (Sigma Aldrich, CAS 6283-24-5) est un composé connu pour rompre la liaison entre le pro-peptide et le zinc située dans le domaine actif dont le fonctionnement a été décrit dans la partie 2.1.1. La métalloprotéase matricielle 13 : MMP-13. Un certain nombre de clivages autolytiques se produisent après le déblocage du site actif dépendant du zinc sans affecter l'activité de la protéase.

Pour activer la MMP-13, 10 µg de rhMMP-13 purifiée (masse molaire prédite de 55 kDa) ont été dilués dans un tampon biologique de type TCNB (50 mM Tris (trisaminométhane), 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 0.05% Brij-35 (polyoxyéthylène glycol dodécyl éther) (w/v) à pH 7.5) à une concentration finale de 10 µM. Ce tampon est noté T dans la suite de ce manuscrit.

A cette solution a été ajouté 10 mM d'APMA pendant 2h à 37°C sous agitation douce. Il en résulte ainsi la forme tronquée de la MMP-13.

4.2. Dosage de la MMP-13

La concentration en protéines a été déterminée par absorbance UV. Les mesures d'absorbance ont été effectuées sur le spectrophotomètre UV NanoDrop™ et analysées par le logiciel UV Probe 2.42. La concentration en protéine (Équation 5) a été calculée à partir de l'équation de Beer-Lambert suivante : $A_{280} = \varepsilon \times l \times C$

Équation 5. Équation selon la loi de Beer-Lambert.

A est l'absorbance de la solution à 280 nm, ε est le coefficient d'extinction molaire en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$, l est l'épaisseur de la cuve en cm (ici, 1 cm) et C correspond à la concentration en quantité de matière de l'espèce analysée en $mol \cdot L^{-1}$. ε (MMP-13) = 76 445 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$.

Le substrat fluorogénique choisi pour contrôler l'activité est le Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ (Mca-Mat). Il contient un groupe 7-méthoxycoumarine hautement fluorescent qui est efficacement éteint par le transfert d'énergie de résonance au groupe 2,4-dinitrophényle. Il est ainsi utilisé pour mesurer l'activité de la MMP-13 capable de cliver la liaison amide entre le groupe fluorescent et le groupe d'extinction, provoquant ainsi une augmentation de la fluorescence.

Le substrat Mca-Mat ($M = 1093 \text{ Da}$, $\epsilon = 21\,470 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) a été mis en solution dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 10 M puis dosé de la même manière que la MMP-13 au spectrophotomètre selon une plage d'absorbance de $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ à $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ afin d'en déterminer sa concentration, qui est de $28 \mu\text{M}$.

Il faut tester à présent l'activité enzymatique de la MMP-13.

4.3. Test de l'activité enzymatique de la MMP-13

Nous avons enregistré l'augmentation de la fluorescence induite par le clivage du substrat Mca-Mat à $4.5 \mu\text{M}$ en présence de 2 nM de MMP-13 dans le tampon T. Les tests ont été réalisés en triplicatas sur des plaques noires 96 puits à fond plat et à surface non liante (Greiner Bio-one, Dutscher, France) comme représenté sur la Figure 54. Les signaux de fluorescence ont été suivis à l'aide d'un spectrofluorimètre lecteur de plaques CLARIOstar™ (BMG) thermostaté à 37°C pendant 30 minutes tout en maintenant une agitation de la plaque. La titration de la fluorescence a été acquise à 405 nm après une excitation à 320 nm .



Figure 54. Design de la microplaque 96 puits pour tester l'activité enzymatique de la MMP-13.

La première colonne contient uniquement le tampon T. La deuxième colonne contient le substrat peptidique fluorogénique Mca-Mat, noté Mca, dans T. La troisième colonne, contient 2 nM de MMP-13 avec $4.5 \mu\text{M}$ de Mca dans T. Créé à partir de Biorender.com.

La Figure 55 ci-dessous correspond à l'activité de la MMP-13. Blc correspond au tampon T. Mca au substrat fluorogénique Mca-Mat. MMP correspond à l'activité enzymatique de la MMP-13. L'activité enzymatique de la MMP-13 a été mesurée et déterminée comme activité de référence en calculant la pente de la courbe : $\Delta F = 2$.

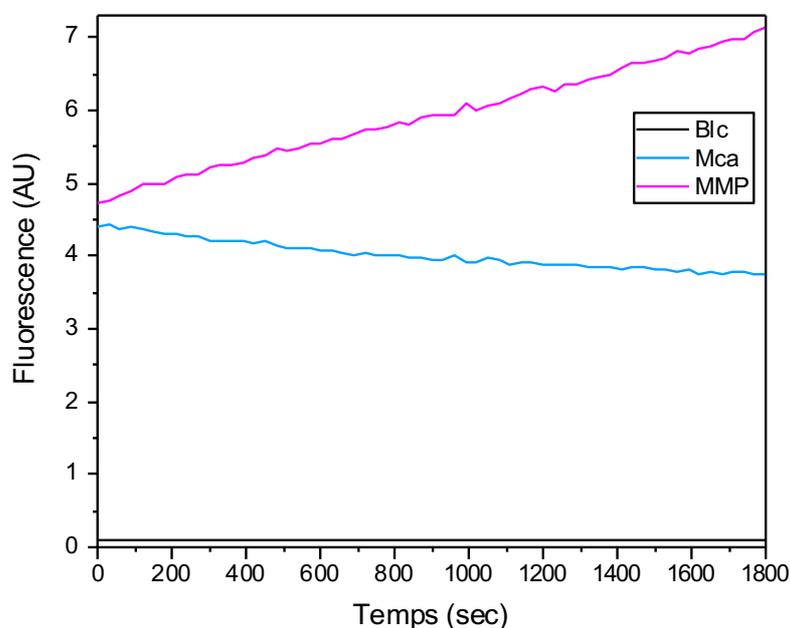


Figure 55. Activité enzymatique de la MMP-13.

A chaque fois que la MMP-13 a été utilisée, les tests d'activité enzymatique ont été reproduits, et les valeurs de chaque ΔF a été comparé à la valeur de l'activité de référence afin de vérifier la conservation de l'activité enzymatique de la MMP-13 de façon optimale.

4.4. Étude de l'activité enzymatique de la MMP-13 sur le substrat peptidique hybride en solution

4.4.1. Préparation de la solution du peptide hybride contrôle

Le peptide hybride **5** (figure 28) présente deux groupements triméthylsilyles. Il est donc incapable de former un réseau et ne peut donc pas rentrer dans un procédé sol gel d'hydrolyse d'alkoxysilane et de condensation, représenté sur la Figure 56 ci-dessous. Nous l'avons préparé à des fins de contrôle en solution pour nous assurer que la MMP-13 serait capable de reconnaître le peptide et de le cliver comme attendu.

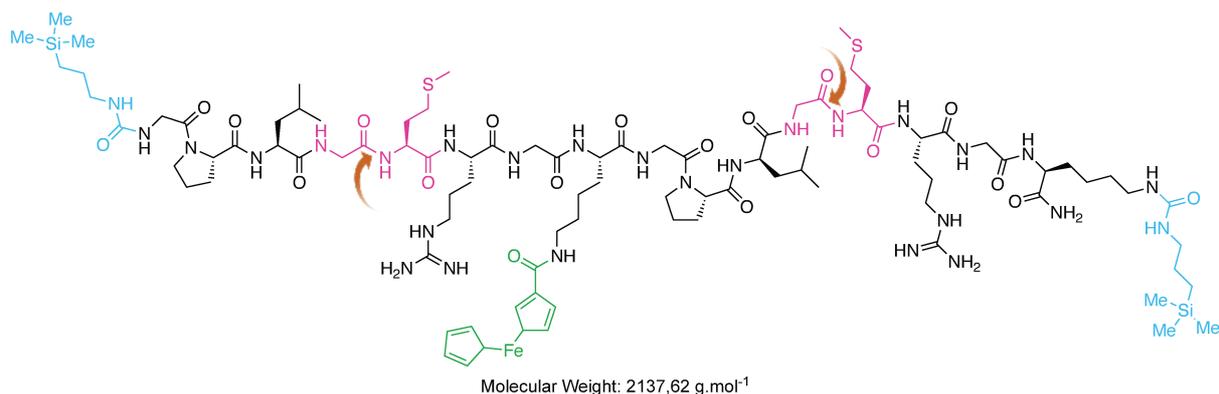


Figure 56. Peptide hybride bis-silylé n°5 (tableau 3) est représenté avec un groupement ferrocène en vert et les sites de coupures de la MMP-13 (représentée en orange + flèche) sont représentés en rose. En bleu correspondent les 2 groupements triméthylsilyles.

Le clivage enzymatique théorique du peptide hybride **5** devrait donc générer 3 fragments distincts : **5a**, **5b** et **5c** (Figure 57).

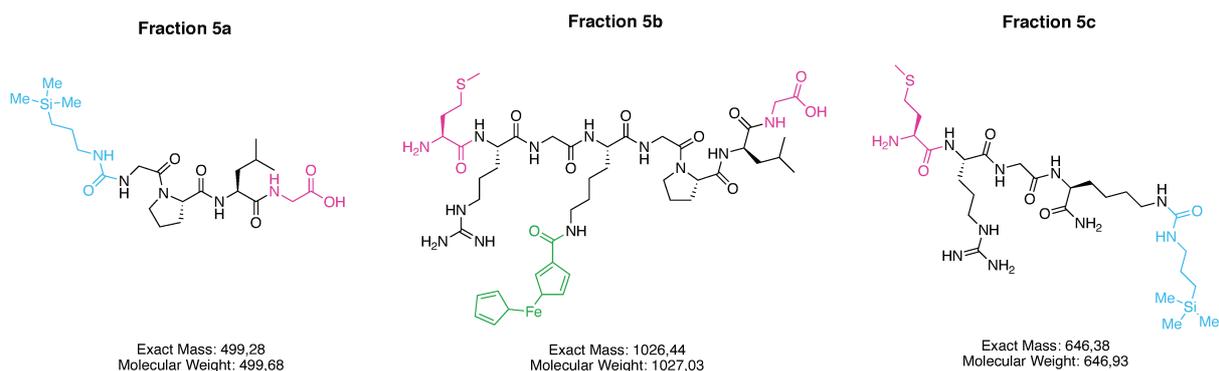


Figure 57. Fragments issus de la coupure du peptide hybride **5** obtenus après la digestion de la MMP-13 en solution : fragments **5a**, **5b** et **5c**.

Le peptide **5** a été solubilisé dans de l'eau MilliQ® dans le but de réaliser une solution mère à 10 mM. A noter ici, que sa solubilisation en solution a été très difficile en raison des deux groupements triméthylsilyles, impliquant une solubilisation pendant 1h, en alternant des bains à ultrasons, des homogénéisations par pipette puis vortex le tout pour que le peptide soit bien solubilisé.

Une fois la solution mère réalisée, une solution du peptide hybride à 1 mM a été préparée par dilution 10x dans le tampon T. La concentration millimolaire a été choisie car elle est suffisante pour détecter le peptide en LC/MS et ainsi suivre par UV sa dégradation par la MMP-13. Plusieurs échantillons ont été préparés dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL afin de réaliser des triplicatas. Les tubes ont été placés dans un Thermomixer permettant une agitation douce et une température fixée à 37°C, conditions optimales pour l'activité de la MMP-13.

4.4.2. Caractérisation du clivage enzymatique de la MMP-13 sur le peptide hybride 5 par LC/MS

Nous avons d'abord vérifié la stabilité du peptide hybride **5** en solution dans un tube Eppendorf de 1.5 mL en solution à 1 mM dans le tampon T à pH 7.5 à 37°C. La solution est placée dans le Thermomixer à 37°C et sous agitation douce. Les tests ont été réalisés en triplicatas.

La stabilité a été suivie par LC/MS pendant 24 heures. Le chromatogramme LC/MS à t=24h est présenté sur la Figure 58.

Le peptide hybride **5** (MW 2137.6 g/mol) a un temps de rétention de 1.60 minutes.

Le spectre de masse de **5** montre le peptide sous sa forme di-chargée $[M+2H]^{2+}$ m/z 1069.8, tri-chargée $[M+3H]^{3+}$ m/z 713.3, ainsi que sous la forme tétra-chargée $[M+4H]^{4+}$ m/z 535.5. Les pics aux temps de rétention 2.19, 2.46 et 2.77 minutes observables sur le chromatogramme TIC (total ion current) sont présents dans le tampon seul et sont attribuables à l'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique), un composé organique zwitterionique qui ionise beaucoup en analyse LC, mais n'influence en rien les analyses du peptide hybride **5**. Les fragments **5a**, **5b** et **5c** ont été recherchés par SIR (Single Ion Recording), un mode d'acquisition sélectif qui permet de détecter uniquement les masses recherchées. Comme attendu, les ions $[M+H]^+$ m/z 500.4, mono-chargé du fragment **5a**, $[M+H]^+$ m/z 1027.6, $[M+2H]^{2+}$ m/z 514.5, mono et di-chargés du fragment **5b**, $[M+H]^+$ m/z 647.5, $[M+2H]^{2+}$ m/z 324.3, mono et di-chargés du fragment **5c** n'ont pas été détectés après 24 heures. Nous pouvons en déduire que le peptide hybride **5** est stable en l'absence d'enzyme.

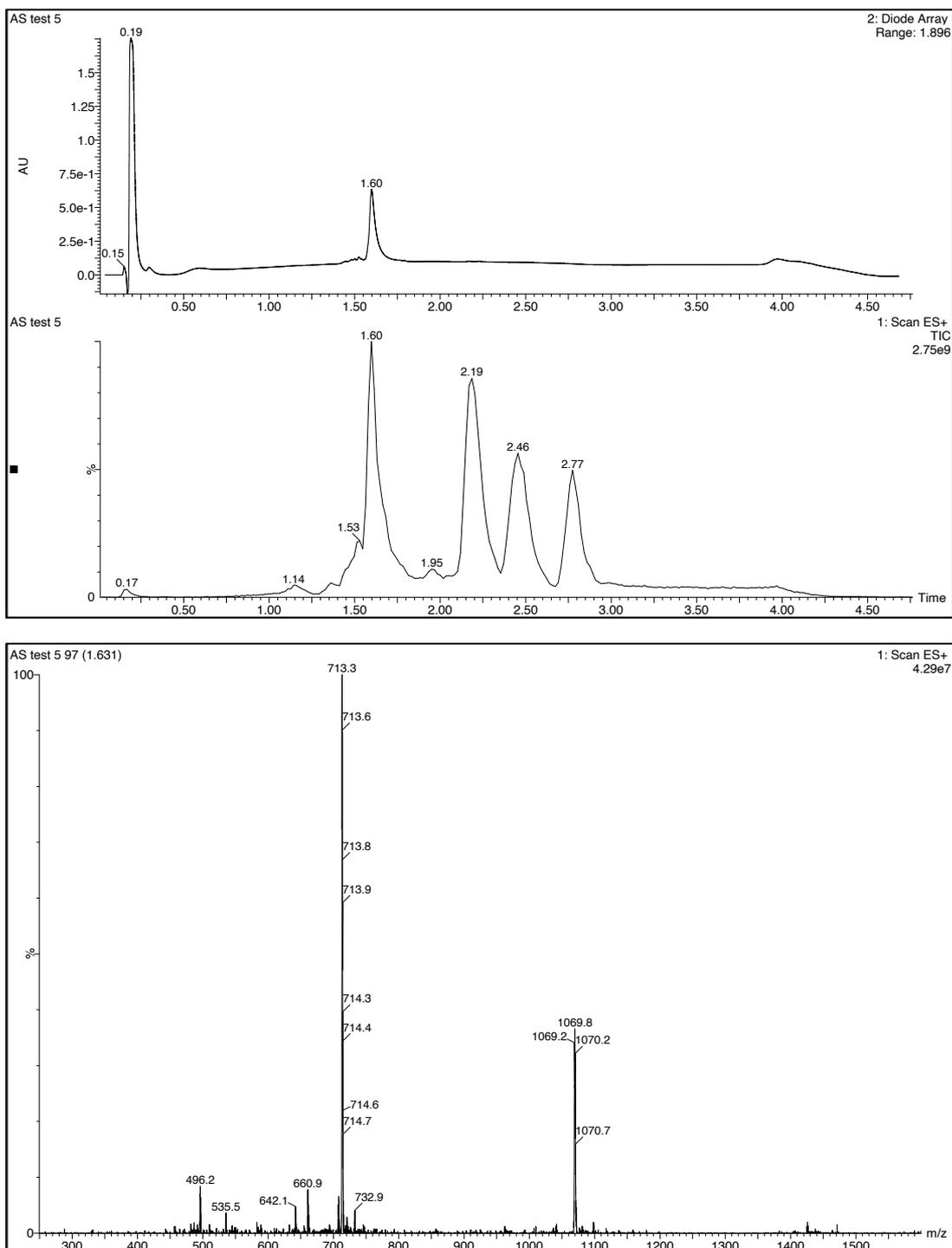


Figure 58. LC/MS du peptide hybride bis-silylé 5 en solution dans un tampon. $[m+2H]^{2+}$ m/z 1069.8, $[m+3H]^{3+}$ m/z 713.3, $[m+4H]^{4+}$ m/z 535.5. Les signaux intenses à 2.19, 2.46 et 2.77 sur le chromatogramme TIC sont dus à l'HEPES.

Le peptide hybride silylé a ensuite été mis en solution (1 mM) en présence de 4 concentrations de MMP-13 : 2 nM, 20 nM, 200 nM et 1 μ M. Ceci a été effectué dans le but de choisir la concentration d'enzyme adéquate pour cliver totalement le peptide hybride 5 en 24 heures à 37°C. Une expérience type est représentée sur la Figure 59. En clivant le peptide hybride 5, la MMP-13 devrait donner les fragments 5a, 5b et 5c.

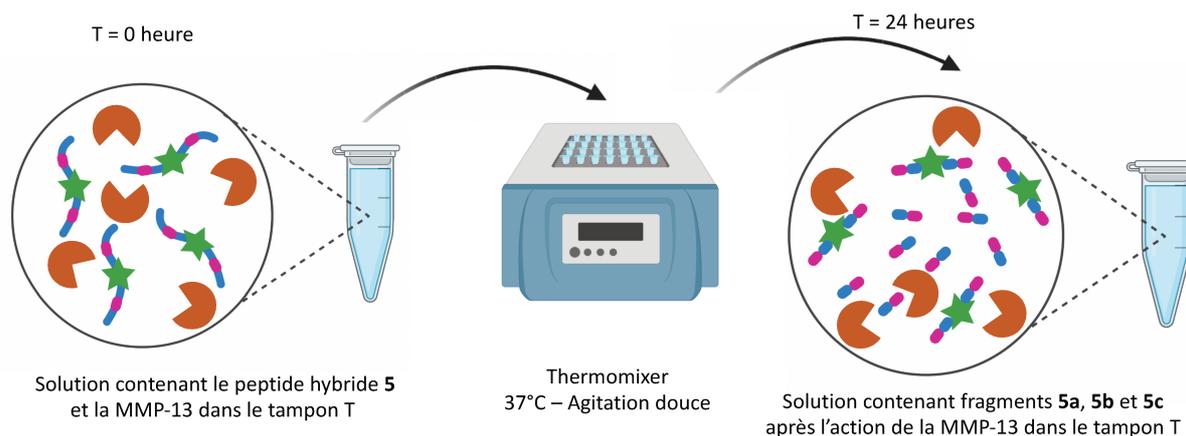


Figure 59. Étude de la dégradation du peptide hybride 5 ($C = 1 \text{ mM}$) par la MMP-13 dans le tampon T durant 24 heures. Les parties roses correspondent aux séquences clivables par la MMP-13 (forme orange). Les étoiles vertes correspondent au groupement ferrocène. Créé à partir de Biorender.com.

Les analyses LC/MS ont été effectuées au bout de 24 heures. Le chromatogramme LC/MS pour une concentration d'enzyme à $1 \text{ }\mu\text{M}$ est présenté sur la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

Dans ces conditions, le peptide hybride 5 est totalement digéré, car aucun ion lui correspondant n'a été détecté par recherche par SIR. Comme attendu, sur les chromatogrammes TIC et UV, on constate la présence des fragments du peptide hybride 5. Les fragments 5b et 5c co-éluent au temps de rétention de 1.11 minutes. Le fragment 5b est retrouvé sous sa forme mono-chargée $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 1027.6 et sous sa forme di-chargée $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ m/z 514.5. De même, le fragment 5c est retrouvé sous sa forme mono-chargée $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 647.5 et sous sa forme di-chargée $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ m/z 324.3. Le fragment 5a est présent sous sa forme mono-chargée $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 500.4 au temps de rétention égal à 1.55 minutes.

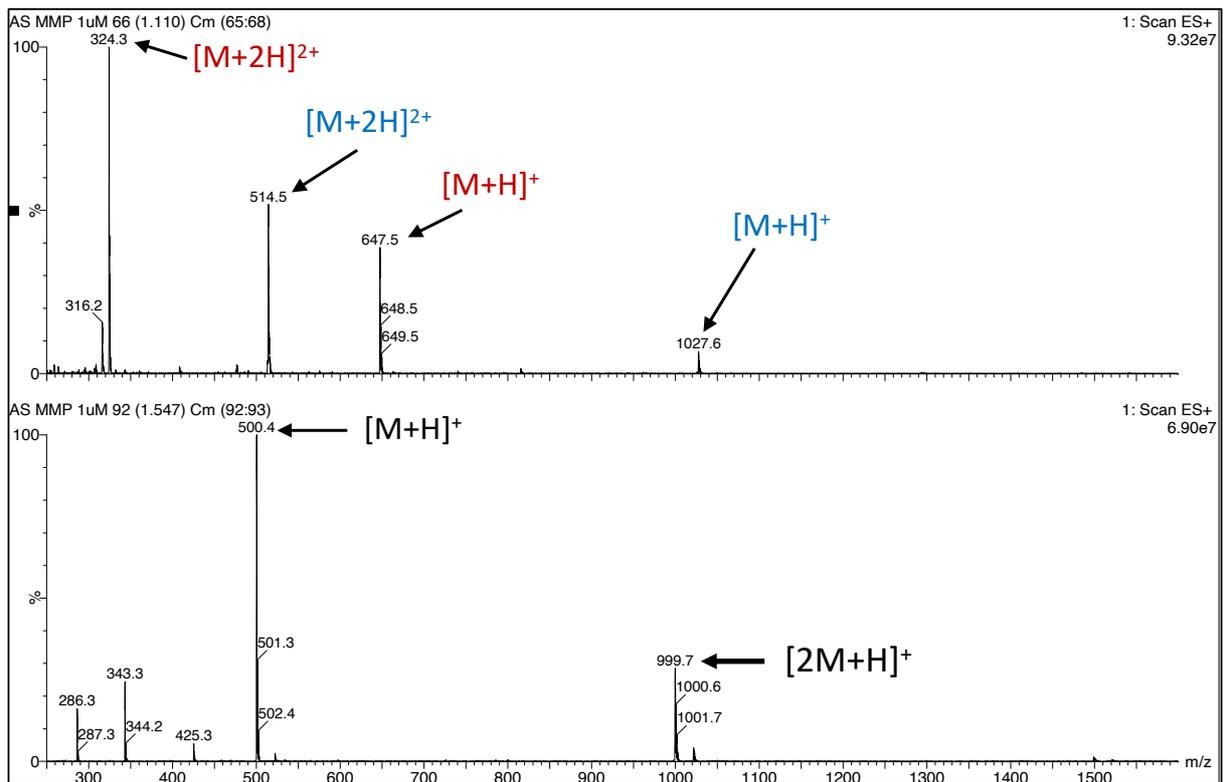
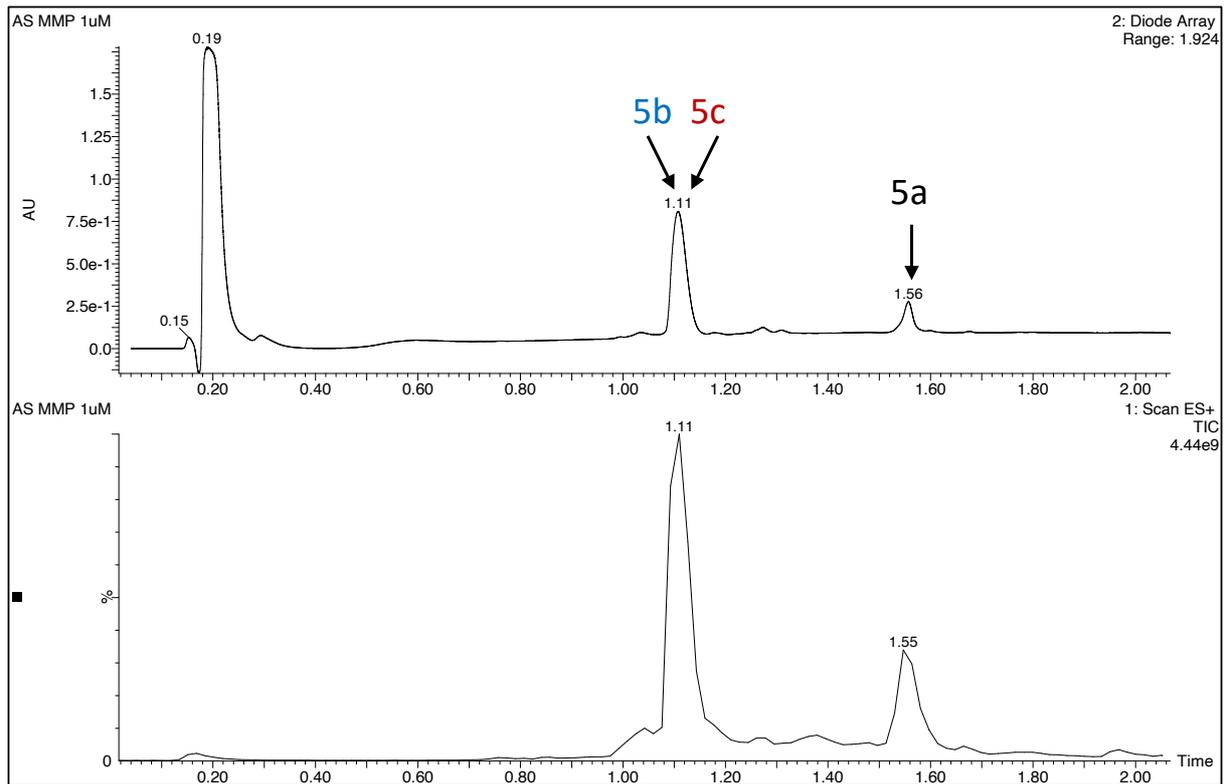


Figure 60. LC/MS du peptide hybride 5 fragmenté après digestion enzymatique par la MMP-13. Les fragments 5a, 5b et 5c sont affichés sur le chromatogramme.

On en conclut qu'à la concentration de 1 μM de MMP-13, le peptide hybride **5** a été totalement clivé par la MMP-13 et aux endroits attendus en 24 heures. Nous obtenons tous les fragments issus du peptide hybride **5**, montrant que la MMP-13 est capable de reconnaître et de cliver le peptide.

Les pourcentages de dégradation après 24h du peptide **5**, obtenus à des concentrations plus faibles d'enzyme sont récapitulés dans le Tableau 9 ci-dessous et ont été déterminés après intégration des pics UV sur les chromatogrammes LC/MS.

[MMP-13]	% peptide hybride 5 à T = 0 heure	% peptide hybride 5 ou de fragments obtenus à T = 24 heures
<i>2 nM</i>	100 %	100 % peptide hybride 5
<i>20 nM</i>	100 %	66 % peptide hybride 5 33.5 % de 5b et 5c 0.5 % de 5a
<i>200 nM</i>	100 %	10 % peptide hybride 5 75 % de 5b et 5c 5 % de 5a
<i>1 μM</i>	100 %	0 % peptide hybride 5 87 % de 5b et 5c 13 % de 5a

Tableau 9. Dégradation du peptide hybride **5** par la MMP-13 au bout de 24 heures, en fonction de la concentration d'enzyme MMP-13.

Afin de permettre une dégradation complète de 10 mM de peptide hybride en solution, la concentration appropriée de la MMP-13 est de 1 μM . C'est cette concentration d'enzyme qui sera utilisée dans la suite de ce manuscrit et notamment sur la partie capteur-IDE, détaillée à la fois dans les Chapitre 3. Matériaux peptidiques hybrides dégradables par l'activité enzymatique de la MMP-13 et Chapitre 4. Étude par mesure d'impédance du capteur modifié avec le matériau peptidique hybride

Il est à noter ici que la HNE n'a pas encore été étudiée à ce jour car les temps de réalisation et d'optimisation de chaque test enzymatique a été plus long et fastidieux que prévu initialement dans le rétroplanning. C'est pour cela que nous avons travaillé uniquement avec la MMP-13.

Il reste maintenant à greffer ce modèle de peptide hybride sur le capteur, dont tout le procédé sera détaillé dans le Chapitre 3. Matériaux peptidiques hybrides dégradables par l'activité enzymatique de la MMP-13.

Chapitre 3 :

Matériaux peptidiques hybrides
dégradables par l'activité enzymatique
de la MMP-13

Chapitre 3. Matériaux peptidiques hybrides dégradables par l'activité enzymatique de la MMP-13

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit la synthèse de blocs silylés originaux peptidiques incorporant des séquences reconnues par deux enzymes d'intérêt. La dégradation des séquences en solution a été étudiée en particulier par la MMP-13 dans le Chapitre 2. Conception d'un matériau peptidique hybride sensible à une activité enzymatique grâce à des peptides hybrides modèles présentant des groupements triméthylsilyles ($\text{Si}(\text{Me})_3$) à chaque extrémité de la séquence peptidique. Ces peptides hybrides ne présentent aucune réactivité dans les conditions sol-gel et restent à l'état monomère en solution. Ils sont donc accessibles et peuvent facilement être reconnus et clivés par les enzymes en solution.

Nous devons à présent vérifier que nous pouvons obtenir un matériau par polymérisation inorganique sol-gel de peptides triéthoxysilanes ($\text{Si}(\text{OEt})_3$). Deux techniques de préparation ont été utilisées : le dip-coating ou le casting et ce, sur deux types de supports, en or et en oxyde d'aluminium.

Le Tableau 10 résume tous les matériaux qui ont été réalisés au cours de cette thèse. Il est à noter que la fonctionnalisation par le MPTMS est réalisée uniquement pour les substrats en or.

Matériau	Fonctionnalisation	Peptide	Concentration	Lavage	MMP	Or	Al₂O₃
<i>S0</i>						✓	✓
<i>S0-lav</i>				48h			✓
<i>S-MPTMS</i>	MPTMS		1%			✓	
<i>S1</i>	MPTMS	1	1 mM			✓	✓
<i>S4</i>	MPTMS	4	1 – 5 – 10 mM			✓	✓
<i>S4-lav</i>	MPTMS	4	1 – 5 – 10 mM	48h		✓	✓
<i>S4-MMP</i>	MPTMS	4	10 mM		24h	✓	
<i>S6</i>	MPTMS	6	10 mM			✓	
<i>S6-lav</i>	MPTMS	6	10 mM	48h		✓	
<i>S6 MMP</i>	MPTMS	6	10 mM		24h	✓	
<i>S7</i>	MPTMS	7	10 mM			✓	
<i>S8</i>	MPTMS	8	10 mM			✓	
<i>S8-lav</i>	MPTMS	8	10 mM	48h		✓	
<i>S8-MMP</i>	MPTMS	8	10 mM		24h	✓	

Tableau 10. Liste des matériaux réalisés au cours de ce travail de thèse.

Partie 1. Préparation d'une couche de matériau hybride dégradable sur un capteur modèle en or et caractérisation physicochimique.

1.1. Généralités sur la fonctionnalisation de surfaces métalliques par des peptides hybrides

L'utilisation la plus courante des peptides hybrides silylés est la modification de surface des matériaux par greffage. En effet, les travaux antérieurs réalisés entre l'ICGM et l'IBMM ont montré qu'un groupe alkoxy silane présent sur un peptide pouvait réagir chémosélectivement avec différentes surfaces présentant des groupements Si-OH en surface pour former des liaisons stables Peptide-Si-O-Si-Surface. De manière avantageuse, il est important de souligner que la réaction sol-gel est chemoselective et n'affecte pas les chaînes latérales des aminoacides. Par cette méthode, des greffages de peptide sur du verre¹⁶⁵, de la silice mésoporeuse¹⁶⁶, des nanoparticules de silice¹⁶⁷, mais aussi du silicone activé par traitement au plasma¹⁶⁸, ont pu être réalisés et une couche de matériau hybride peptidique a été ainsi formée et ancrée de manière covalente sur un support.

En théorie, au-delà de l'oxyde de silicium, toute surface d'oxyde métallique peut être modifiée par greffage de peptides hybrides silylés pour former des liaisons de type Peptide-Si-O-Métal.

Si les peptides hybrides ont été greffés sur des matériaux siliciques ou silicone, leur immobilisation directe sur d'autres métaux ou oxydes métalliques n'a pas encore été réalisée. La fonctionnalisation d'une couche de titane par des peptides hybrides a pu être obtenue mais elle a nécessité le dépôt préalable d'une couche de silice réalisée en faisant réagir le TEOS avec la surface activée présentant des groupes Ti-OH. Différents peptides hybrides antibactériens ont été greffés à la couche de silice ainsi obtenue.¹⁶⁹

Qu'ils soient chloro ou alkoxy silane, les peptides hybrides peuvent présenter différents types de groupement après hydrolyse comme des SiMe_2OH , SiMeOH_2 et SiOH_3 . Le nombre de méthyles liés au silicium diminue les possibilités de former des liaisons, l'extrême étant le triméthylsilyle qui ne peut pas polymériser (dans ce travail, le peptide hybride 5 utilisé comme contrôle a été fonctionnalisé avec des groupes SiMe_3). En effet, les liaisons Si-Me sont stables et empêchent la formation d'autres liaisons. Avec des groupement SiMe_2OH , obtenus par hydrolyse de précurseurs de type SiMe_2OEt ou SiMe_2Cl , on ne peut former qu'une seule liaison Si-O-X, (X étant un autre atome de silicium ou un autre métal). On peut ainsi obtenir des dimères de peptides hybrides en solution¹⁷⁰, des polymères linéaires¹⁷¹ ou une monocouche en surface d'un matériau, comme du silicone¹⁷² ou une couche d'oxyde de titane.¹⁶⁹

En résumé, le nombre de liaisons possibles avec le matériau dépend du nombre de Si-OH après hydrolyse.

Dans ce travail de thèse, les groupes trialkoxysilanes ont été choisis car nous avons émis l'hypothèse que la fixation par trois liaisons siloxanes serait plus forte que par une ou deux liaisons. Cela permettrait ainsi la formation d'un réseau hybride assez robuste.

Dans ce chapitre, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au greffage des peptides hybrides silylés sur des surfaces en or qui constituent le capteur.

1.2. Fonctionnalisation de surfaces en or par des peptides hybrides

1.2.1. Choix des électrodes commerciales

Nous nous sommes intéressés au greffage de peptide hybrides sur de l'or car notre capteur modèle commercialisé par Micrux Technologies (Espagne) présente des électrodes interdigitées en or d'épaisseur de 100 nm déposées sur un substrat en verre, ce qui définit une zone de dépôt du matériau hybride entourée par deux électrodes (Figure 61).

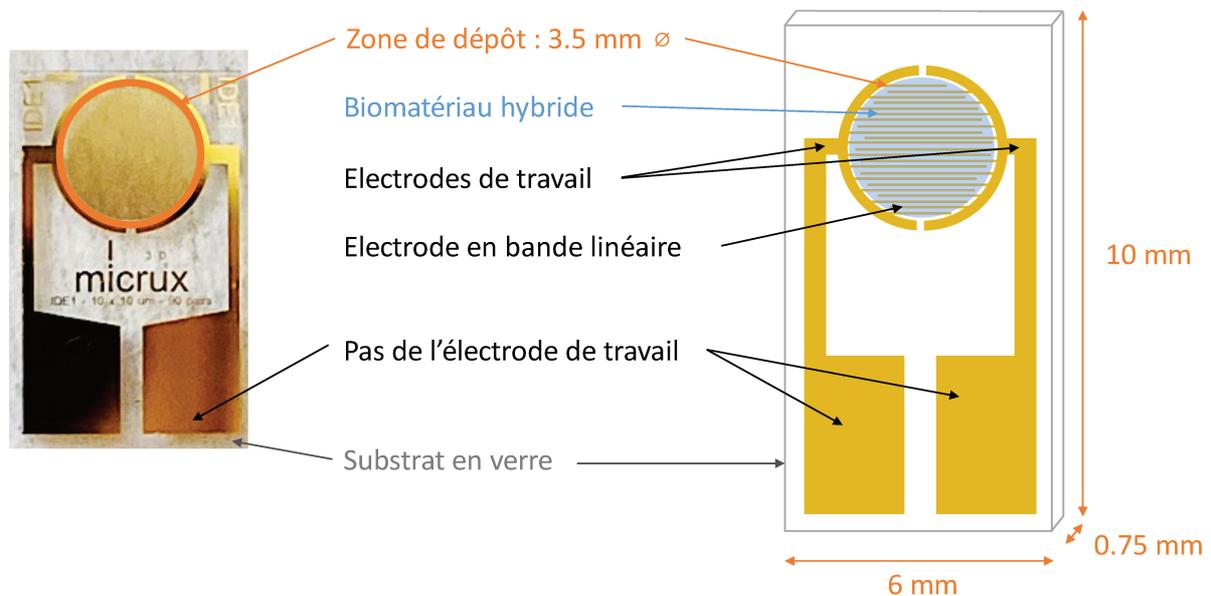


Figure 61. Électrodes interdigitées en or (IDE). La zone ronde (zone de dépôt) correspond à la zone de dépôt de l'échantillon. Les mesures seront effectuées en connectant une station sous-pointes aux deux pas de l'électrode de travail.

Il est important de noter ici que ce type de support nous servira uniquement de modèle et ne sera pas utilisé pour le dispositif final associé à la RFID. Ceci est dû à (i) sa rigidité qui empêche de l'intégrer dans un pansement, mais aussi (ii) au coût de ce genre d'électrodes (6€ l'unité) qui n'est pas compatible avec une production industrielle de pansements jetables.

Pour ces raisons, après avoir validé et caractérisé le greffage du matériau hybride peptidique sur des électrodes commerciales, nous avons décidé de travailler avec un autre type de support à bas coût, que nous avons préparé nous-même, en oxyde d'aluminium poreux ou

alumine poreuse (Al_2O_3). La fonctionnalisation d' Al_2O_3 est décrite au Chapitre 3 dans la Partie 1.3.1. Préparation des supports en oxyde d'aluminium.

Ce choix d'un capteur commercial nous a permis dans un premier temps de nous affranchir de la non-homogénéité de capteurs à bas coûts plus intéressants pour une application de type pansement jetable. Le fait de travailler avec un support standardisé et homogène nous a permis de développer la méthode de greffage du matériau, d'étudier sa stabilité et sa résistance en présence de différents stimuli et, in-fine, d'étudier l'action d'une enzyme sur le matériau greffé sur la surface des électrodes.

1.2.2. Pré-fonctionnalisation des surfaces d'or avec le MPTMS

Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre précédent, il est théoriquement possible de greffer un silane sur un métal, en formant une liaison Si-O-Métal et nous avons donc essayé de fonctionnaliser directement l'or avec le peptide hybride.

Pour cela, sans ajout de précurseur, nous avons déposé par casting une goutte de 3 μL d'une solution de EtOH/ H_2O -HCl v/v 98/2 à pH 1.4 d'une concentration de 10 mM de peptide hybride **4**. L'échantillon a ensuite été séché dans une étuve à 60°C afin d'évaporer les solvants, puis est rincé rapidement dans de l'eau MilliQ® dans le but d'éliminer les parties du matériau peptidique hybride qui n'auraient pas été greffés sur l'or. Notons ici, que, afin de déterminer la densité de matériau greffée sur la surface en or, la zone de dépôt de l'IDE a été séparée en deux avec un petit morceau de scotch afin de réaliser une « marche » qui pourra permettre à l'analyse par AFM de déterminer la densité de matériau peptidique hybride greffé. De plus, lors du dépôt par casting, la goutte ne reste pas uniquement dans la zone de dépôt (Figure 61) mais s'étend par capillarité sur toute la surface de l'IDE. Ceci sera ainsi pris en compte lors des calculs de densité de surface. Par ailleurs, l'échantillon sera nettoyé avec de l'acétone afin d'enlever le matériau peptidique hybride qui aurait pu être greffé au niveau des électrodes de travail et des pas des électrodes pour ne pas altérer la mesure électrique qui sera expliquée et réalisée dans le Chapitre 4. Étude par mesure d'impédance du capteur modifié avec le matériau peptidique hybride.

La Figure 62A montre une topographie de l'IDE réalisée par microscope à force atomique (AFM), dont le principe sera détaillé dans la partie 2.4. AFM. Elle permet d'imager la surface de l'IDE avant le dépôt de la solution de précurseur. Après l'analyse de la topographie de cette image, il en résulte que la surface de l'IDE est très rugueuse.

La Figure 62B montre l'état de surface de l'électrode après séchage. On observe bien la création du matériau peptidique **S4**. L'état de surface de l'échantillon enregistré par le logiciel de l'AFM (données non montrées) permet d'indiquer que l'état de surface de l'IDE est moins rugueux. Ceci suggère un greffage par casting de 1 μm .

Après un rinçage rapide à l'eau MilliQ®, l'échantillon est ensuite séché sous flux d'azote et est représenté sur la Figure 62C. On observe une dégradation importante du matériau peptidique.

D'une part, la couche est beaucoup plus irrégulière et vallonnée, et ne dépasse pas 0.78 μm d'épaisseur. De plus, les pores profonds () observés suggèrent que le matériau a été enlevé jusqu'à atteindre la couche d'électrode, avec une perte d'au moins 22% de matériau en utilisant uniquement les topographies des surfaces des échantillons.

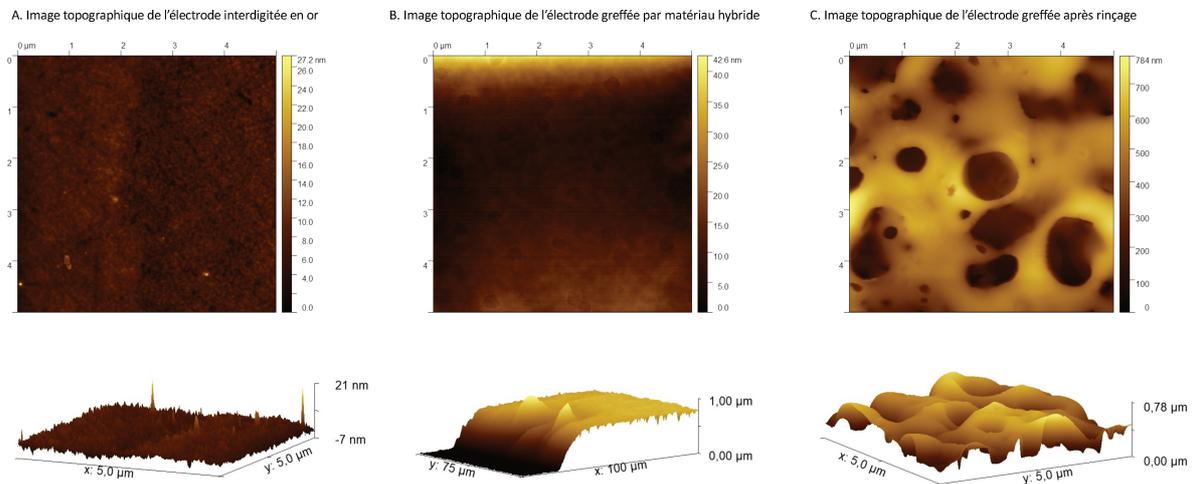


Figure 62. Images topographiques obtenues par AFM de S0 en or (A), de S4 (B) et S4-lav (C).

La couche hybride n'étant pas greffée solidement, nous avons émis l'hypothèse que la liaison covalente Si-O-Au n'était pas stable. Ce comportement est analogue avec le greffage inefficace de peptides hybrides sur du titane, déjà observé au laboratoire.¹⁶⁹ Nous avons donc envisagé de pré-fonctionnaliser la surface de la zone de dépôt (Figure 61) avant l'ajout des peptides hybrides. Pour ce faire, nous avons déposé du 3-Mercaptopropyl triméthoxysilane (MPTMS) sur les électrodes en or. En effet, le sulfhydryle de ce réactif réagit avec l'or rapidement pour former une liaison S-Au.^{173,174} La surface de l'électrode a été traitée avec une solution de MPTMS (1% v/v) dans l'hexane pendant 30 minutes (Figure 63). Après évaporation du solvant, une couche de triméthoxysilanes est obtenue et servira à l'immobilisation du peptide hybride silylé à la surface d'or.

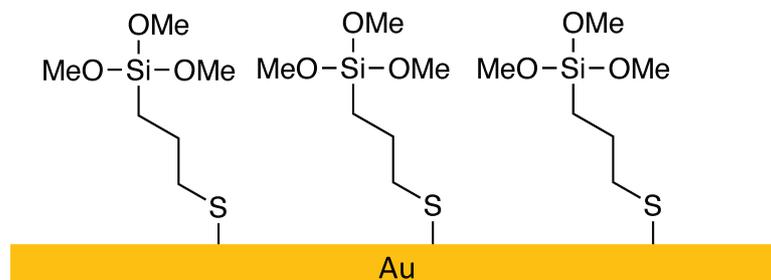


Figure 63. Surface en or modifiée par le MPTMS.

L'électrode ainsi fonctionnalisée présente un réseau de liaisons covalentes intermédiaires S-Au entre la surface en or et la couche d'alkoxysilane, sur laquelle la couche de peptides hybrides a été greffée. Deux méthodes décrites dans le chapitre précédent ont été utilisées dip-coating ou casting.

1.2.3. Essais de dip-coating

Le dip-coating a été réalisé par trempage à une vitesse de 14 cm.mn^{-1} dans une solution sol-gel de EtOH/H₂O-HCl v/v 98/2 à pH 1.4 contenant une concentration de 10 mM de peptide hybride. Les échantillons ont été séchés durant 30 minutes dans une étuve.

Malheureusement, le dip-coating ne nous a pas permis d'obtenir une couche très homogène sur la surface en or. Ceci est dû au fait que les électrodes interdigitées (100 nm d'épaisseur) déposées sur le substrat en verre laissait des zones entre le verre et certaines électrodes qui n'étaient pas pré-fonctionnalisées avec le MPTMS. Ainsi, lors du retrait par la méthode de dip-coating, l'épaisseur entre le verre et les électrodes a entraîné des effets de bords importants, rendant l'état de surface greffée peu homogène. De plus, cette méthode est relativement longue à mettre en place lorsqu'il est question de réaliser plusieurs échantillons en même temps. C'est pour sa facilité de mise en œuvre que nous avons retenu la méthode par casting.

1.2.4. Fonctionnalisation par casting

Elle permet ainsi le dépôt d'une goutte de la solution contenant le peptide hybride 4 (3 μ L – 10 mM d'une solution EtOH/H₂O-HCl v/v 98/2 à pH 1.4) puis une évaporation dans une étuve à 60°C pendant 30 minutes. La goutte est répartie sur toute la surface, comme détaillée dans les paragraphes ci-dessus, et après le séchage, les électrodes de travail et les pas des électrodes seront nettoyés (Figure 61). 30 nmoles du peptide hybride ont été greffées sur une surface de 10 mm x 6 mm nm², donnant une densité théorique de 301 peptides/nm².

Une couche plus épaisse de matériau greffé pourra être obtenue, rendant sa caractérisation plus facile par diverses techniques.

La Figure 64 ci-dessous illustre la couche hybride immobilisée (cas idéal) à la surface d'or après hydrolyse et condensation des fonctions triméthoxysilanes du MPTMS et les éthoxysilanes des peptides hybrides.

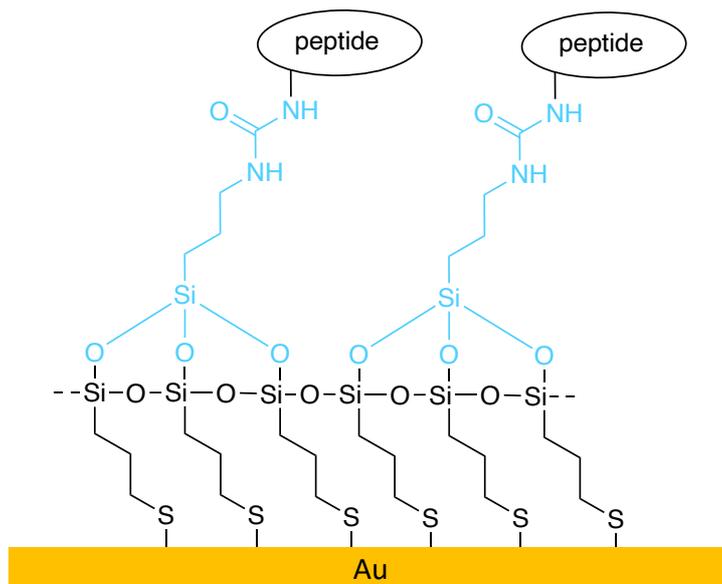


Figure 64. Représentation schématique du greffage des peptides hybrides sur la surface en or préalablement fonctionnalisée par du MPTMS.

Les matériaux ont été caractérisés qualitativement et quantitativement par XPS (spectrométrie photoélectronique X), MEB-EDX (spectrométrie à dispersion d'énergie X couplée au microscope électronique à balayage), microscope à fluorescence ou encore par AFM (microscope à force atomique). Toutes ces méthodes et ces résultats d'analyses seront présentés dans la partie 2 de ce chapitre. Enfin, les supports ont été caractérisés en mesurant l'impédance électrique. Ces mesures feront l'objet du Chapitre 4. Étude par mesure d'impédance du capteur modifié avec le matériau peptidique hybride.

1.3. Fonctionnalisation de supports en oxyde d'aluminium poreux par des peptides hybrides

1.3.1. Préparation des supports en oxyde d'aluminium

Les supports en oxyde d'aluminium ont été fabriqués au sein de l'équipe « Capteur RFID et Électronique Flexible (RFEF) » de l'Institut d'Électronique et des Systèmes (IES). Leur conception permet de les produire à faible coût (0.1€ l'unité). Les deux bandes foncées représentent les électrodes, en aluminium. La surface entre et autour des électrodes correspond à de l'oxyde d'aluminium poreux : Al_2O_3 (Figure 65).

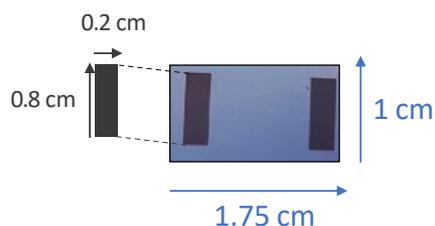


Figure 65. Photo du support en oxyde d'aluminium poreux.

Outre son faible coût, l'avantage de ce support est sa flexibilité qui permet de l'intégrer à un futur dispositif de pansement intelligent. Sa surface poreuse rend ce support très attrayant en augmentant considérablement les capacités de greffage du matériau hybride, tant en surface que dans les pores. Cela permettrait d'augmenter la surface de contact entre les enzymes et le matériau, amplifiant les résultats électriques par mesure d'impédance électrique (Chapitre 4. Étude par mesure d'impédance du capteur modifié avec le matériau peptidique hybride).

Le support en oxyde d'aluminium poreux a été réalisé par l'anodisation d'aluminium déposé sur une couche de 8 μm de polytéréphtalate d'éthylène (PET) qui a été fourni par la société TAGEOS SAS. L'appareillage utilisé pour l'anodisation est un banc pour échantillons flexibles muni d'une cuve mise dans un banc de refroidissement à -20°C . Cette cuve est placée sous agitation magnétique. Elle possède comme cathode une grille de platine. Le banc d'anodisation est relié à un générateur de courant SourceMeter Keithley 2400 et à un multimètre. Le tout est piloté par le logiciel LabVIEW.

L'anodisation est réalisée en 3 étapes :

(i) Pré traitement

Les supports (aluminium sur PET) sont lavés et dégraissés avec un savon et une éponge lisse puis rincés avec de l'eau déminéralisée, de l'isopropanol et séchés sous azote. Puis on vient déposer en extrémité de support un morceau de ruban adhésif en cuivre qui permettra de le relier à la grille de Pt. On vient ensuite rajouter un ruban isolant thermique entre le ruban de cuivre et l'échantillon d'aluminium, représenté sur la Figure 66.

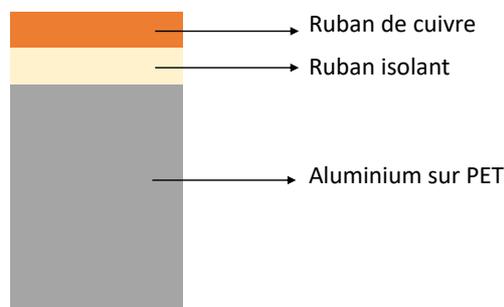


Figure 66. Pré traitement du support d'aluminium sur PET avant anodisation.

(ii) Anodisation

L'anodisation se déroule en 3 étapes. La première consiste en la préparation d'une solution d'acide phosphorique à 15% qui sera mise dans une cuve préalablement réfrigérée à -20°C . Le support est fixé au banc d'anodisation, et jouera un rôle d'anode et sera donc relié à la cathode grâce à la partie en cuivre. Le support est ensuite plongé dans cette solution.

La seconde étape est la mise en place de la réaction d'anodisation. Pour ce faire, pendant 750 secondes, une tension de 120 V est appliquée selon un mode de réaction galvanostatique

(courant constant) avec une intensité de 10 mA.cm^{-2} . Cette étape permet la réalisation de l'oxyde d'aluminium poreux. La vitesse de la formation de la couche d'oxyde d'aluminium peut être représentée selon l'Équation 6 suivante :

$$d = V . t = 0,029 . \frac{I}{S} . t$$

Équation 6. Vitesse de formation de la couche d'oxyde d'aluminium.

d correspond à l'épaisseur de la couche d'oxyde d'aluminium formée, V la vitesse de formation de la couche d'oxyde d'aluminium en $\mu\text{m.nm}^{-1}$, I/S correspond à la densité de courant en mA.cm^{-2} et t , correspond au temps auquel l'échantillon est anodisé. Il en résulte une épaisseur de $3.6 \mu\text{m}$ d'oxyde d'aluminium formée à la surface de cet échantillon.

La dernière étape consiste en l'élargissement de ces pores. Pour ce faire, le support est mis dans une nouvelle solution d'acide phosphorique 15% pendant 110 secondes, à 50°C et sous ultrasons.

(iii) Post traitement

Le support est dans un premier temps rincé dans de l'eau milli Q durant 30 secondes à 50°C . Puis il est mis dans une solution d'acide nitrique 5% pendant 120 secondes à 50°C sous ultrasons. Cette étape va permettre de nettoyer les pores des traces d'acide phosphorique pouvant rester. Enfin, le support est rincé à nouveau dans de l'eau MilliQ® à 50°C durant 30 secondes, et sera séché sous azote.

Une fois que le support est maintenant devenu de l'alumine poreuse, des électrodes sont ensuite rajoutées sur le support dans le but de créer des contacts électriques. Pour ce faire, un masque de nickel est utilisé permettant le dépôt de 300 nm d'électrodes en aluminium (Figure 67a). On obtient alors le support schématisé sur la Figure 67b. La Figure 67c représente une vue de tranche du support en Al_2O_3 .

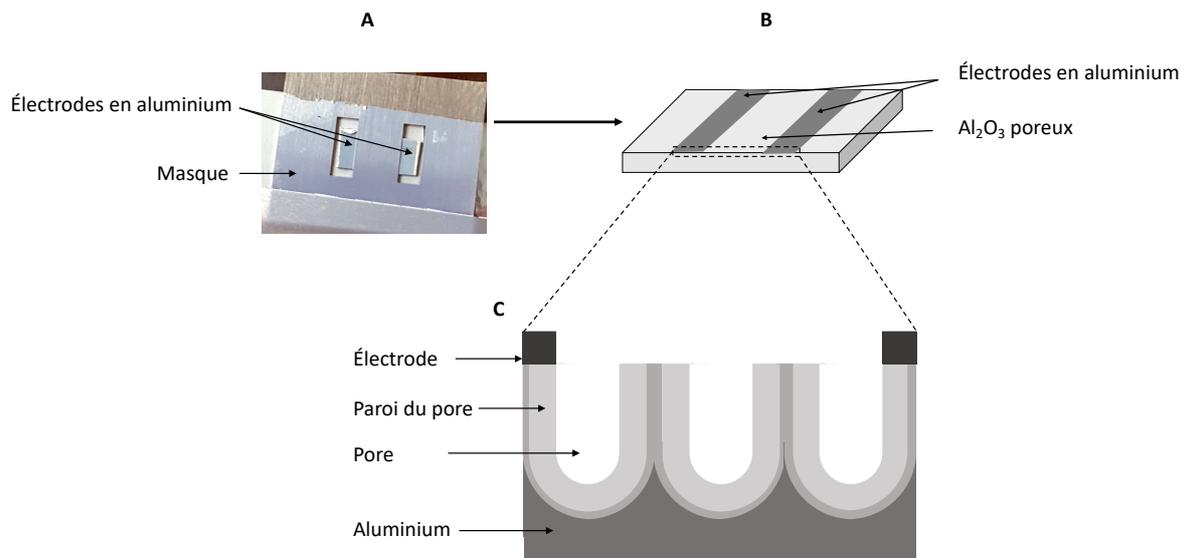


Figure 67. Support en oxyde d'aluminium poreux (Al_2O_3). Les électrodes représentées en gris foncé sont en aluminium et toute la zone gris clair correspond à de l' Al_2O_3 .

1.3.2. Préparation de la couche hybride sur le capteur

Le support en Al_2O_3 est donc prêt à être greffé avec les peptides hybrides silylés par casting. La préparation du greffage du matériau est réalisée dans une solution de type sol-gel, dont le principe a été vu dans le Chapitre 2. Conception d'un matériau peptidique hybride sensible à une activité enzymatique. Elle consiste en le dépôt d'une goutte de $3 \mu L$ d'une solution de 2 % d' H_2O/HCl à pH 1.4 et de 98 % d'éthanol absolu contenant 10 mM de peptide hybride 4. L'échantillon est ensuite placé dans une étuve à $60^\circ C$ pendant 30 minutes, et séché sous flux d'azote. L'échantillon n'est pas rincé tout de suite dans de l'eau MilliQ® afin d'étudier par la suite l'influence de l'humidité et des rinçages sur ce support en Al_2O_3 .

La goutte est déposée entre les deux électrodes qui permettra par la suite d'étudier les propriétés électriques du matériau hybride greffé sur le support en Al_2O_3 . Le greffage est assuré par des liaisons Peptide-Si-O-Al, représentées sur la Figure 68.

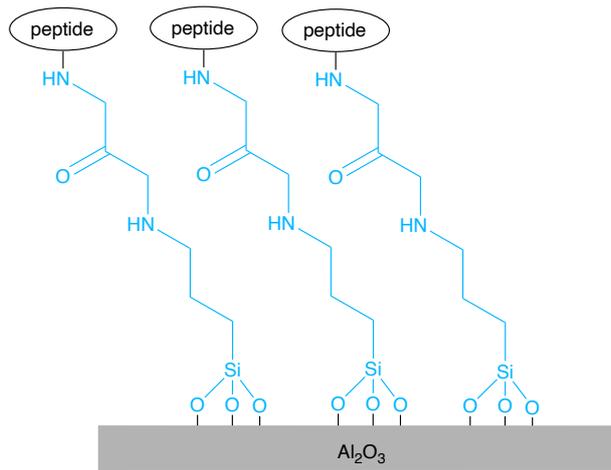


Figure 68. Représentation schématique du greffage du biomatériau sur support d' Al_2O_3 .

La caractérisation du matériau **S4** – à partir du peptide hybride **4** – sur plusieurs supports en oxyde d'aluminium, sera étudiée par la suite dans la Partie 3. Caractérisation de surface métallique en Al_2O_3 fonctionnalisée par des peptides hybrides

Partie 2. Caractérisation de surface métallique en or fonctionnalisée par des peptides hybrides

2.1. MEB-EDX

En associant la microscopie électronique à balayage (MEB) à la microanalyse par énergie dispersive de rayons X (EDX), cette technique permet d'analyser de manière qualitative localement ou globalement un matériau non organique. On peut ainsi déterminer la composition du revêtement d'un matériau, qui, dans le cas présent, est un matériau peptidique hybride sur une coupe micrographique.

Le principe du MEB consiste à appliquer un champ électrique très intense en pointe de cathode pour extraire ou amplifier l'extraction des électrons dans le but d'identifier les éléments présents sur l'échantillon tout en réalisant une image en haute résolution. On parle de microanalyse par EDX, dans laquelle l'émission des rayons X sera donc traitée de façon électronique. Les pics des énergies seront générés et comparés à une base de données permettant une analyse qualitative du matériau.

Dans un premier temps, le support en or non fonctionnalisé (**SO**) a été analysé dans le but d'établir un échantillon servant de « ligne de base » avant que toute modification de cet échantillon ait été apportée dans la suite de ce travail.

Sur l'image électronique de la Figure 69, les bandes noires correspondent au substrat en verre et les bandes grises correspondent aux électrodes en or. Trois spectres ont été effectués pour analyser l'état de surface de l'échantillon. Les spectres 5 et 6, correspondent à l'analyse de la surface en or et sont identiques (seul le spectre 5 est présenté). Ils indiquent un pourcentage atomique de 47.1% d'or (Au) sur la surface et de seulement 1.6% de Si ce qui est normal l'échantillon n'est pas fonctionnalisé.

Comme attendu, le spectre 7 correspond bien à l'analyse d'une surface en verre contenant majoritairement du SiO₂. On observe en effet une augmentation significative du pourcentage atomique en silicium (23.47%) et de l'oxygène (67.7%). Il faut noter également un pourcentage en carbone élevé au niveau de la surface en or (39.39%), qui suggère une contamination organique carbonée, ce qui est très courant.

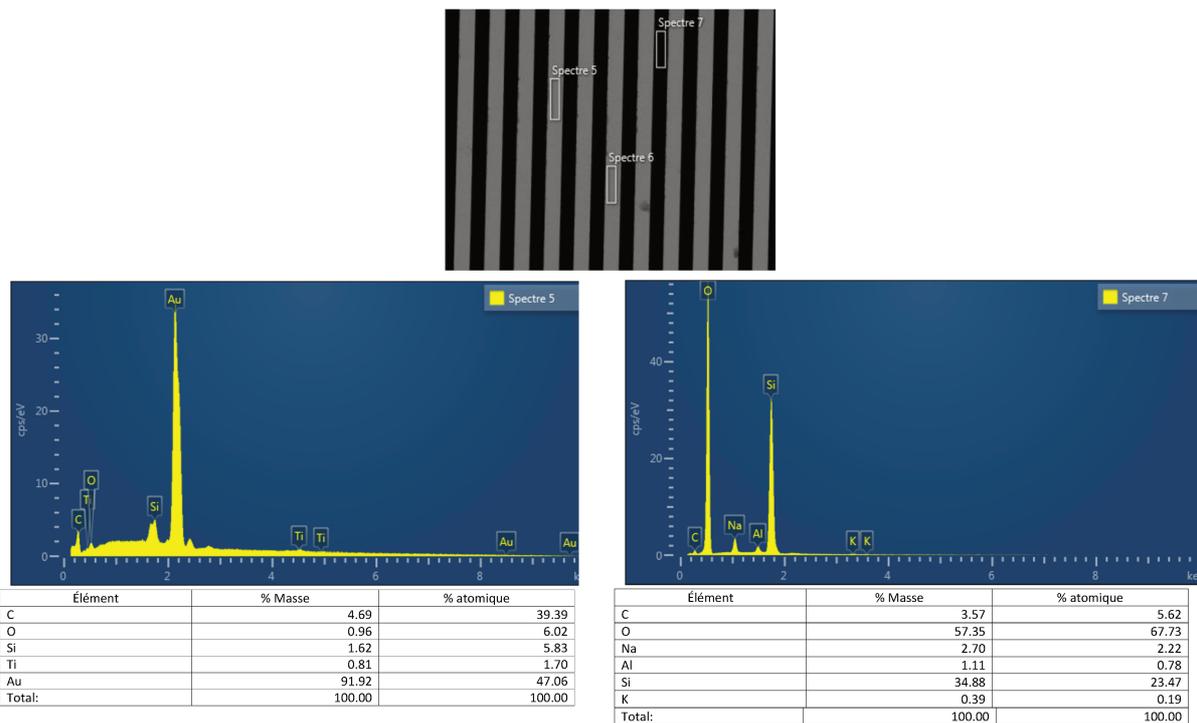


Figure 69. Analyse EDX du support en or vierge : échantillon S0.

Nous avons ensuite analysé le capteur IDE après une fonctionnalisation au MPTMS. Les spectres obtenus pour **S-MPTMS** sont présentés en Figure 70.

Comme attendu, on constate une chute de 15% de l'or, une augmentation de près de 50% du carbone, ce qui indique bien que le MPTMS a recouvert la surface en or, de manière relativement uniforme. En effet, les spectres sont identiques aux différents endroits analysés.

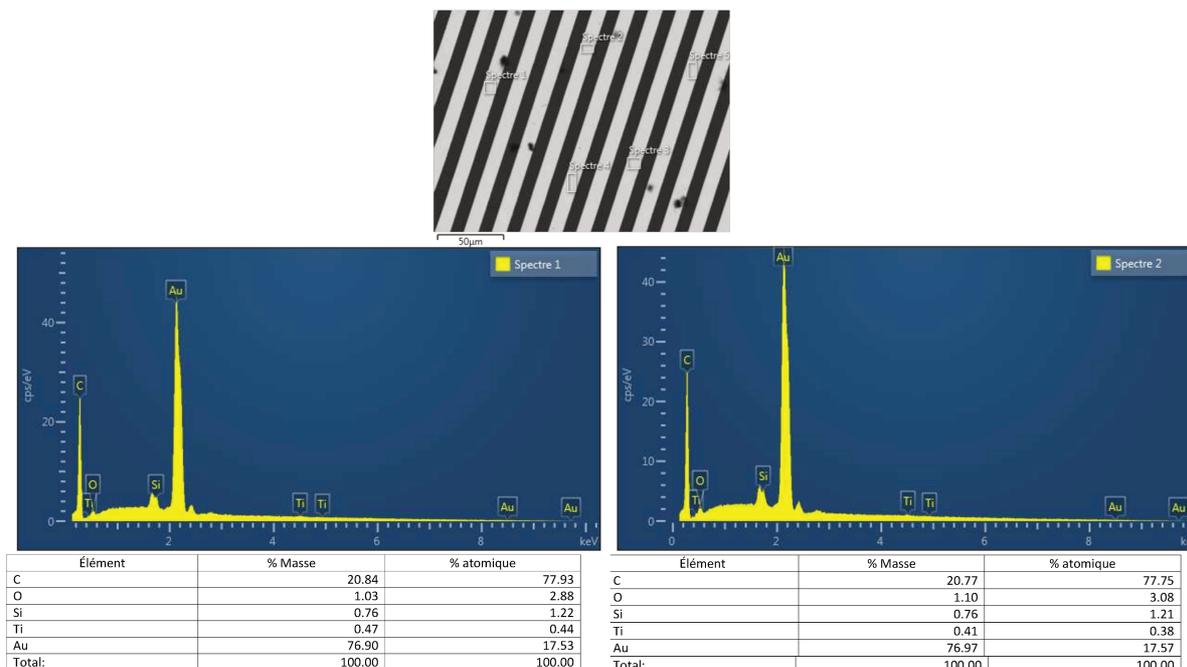


Figure 70. Analyse EDX du support en or après fonctionnalisation par MPTMS : *S-MPTMS*.

Les formes rondes noires qui apparaissent sur l'image électronique peuvent correspondre à des résidus de poussières qui malgré tous les soins apportés à l'échantillon restent encore présents.

Enfin, l'échantillon **S4** obtenu par polymérisation de surface d'or du peptide hybride 4 portant un groupement ferrocène a été analysé. La photo de microscopie électronique est présentée à gauche de la Figure 71.

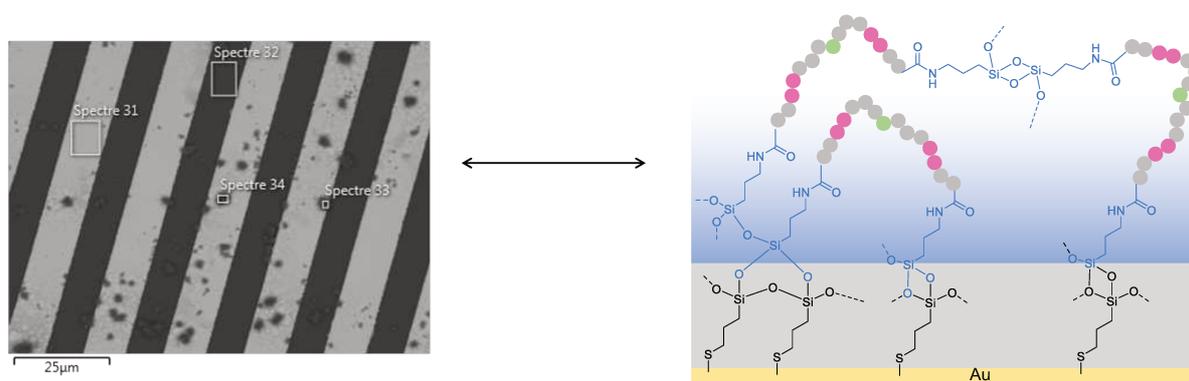


Figure 71. Image prise en microscopie électronique de l'échantillon **S4** (gauche) et illustration du matériau peptidique hybride correspondant (droite).

Les cercles verts correspondent à la lysine fonctionnalisée par un groupement ferrocène et les cercles roses correspondent aux séquences clivables par la MMP-13.

Les résultats de l'analyse MEB-EDX de l'échantillon **S4** sont présentés en Figure 72. On remarque tout d'abord des formes rondes noires qui peuvent correspondre à des résidus de poussière incrustés sur l'échantillon, comme pour la Figure 70.

Comme attendu, on observe la présence de Fer (0.66%, spectre 33) dû au ferrocène présent dans la séquence des peptides hybrides **4**, mais on ne l'observe pas sur le spectre 31, probablement parce que le greffage du matériau peptidique hybride **S4** n'est pas uniforme. De plus en vue du pourcentage atomique de l'or (18.34%) celui-ci est quasiment similaire au pourcentage atomique de l'or sur l'échantillon **S0** (17.57%).

Les pourcentages calculés théoriques atomique et massique du fer présent dans la séquence peptidique sont de 0.3% et 2.41%, respectivement. Le spectre 33, qui correspond à l'analyse MEB-EDX sur l'or montre notamment une apparition du pourcentage d'azote de 0.74%, suggérant ici aussi le greffage du matériau peptidique hybride sur l'or.

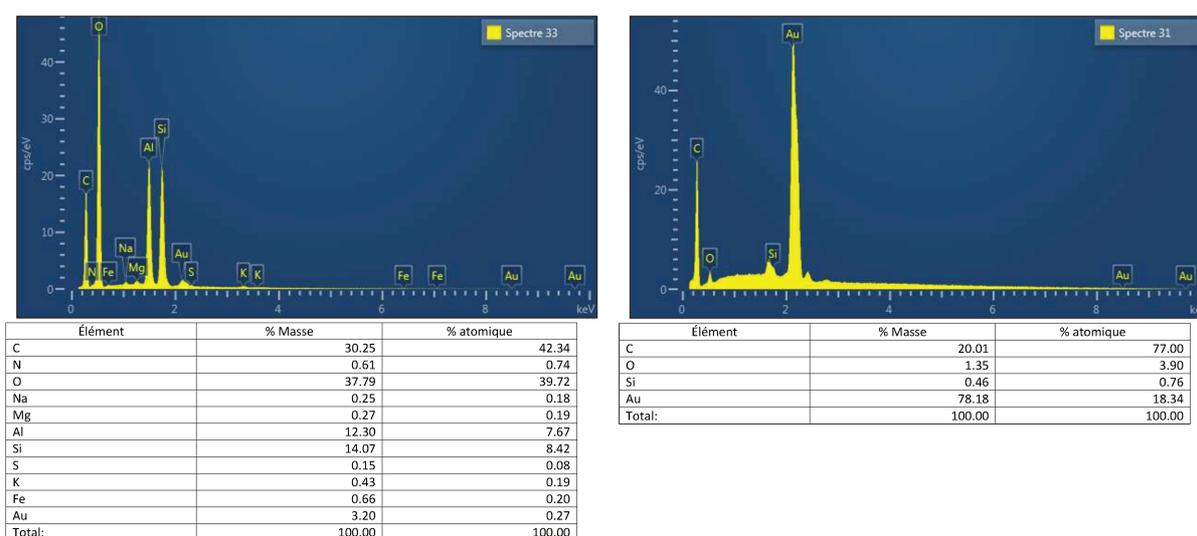


Figure 72. Analyse MEB-EDX du matériau peptidique hybride greffé sur le support en or : **S4**.

Enfin, nous avons vérifié ici que le matériau peptidique hybride était digéré par la MMP-13 et entraînait une modification de la composition de surface.

3 μL d'une solution de MMP-13 à une concentration de 1 μM dans une solution de tampon biologique T (Chapitre 2, Partie 4.1. Activation de la pro MMP-13) ont été déposés sur la zone de dépôt de l'échantillon, comme vu sur la Figure 61. La digestion enzymatique est réalisée à 37°C et à un taux d'humidité relative de 90%, maintenus constants, dans une enceinte climatique sur une période de 24h. L'échantillon est ensuite rincé plusieurs fois dans de l'eau MilliQ® afin d'éliminer au maximum toutes les traces d'ions présents dans la solution enzymatique ainsi que les fragments peptidiques qui ont pu être digérés.

L'échantillon **S4-MMP** obtenu est séché sous flux d'azote puis analysé par MEB-EDX.

Les spectres obtenus révèlent plusieurs particularités, illustrées sur la Figure 73.

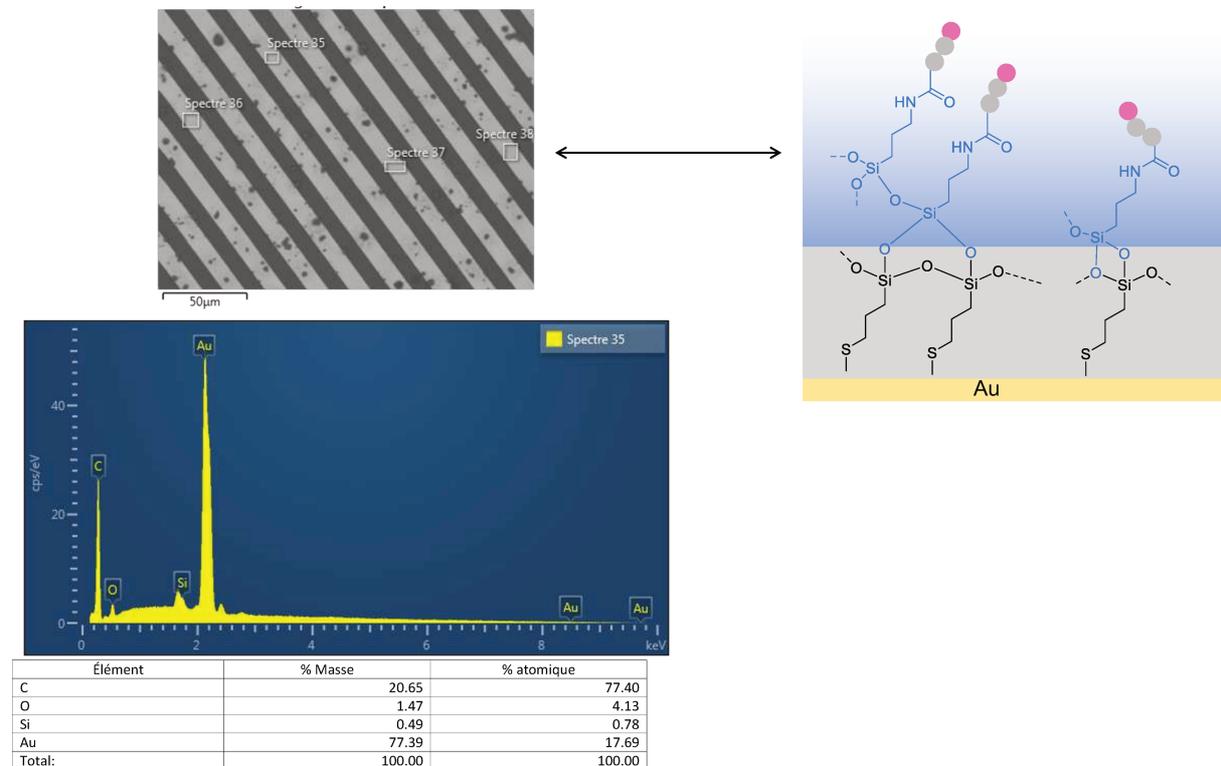


Figure 73. Analyse MEB-EDX du matériau peptidique hybride après activité enzymatique de la MMP-13 : **S4-MMP**.
Les cercles roses correspondent aux séquences clivées par la MMP-13.

D'abord, et en comparaison avec le spectre 33, le fer n'est pas détecté, suggérant que le matériau peptidique hybride a été dégradé. Ensuite, le pourcentage atomique de l'or a considérablement ré augmenté atteignant 17.69 %, ce qui suggère que la MMP-13 a décapé le matériau peptidique hybride jusqu'au niveau de la couche d'or.

2.2. Microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence ou épifluorescence devrait confirmer les résultats obtenus par MEB-EDX. Afin d'utiliser cette méthode de caractérisation, nous avons préparé le peptide hybride **6**, un analogue du peptide hybride **4** présentant un fluorochrome introduit avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), à la place du groupement ferrocène (Figure 74).

Nous nous attendons à ce que les analyses par épifluorescence nous confirment d'abord le greffage covalent du matériau peptidique hybride, stable après les lavages dans le tampon T, et nous montrent la dégradation induite par la MMP-13.

Ainsi, lorsque le matériau sera greffé sur l'or, la fluorescéine émettra son signal en microscopie à fluorescence confirmant ou non le succès du greffage.

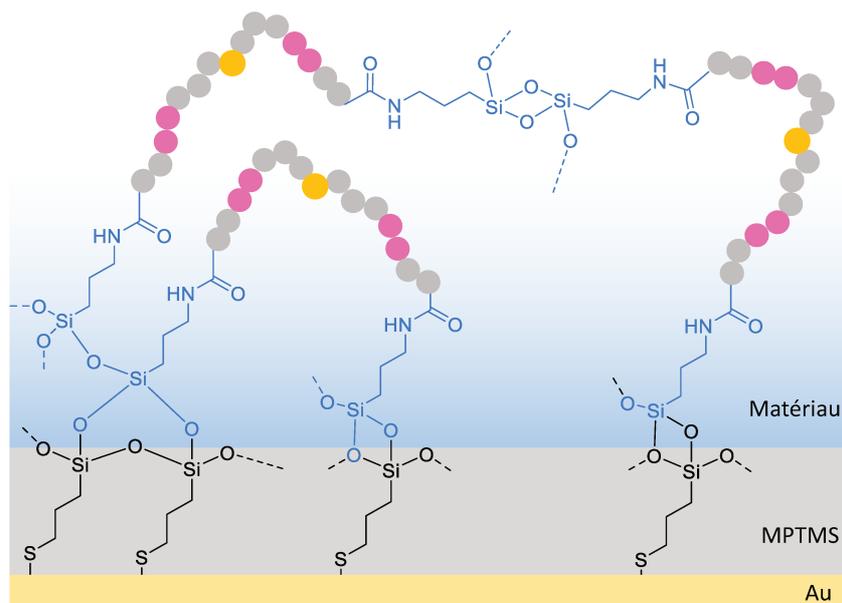


Figure 74. Couche de biomatériau sur l'or préparé par le peptide hybride **6**. Les zones jaunes correspondent au fluorochrome, et les zones roses correspondent aux séquences clivables par la MMP-13.

La Figure 75 montre l'observation en microscopie par fluorescence de la surface de l'échantillon **S-MPTMS**. On constate comme attendu que la surface n'émet pas de fluorescence. La photo de droite est un contrôle et montre que la fonctionnalisation par le MPTMS n'altère pas l'état de surface de l'électrode.

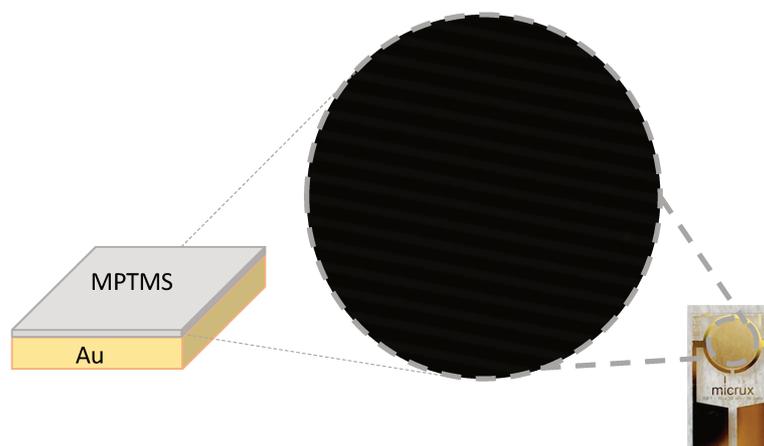


Figure 75. Image prise par microscopie à fluorescence de l'échantillon **S-MPTMS**.

L'échantillon **S6** est obtenu par dépôt (casting) de 3 μL d'une solution de peptide hybride **6** bis-silylé à 10 mM dans une solution de EtOH/H₂O-HCl v/v 98/2 à pH 1.4 sur l'or (**S6**) comme vu dans la Partie 1.2. Fonctionnalisation de surfaces en or par des peptides hybrides de ce chapitre. L'échantillon est ensuite séché pendant 30 minutes à 60°C. Par la suite, l'échantillon

est lavé dans une solution contenant du tampon T durant 48h, puis rincé plusieurs fois dans de l'eau MilliQ® et séché sous flux d'azote.

En comparaison avec l'échantillon **S-MPTMS** (Figure 75) avant greffage du peptide hybride **6**, l'échantillon **S6** montre une forte émission de fluorescence (Figure 76).

De plus, l'échantillon **S6** a été rincé pendant 48h ce qui confirme le succès du greffage et la résistance de la couche de matériau peptidique hybride sur l'or.

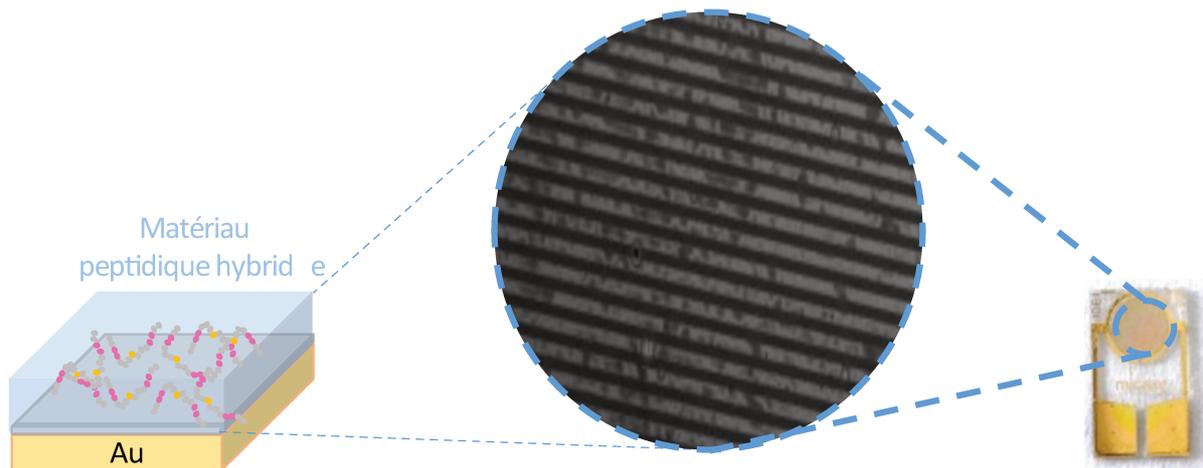


Figure 76. Image prise par microscopie à fluorescence du matériau peptidique hybride contenant le fluorochrome : **S6**.

L'échantillon **S6** a été soumis à l'action de la MMP-13 comme décrit précédemment en partie pour l'analyse EDX. L'échantillon digéré **S6-MMP** est obtenu après lavages puis analysé par microscopie à fluorescence comme le montre la Figure 77.

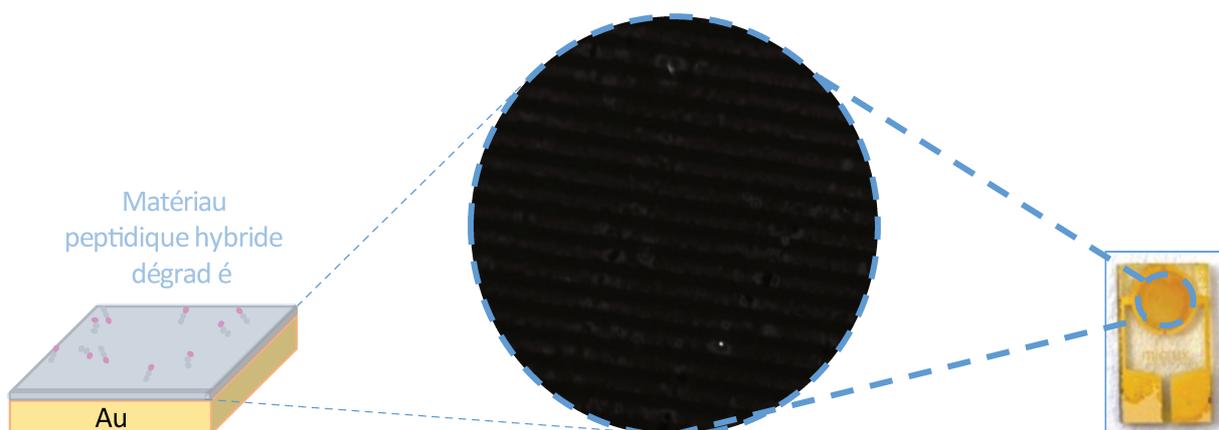


Figure 77. Image (centre) prise par microscopie à fluorescence du matériau peptidique hybride après l'activité enzymatique de la MMP-13 : **S6-MMP**.

D'abord, le clivage enzymatique peut être observé expérimentalement à l'œil nu. En effet, la portion de séquence peptidique possédant la fluorescéine est clivée et relarguée de la surface du matériau vers dans la solution ce qui colore en jaune vif la surface entière du support en or, comme le montre la photo à droite de la Figure 77.

Ensuite, l'image obtenue par microscopie à fluorescence montre de façon claire la diminution de l'intensité de fluorescence sur les bandes d'or par rapport à la Figure 76, rendant une image presque noire. En effet, les images ont été analysées aux mêmes endroits et il en résulte une diminution de 35% de la fluorescence. Ce résultat a été obtenu après intégration des pics de fluorescence sur logiciel Image J. Quinze zones ont été choisies et les valeurs de fluorescence ont été relevées pour chaque échantillon et la moyenne a été déterminée. Les données ne sont pas présentées dans ce manuscrit.

Une fois encore, nous avons pu montrer l'impact de l'activité enzymatique de la MMP-13 sur un matériau peptidique hybride greffé sur des électrodes en or.

Les analyses précédentes de MEB-EDX ou de microscopie fluorescence, bien que très informatives, ne nous ont pas permis de quantifier la densité de la couche de matériau peptidique hybride greffée sur le support en or.

Afin d'aller plus loin dans notre caractérisation de ces substrats, nous avons utilisé la spectroscopie photoélectronique par rayons X (XPS, X-Ray Photoelectron Spectroscopy) pour quantifier l'évolution du matériau peptidique (i) greffé sur l'électrode en or, (ii) après les lavages et (iii) après digestion par la MMP-13.

2.3. XPS

L'analyse par XPS permet d'analyser la surface de l'échantillon par irradiation de rayons X monochromatiques, entraînant l'émission de photoélectrons dont les énergies sont caractéristiques des éléments qui se trouvent au niveau du volume d'échantillonnage.

L'appareil fonctionne sous vide, dans une atmosphère oxydante et réductrice. C'est une analyse élémentaire non destructive, permettant de déterminer les environnements chimiques sur la surface d'un matériau sur une profondeur de 12 nm.

L'avantage d'une telle technique, c'est qu'elle permet à la fois de donner des informations sur la nature des liaisons chimiques à la surface de l'échantillon, mais aussi qu'elle peut être semi-quantitative.

On part de l'hypothèse que l'on possède un film homogène de matériau hybride peptidique sur la surface en or. Le principe consiste à regarder l'atténuation des électrons du substrat à travers la couche organique du film, ainsi que l'atténuation des électrons d'un élément de ce peptide à travers le peptide lui-même.

L'épaisseur de la couche (d) a été estimée à partir du rapport d'intensité N1s (spectre XPS de l'azote) sur Si2p (spectre XPS du silicium) en utilisant l'Équation 7.

Le nombre 11 correspond au nombre d'atomes d'azote (N) dans le peptide. d est l'épaisseur recherchée. θ est l'angle de collection (90°) des électrons par rapport au substrat. λ_y^x correspond au libre parcours moyen des électrons x dans la matrice y. Les λ ont été calculés avec le logiciel Quases, basé sur la formule TPP-2M.¹⁷⁵ TN1s et TSi2p sont les facteurs de sensibilité relative de N et Si respectivement, fournis par le fabricant du spectromètre. M_{pep} et M_{Si} correspondent respectivement aux poids moléculaires du peptide et du silicium.

$$\frac{I_{N1s}}{I_{Si2p}} = \frac{11 \rho_{Pep} \times M_{Si} \times \sigma_{N1s} \times T_{N1s} \times \lambda_{N1s}^{Pep} \left(1 - \exp\left(-\frac{d}{\lambda_{N1s}^{Pep} \times \sin\theta}\right) \right)}{\rho_{Si} \times M_{Pep} \times \sigma_{Si2p} \times T_{Si2p} \times \lambda_{Si2p}^{Si} \times \exp\left(-\frac{d}{\lambda_{Si2p}^{Pep} \times \sin\theta}\right)}$$

Équation 7. Calcul de l'épaisseur de la couche peptidique hybride.

Le nombre de peptides par cm^2 peut être estimé en utilisant l'Équation 8, où N_A correspond au nombre d'Avogadro.

$$n_{pep}(\text{molécules. cm}^{-2}) = \frac{\rho_{Pep} \times d \times N_A}{M_{Pep}}$$

Équation 8. Calcul du nombre de peptide par cm^2 .

La XPS a été utilisée pour étudier les différentes étapes de notre processus, allant de la fonctionnalisation de l'or, au greffage du matériau peptidique hybride puis de l'effet de l'enzyme sur ce dernier.

Nous avons réalisé dans un premier temps, la fonctionnalisation des électrodes en or (**S0**) par le MPTMS pour obtenir la couche de **S-MPTMS**.

Ensuite, nous avons souhaité greffer le peptide hybride **1** possédant une seule fonction $SiMe_2(OH)$ (Chapitre 2 Partie 2.2. Design des peptides hybrides). Le matériau **S1** a été obtenu. Ce type de peptide ne permet que la formation d'un monocouche puisqu'une seule liaison Si-O-Si peut être formée. Le greffage a été réalisé par dip-coating ou par casting et les électrodes obtenues ont été immergées dans le tampon T pendant 48h afin de vérifier la stabilité de la couche.

Les énergies de liaisons de l'azote, N1s, ont montré une diminution de presque 70%, par rapport au même échantillon non rincé, ce qui indique que beaucoup de peptides hybrides déposés ne se sont pas greffés de manière covalente à la surface.

Ces résultats ne sont pas présentés dans le manuscrit.

Afin d'augmenter significativement la densité de peptide hybride, nous avons souhaité obtenir une multicouche et pour cela nous avons utilisé le peptide bifonctionnel trialkoxysilane **4**, (Chapitre 2 Partie 2.2. Design des peptides hybrides) capable de donner 3 liaisons Si-O-Si de chaque côté (C-terminal et N-terminal) (peptide hybride) afin de créer un réseau plus dense et donc un matériau plus résistant dont la dégradation entrainera sans doute des modifications de signal plus importantes qu'une simple monocouche.

Comme précédemment, après synthèse de la couche hybride de peptide par casting, l'échantillon **S4** a été plongé dans le tampon biologique **T** pendant 48h (**S4-Lav**).

Les pourcentages atomiques obtenus sur les différentes électrodes d'or à toutes les étapes du processus de fonctionnalisation, de lavage et de digestion sont rapportés dans le Tableau 11 ci-dessous. Les signaux C1s, O1s, N1s, S2p, Si2p, Fe2p et Au4f correspondent aux niveaux d'énergie de liaison atomique du carbone, de l'oxygène, de l'azote, du soufre, du silicium, du fer et de l'or respectivement.

Référence	C1s	O1s	N1s	S2p	Si2p	Fe2p	Au4f
<i>S-0</i>	71.6	20.8	1.25	--	--	--	6.35
<i>S-MPTMS</i>	80.5	13.3	0.6	0.7	2.8	--	2.1
<i>S4</i>	78.9	12.0	6.0	1.1	1.6	0.4	N/D
<i>S4-Lav</i>	80.3	11.6	5.1	1.0	1.6	0.35	0.05
<i>S4-MMP</i>	71.3	13.6	7.9	0.6	6.0	0.35	0.25

Tableau 11. Données répertoriant les pourcentages atomiques obtenus par XPS pour toutes les étapes du processus.

Électrode en or non fonctionnalisée.

La surface de l'échantillon de référence **S0** montre la présence d'une contamination organique carbonée, indiqué dans le Tableau 11, avec une forte présence de carbone et d'oxygène, et une faible présence d'azote. L'or, servant de ligne de contrôle, est aussi présent sur cet échantillon.

Greffage du 3-Mercaptopropyltriméthoxysilane (MPTMS).

Le succès du greffage du MPTMS (**S-MPTMS**) est attesté par les données XPS avec plusieurs indicateurs. Tout d'abord, on peut voir dans le Tableau 11, que les pourcentages atomiques élémentaires du carbone, du soufre et du silicium liés au MPTMS augmentent (signal C1s) et apparaissent pour S2p et Si2p. Les pourcentages d'oxygène et d'azote diminuent, ce qui suggère que la contamination a été réduite à la suite du greffage du MPTMS. Enfin, le signal Au4f diminue de plus de 65% (Figure 78-Au). Ces résultats corroborent la présence d'une couche organique sur l'électrode en or.

Le Tableau 11 montrent clairement la présence d'une couche organique sur l'électrode en or. En utilisant le signal Au4f atténué, on est capable de calculer l'épaisseur de la couche organique équivalente à environ 2.7 nm, ce qui indique que plusieurs couches de MPTMS ont été greffées à la surface de l'or. Notons qu'une monocouche de MPTMS a une épaisseur équivalente de 0.7 nm.¹⁷⁴

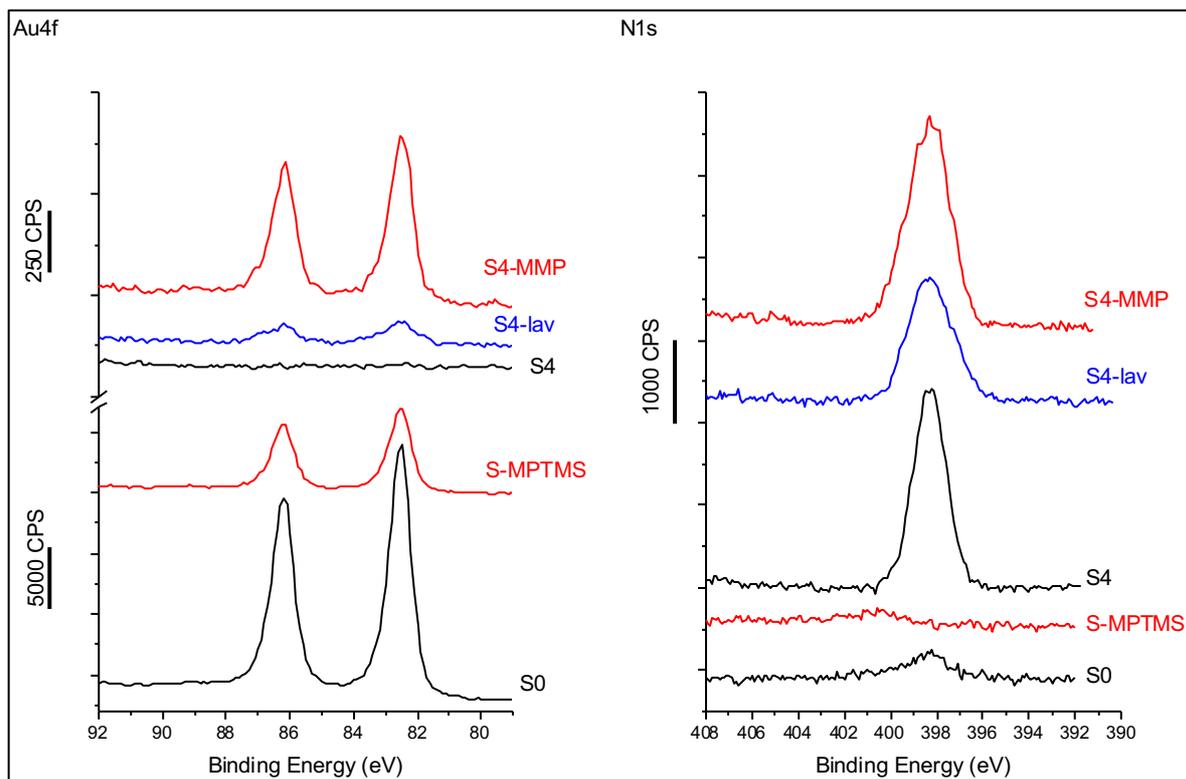


Figure 78. Énergies de liaisons atomiques de Au4f et de N1s pour les différentes étapes du processus d'étude du matériau sur l'or.

Greffage du peptide hybride 4.

Le greffage du peptide hybride **4** a pu être démontré par XPS (Figure 78 et Figure 79).

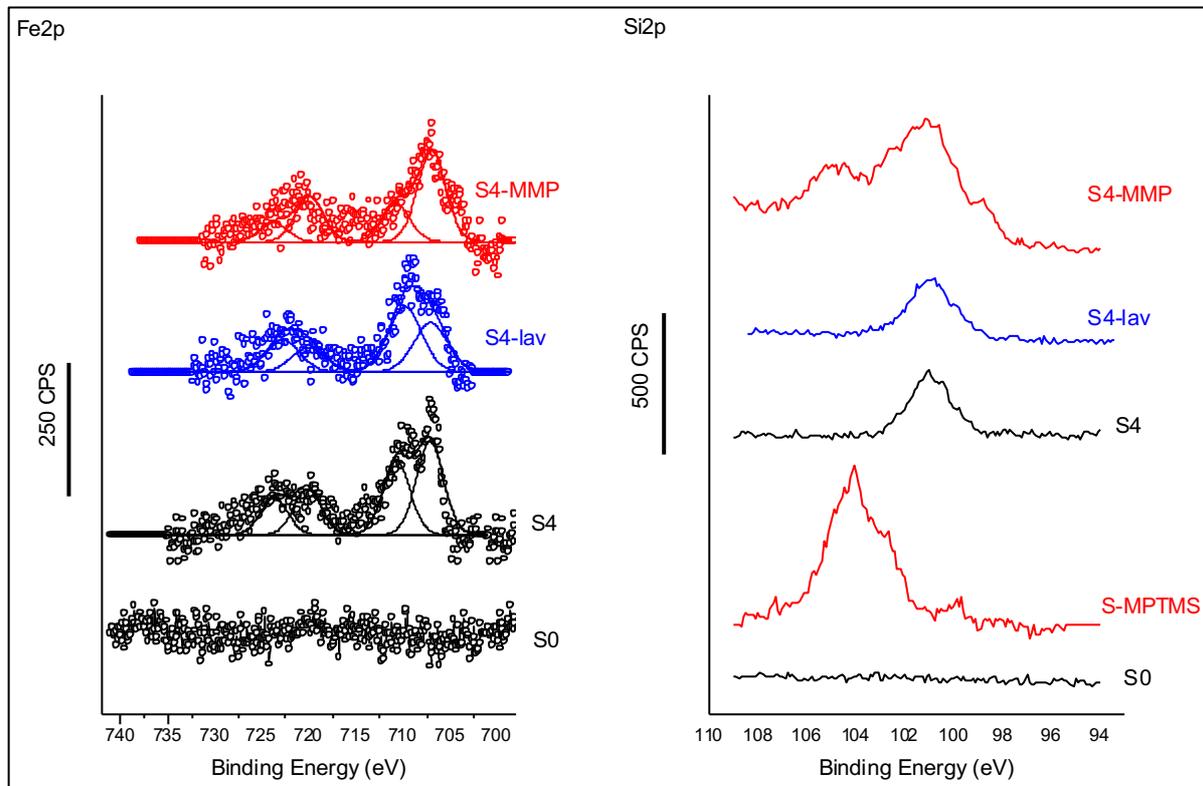


Figure 79. Énergies de liaisons atomiques de Fe2p et de Si2p pour les différentes étapes du processus d'étude du matériau sur l'or.

Tout d'abord, le signal de l'azote N1s (Figure 78-N1s) a augmenté jusqu'à 6% à cause de la présence de 27 liaisons amides dans le peptide hybride **4**. De même, on observe l'apparition d'un signal Fe2p, représenté sur la Figure 79-Fe, ce qui est sans doute induit par la présence du ferrocène contenu dans la séquence du peptide hybride **4**. Ensuite, deux observations peuvent être faites au sujet du signal Si2p : d'une part, son pourcentage atomique diminue de 2.8% à 1.6% car le silicium est majoritairement situé à l'interface entre la couche d'ancrage (MPTMS) et le biomatériau et, d'autre part, on observe un déplacement des valeurs d'énergie de liaison du silane libre pour **S-MPTMS** de 104 eV, au silane lié à 101 eV pour le matériau, sur la Figure 79-Si. Enfin, on peut noter la disparition complète du signal Au4f, sur la Figure 78-Au, suggérant une épaisseur équivalente supérieure à 12 nm (la profondeur accessible à l'analyse XPS).

Ces résultats nous permettent de conclure à la réussite du greffage du peptide hybride **4** sur la couche d'ancrage MPTMS. De plus, à partir des données XPS, la densité relative du peptide a été estimée à 1.4 peptides/nm² (sur une profondeur de 12 nm), suggérant un recouvrement

complet de la surface par le matériau, compte tenu de sa taille et de sa composition (Chapitre 2 Partie 2.2. Design des peptides hybrides).

Lavage de l'échantillon S4 : S4-Lav.

Après plusieurs étapes de lavage (jusqu'à 48h) du peptide hybride **4** greffé sur l'électrode d'or (**S4-Lav**), seules de petites variations peuvent être observées sur les pourcentages atomiques du Tableau 11. Une petite diminution de la quantité d'azote (6.0% à 5.1%) est observée ainsi que la réapparition d'un très petit signal pour la contribution Au4f. On peut donc supposer que seule une quantité mineure de peptides greffés de manière non covalente a été lavée de la surface au contraire de ce qui avait été observé avec le peptide hybride monofonctionnel de type diméthylsilanol **1**.

La densité relative de peptides a été calculée à 1.3 peptides/nm² (sur une profondeur de 12 nm) confirmant la robustesse du greffage sur la surface d'or.

Activité enzymatique de la MMP-13.

Après avoir été en contact avec la MMP-13 pendant 24 heures, la composition de la couche greffée de l'échantillon **S4-MMP** change qualitativement et quantitativement.

Tout d'abord, d'après le Tableau 11, la composition atomique de **S4-MMP** montre une augmentation des signaux N1s, Au4f et Si2p et la diminution des signaux C1s et S2p en comparaison avec **S4**. L'augmentation du signal Au4f (Figure 78-Au) indique que de la matière organique a été perdue puisque l'on voit à nouveau apparaître le signal de l'or. Cela est également confirmé par l'augmentation du signal Si2p et aussi par la forme du spectre Si2p, montrant désormais les mêmes proportions du silane libre et du silane lié, Figure 79-Si.

Ces points démontrent clairement que la MMP-13 coupe les liaisons attendues de la séquence du peptide hybride **4**, entre la glycine et la méthionine, libérant ainsi certains fragments d'acides aminés du matériau. La densité relative des peptides à la surface analysée donne une valeur de 0.6 peptide/nm². Cette méthode d'analyse nous a permis de déterminer la densité des peptides greffés sur la surface métallique en or, détaillée dans le Tableau 12 ci-dessous :

<i>Échantillon</i>	Densité
<i>S4</i>	1.4 peptides/nm ²
<i>S4-Lav</i>	1.3 peptides/nm ²
<i>S4-MMP</i>	0.6 peptide/nm ²

Tableau 12. Liste des densités de peptides greffés sur une surface métallique en or.

Si l'on considère que seulement 12 nm ont été analysés et que la couche fait 300 nm, on pourrait remonter à la densité de peptide par nm^2 calculée si l'on connaissait l'épaisseur totale.

Nous avons complété nos analyses XPS par AFM. En effet, comme vu précédemment, l'XPS ne peut donner d'information au-delà d'une épaisseur de 12 nm. Afin de confirmer nos calculs théoriques de nombre de peptides par unité de surface ($301 \text{ peptides/nm}^2$, cf. Partie 1.2.4. Fonctionnalisation par casting), il nous a semblé intéressant d'essayer de mesurer l'épaisseur de la couche de peptide.

2.4. AFM

La microscopie en champ proche permet d'obtenir une résolution à l'échelle sub-longueur d'onde grâce à une sonde locale de haute résolution qui détecte un signal confiné au voisinage immédiat de la surface de l'échantillon. Cette technique d'analyse pourra sûrement nous permettre de mesurer l'épaisseur du matériau peptidique hybride.

L'appareil utilisé pour faire l'acquisition de ces images est l'AFM Dimension 3100 (nanoman avec close-loop) piloté par un Nanoscope V (Bruker Instruments). Les images topographiques ont été réalisées en mode Tapping (c), avec des point-probe-plus (Nanosensors) NCL (rayon de l'apex de la pointe entre 2 et 5 nm) et une raideur du levier autour de 20 à 40 N.m^{-1} . Ce mode Tapping consiste à faire vibrer le levier à sa fréquence propre de résonance avec une certaine amplitude. Quand la pointe interagit avec la surface de l'échantillon, l'amplitude diminue car la fréquence de résonance change. Cette sonde va ainsi balayer la surface de l'échantillon à une distance de quelques nanomètres.

Le système dimension va permettre d'imager la surface de l'échantillon positionné sur une platine de déplacement motorisée.

Le contrôle de l'amplitude de vibration du levier (système optique, faisceau laser 650-695nm 1mW réfléchi par le levier au niveau de la pointe et récupéré sur photodiode 4 quadrants) est maintenu constant au cours du balayage du piézoélectrique. Ceci est dû à la boucle de régulation qui permet de suivre les variations de hauteur de la surface du matériau.

Une illustration de ce dispositif est représentée sur la Figure 80.

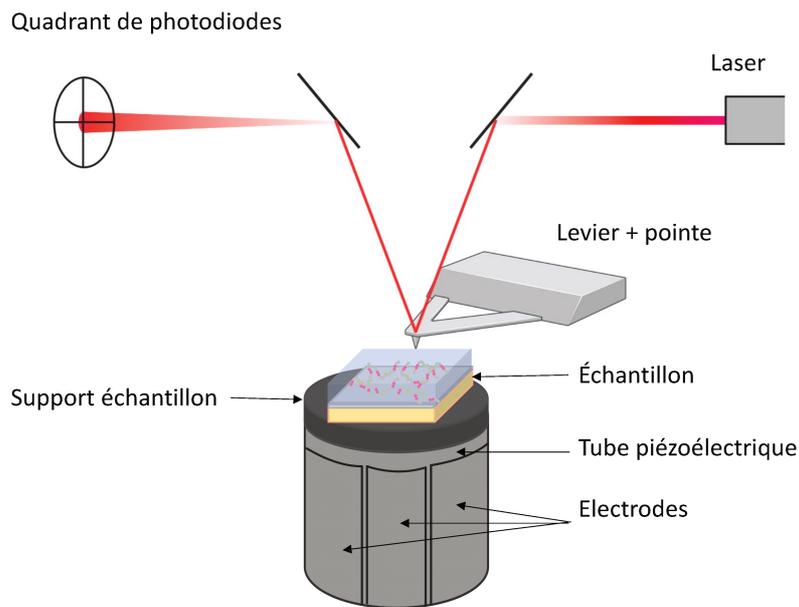


Figure 80. Illustration de l'analyse par AFM de l'échantillon Au-Fe. Créé à partir de Biorender.com.

Il est à noter qu'à chaque fois, les analyses ont été effectuées au même endroit pour chaque échantillon pour contrôler la répétabilité des résultats et l'homogénéité de la surface analysée.

L'analyse a d'abord été effectuée sur l'échantillon **S0** pour servir de référence pour les autres acquisitions. La Figure 81 montre l'analyse de la bande d'électrode en or. On constate que la surface est très rugueuse. C'est un indicateur important puisque lorsque le matériau peptidique hybride sera greffé sur l'or par l'intermédiaire du MPTMS la rugosité de surface sera considérablement modifiée.

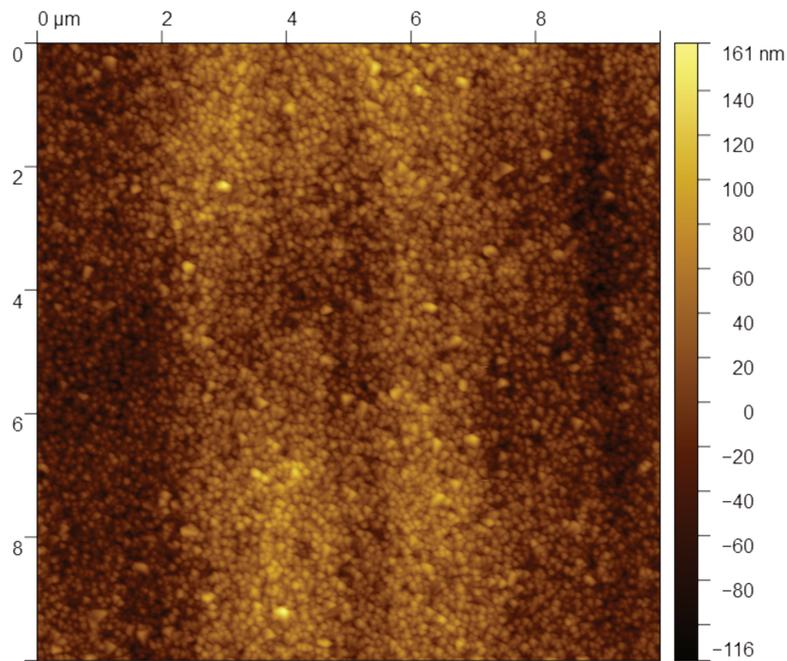


Figure 81. Image obtenue par AFM (topographie) de l'échantillon **S0**.

L'analyse AFM de l'échantillon **S4** est présentée en Figure 82. Comme attendu, la surface de l'échantillon est en effet bien moins rugueuse que sur la Figure 81, pouvant indiquer qu'une couche de matériau peptidique recouvre l'or.

De façon intéressante, on peut remarquer un amas plus épais (forme ombrée à droite de la Figure 82) correspondant probablement à une condensation du matériau peptidique hybride plus importante au niveau de la zone de casting. Ceci suggère que la méthode de casting entrainerait des disparités dans l'échantillon, par effets de bords et de capillarité.

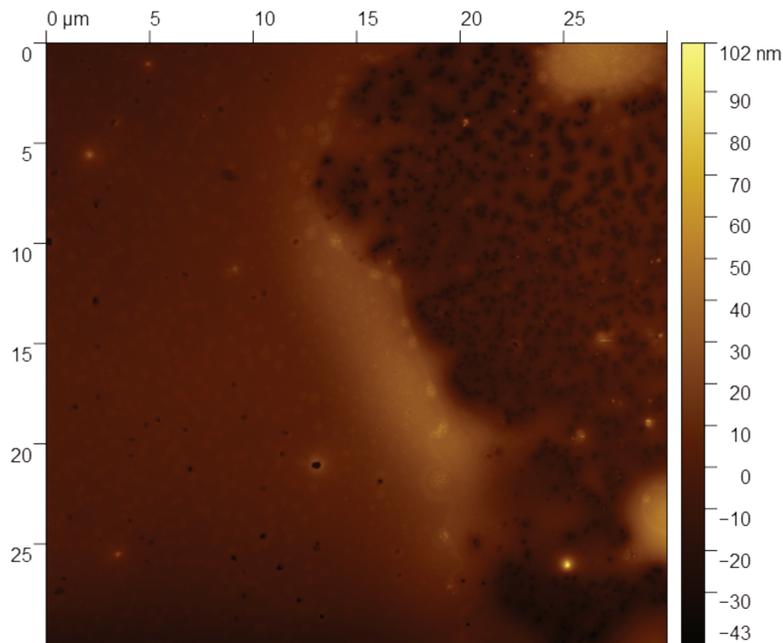


Figure 82. Image obtenue par AFM (topographie) de l'échantillon **S4**.

L'alternance des bandes d'or et de verre rend difficile la détermination de l'épaisseur du matériau greffé sur l'or.

Nous avons donc travaillé sur une surface d'or plane pour estimer l'épaisseur du matériau hybride peptidique qui pourrait s'y former. Pour ce faire, une couche d'or de 100 nm d'épaisseur a été déposée sur un substrat de silicium, créant une « marche » (Figure 83A) de 100 nm entre la surface greffée et la surface non greffée.

Après fonctionnalisation avec le MPTMS, le peptide hybride **4** a été polymérisé sur la surface d'or (Figure 83A) par le même protocole qu'utilisé précédemment, par casting, pour obtenir une couche de matériau peptidique hybride.

L'échantillon ainsi greffé a été analysé par AFM. Comme attendu, même après plusieurs lavages dans le tampon T pendant 48h, la couche de matériau peptidique hybride ne varie pas (Figure 83B).

Le profil 1 est établi et correspond à la « marche » entre l'or avec le peptide greffé à sa surface et le silicium non modifié. Il a été utilisé pour déterminer l'épaisseur du matériau greffé sur l'or au niveau de cette « marche » (définie sur la Figure 83A) pour créer une ligne de base.

Sur la Figure 83C, en soustrayant 0.1 μm , on obtient une épaisseur de matériau de 0.3 μm (300 nm).

L'image tridimensionnelle, Figure 83D, permet de mettre en évidence la « marche » entre le silicium et l'or et le matériau greffé sur l'or.

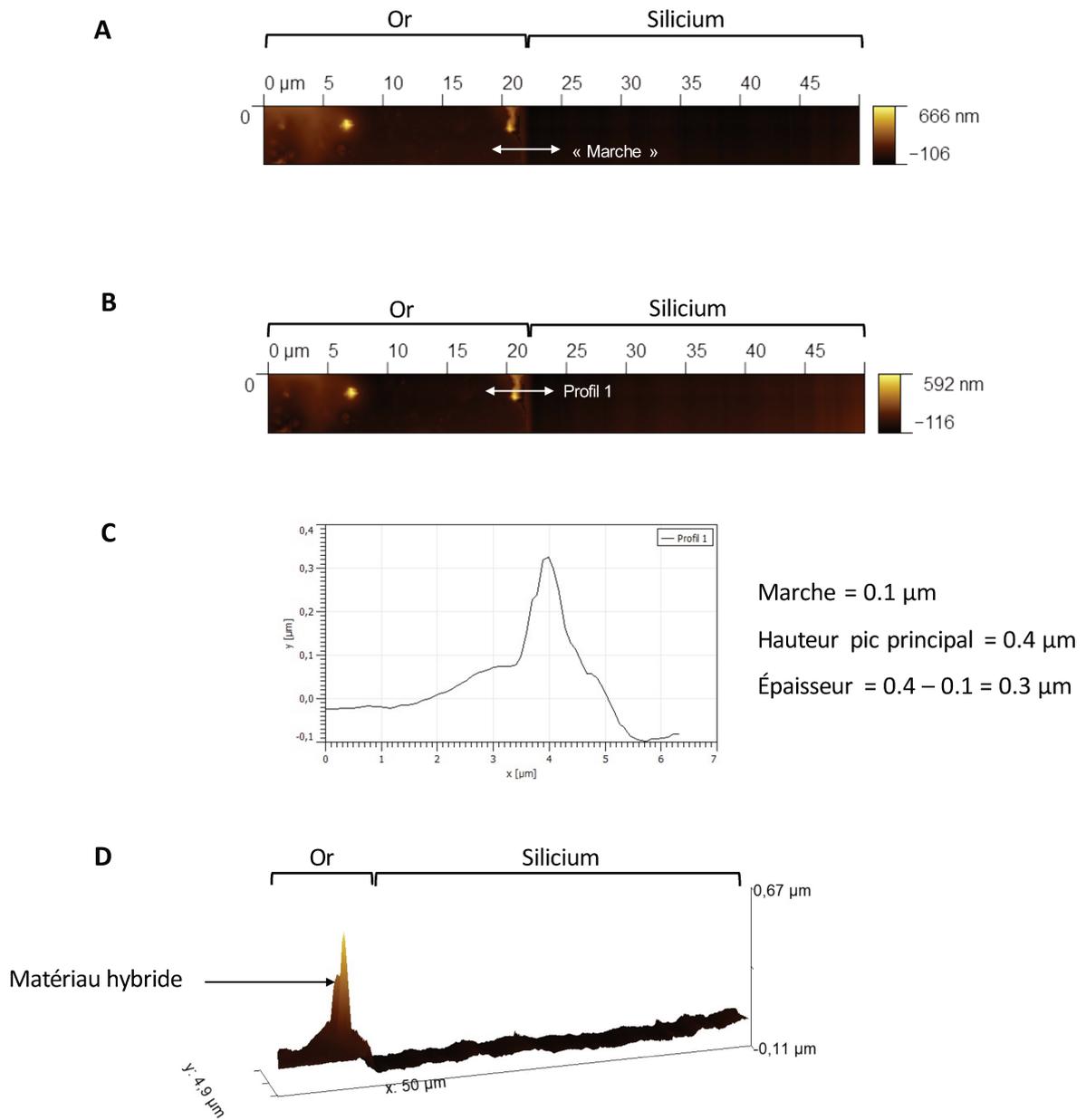


Figure 83. Détermination de l'épaisseur du matériau S4 par AFM. A correspond à la marche obtenue entre le silicium et l'or. B correspond au matériau peptidique hybride représenté par le profil 1. C correspond à l'épaisseur du profil 1. D correspond à l'image tridimensionnelle du matériau peptidique hybride greffé sur l'or.

Cette estimation de l'épaisseur de la couche de peptide nous permet d'avoir une idée de la quantité totale de peptide. En effet, l'analyse par XPS nous a permis de quantifier la densité de peptides sur une épaisseur de 12 nm (profondeur analysable par XPS). Une valeur de 1.4 peptide/nm² a été obtenue. Si l'on considère que seul 12/300^e soit 4% de la couche peptidique hybride a été analysée par XPS, et que nous pouvons extrapoler cette densité par nm² à toute l'épaisseur, on obtient une densité totale de 420 peptides/nm² qui est du même ordre que la valeur théorique de 301 peptides/nm².

Après avoir déterminé la densité totale de peptides hybrides greffés sur la surface plane, il a fallu déterminer l'action de la MMP-13 sur le capteur IDE en or. L'analyse AFM de l'échantillon **S4-MMP** après l'action de l'activité enzymatique de la MMP-13 sont présentés sur la Figure 84. On constate une diminution de la densité de matériau greffé sur l'or.

Par ailleurs, sur la Figure 84, on constate que (i) les surfaces plus foncées correspondent au matériau peptidique hybride, (ii) les « points » jaunes qui apparaissent partout sembleraient correspondre à la surface de l'électrode, ce qui suggère ici que la MMP-13 a digéré le matériau jusqu'à l'électrode, confirmant notamment les résultats obtenus précédemment. Par ailleurs, en mesurant l'état de surface au niveau des « points » jaunes on retrouve la même rugosité que sur la Figure 81 concernant l'échantillon **S0**.

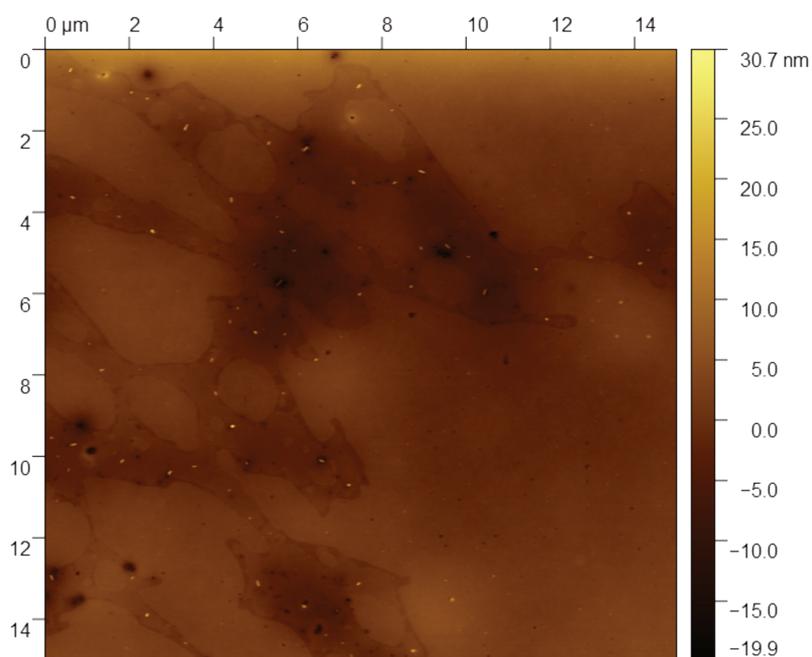


Figure 84. Image obtenue par AFM (topographie) de l'échantillon **S4-MMP**.

Les différentes méthodes de caractérisation physicochimiques du matériau peptidique hybride concordent. Nous avons pu montrer (i) la fonctionnalisation de l'or par le MPTMS, (ii) le greffage d'un matériau peptidique hybride d'environ 300 nm d'épaisseur, (iii) la stabilité de cette couche au cours des lavages et (iv) l'action de la MMP-13 sur cette couche conduisant à sa dégradation jusqu'au niveau de l'électrode en or.

Il nous reste maintenant à apprécier ces mêmes évolutions en mesurant l'impédance. Ces études présentées dans le Chapitre 4. Étude par mesure d'impédance du capteur modifié avec le matériau peptidique hybride.

Partie 3. Caractérisation de surface métallique en Al_2O_3 fonctionnalisée par des peptides hybrides

Cette partie constitue une première approche de la réalisation d'un capteur en Al_2O_3 poreux.

L'avantage majeur d'un tel système, comme vu précédemment, est qu'il peut être réalisé à bas coût, au sein du laboratoire de l'IES. Un autre avantage est la structure de ce capteur. Possédant de nombreux pores, ce support permettra le greffage du matériau peptidique hybride à la fois à la surface et aussi dans les pores, et pourra ainsi augmenter considérablement la sensibilité du capteur. De plus, cette structure en Al_2O_3 pourra être intégrée directement au niveau de l'étiquette RFID de type passive du futur système qui sera développé au sein de l'équipe RFEF de l'IES.

3.1. MEB

Un MEB à émission de champ (FEG-Field Emission Gun, Hitachi S4800) a été utilisé pour caractériser les échantillons. Il permet d'améliorer considérablement la brillance d'un facteur 100 à 1000 a été utilisé dans le but de visualiser les peptides greffés sur surface d' Al_2O_3 . Le principe consiste à appliquer un champ électrique très intense en pointe de cathode pour extraire ou amplifier l'extraction des électrons. Cela permet d'obtenir des images avec un agrandissement de 800 000 fois avec une résolution de 0.1 nm.

Nous avons d'abord analysé la surface d'oxyde d'aluminium poreux non greffée avant et après lavage dans le tampon T (Figure 85A et Figure 85B respectivement). La surface d' Al_2O_3 analysée correspond à 0.3 x 0.8 cm.

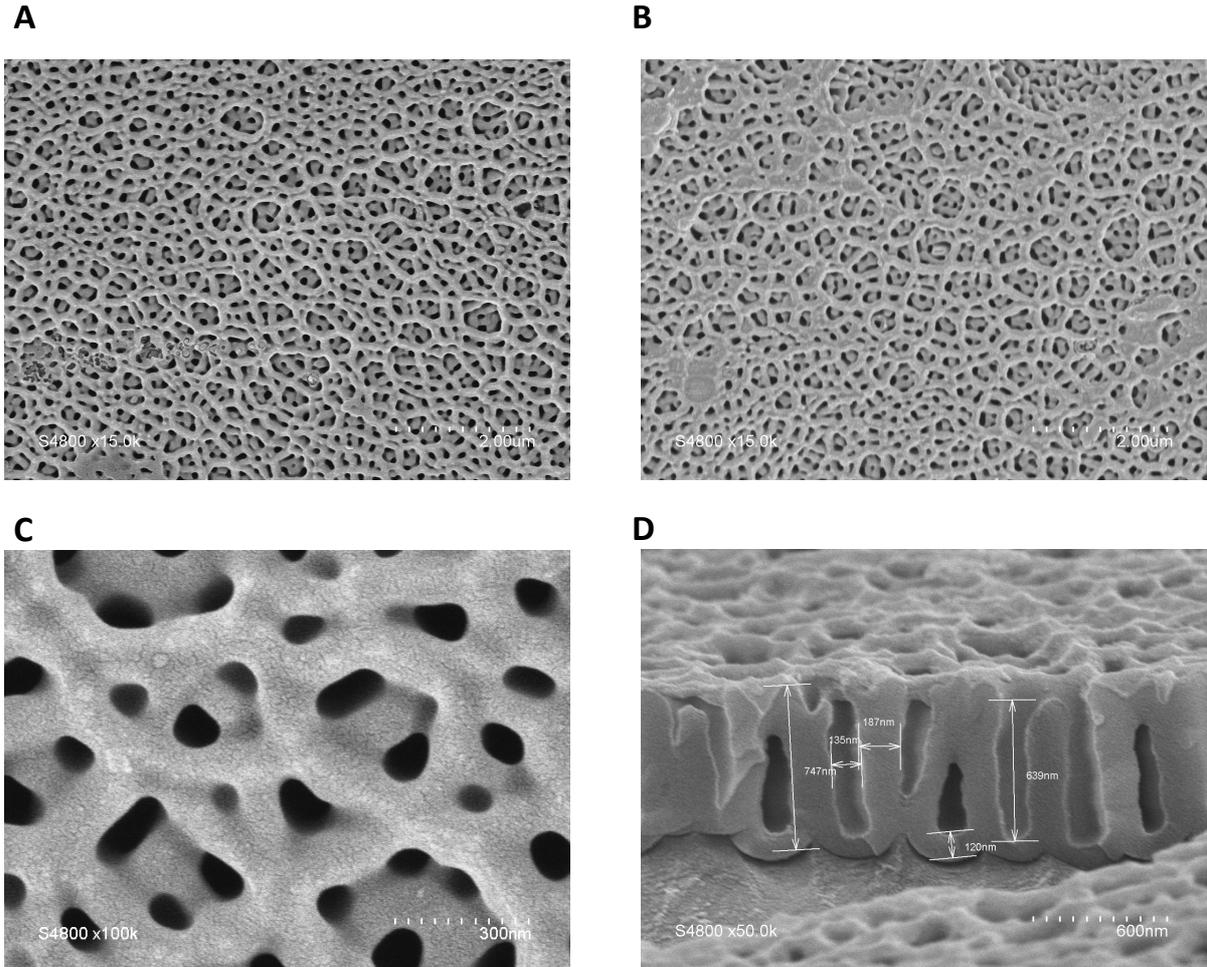


Figure 85. Contrôle par MEB de l'état de surface de l' Al_2O_3 .

Les images de la surface non traitée permettent de se rendre compte de la porosité de ce support (Figure 85C). En effet, la Figure 85D permet de mesurer les pores présents au sein de l'échantillon, d'une longueur de 639 nm et d'une largeur de 135 nm. Ceci nous permet aussi de constater une certaine hétérogénéité de la surface de l' Al_2O_3 .

La Figure 85A correspond la surface en Al_2O_3 sans modification n'ait été apportée. L'image de la Figure 85B correspond à ce même support une fois qu'il a été lavé durant 48h dans le tampon T, puis rincé dans de l'eau MilliQ® et séché sous flux d'azote. On constate que le lavage avec le tampon T n'a aucune incidence sur le support en Al_2O_3 . Ceci nous permet dans un premier temps de vérifier que le support est stable dans le tampon biologique.

Nous avons ensuite examiné par MEB la surface de l'échantillon **S4** obtenu avec le précurseur hybride **4** bis-silylé possédant un groupement ferrocène (Figure 86).

On observe de nombreux grains de 0.7 μm qui pourraient correspondre au matériau peptidique.

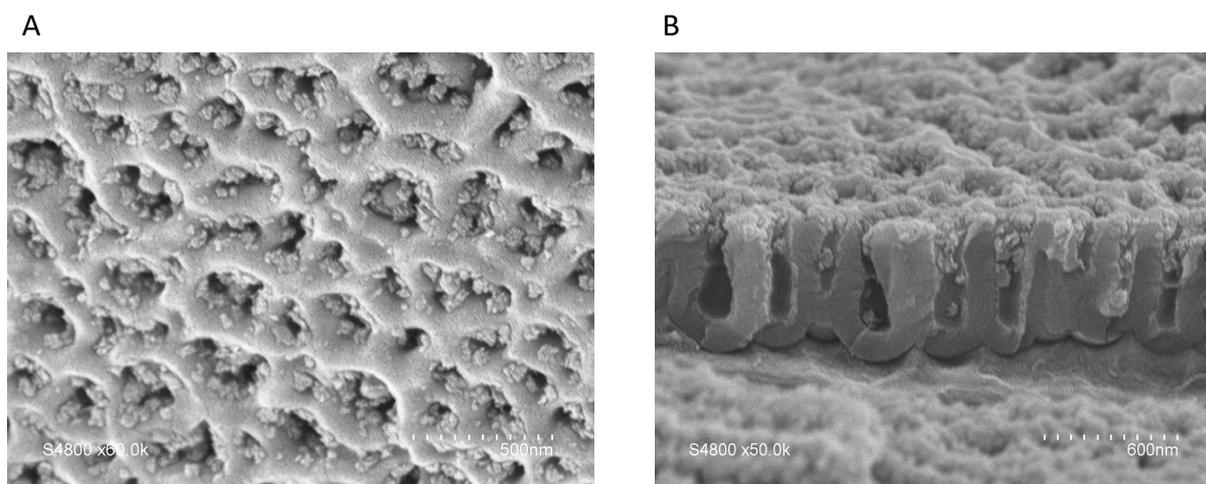


Figure 86. Greffage du matériau peptidique sur l' Al_2O_3 .

Afin de vérifier la stabilité de ce matériau, le support a été plongé dans le tampon T pendant 48h ou 72h pour obtenir les échantillons **S4-lav** et **S4-lav 72h**. Les échantillons sont ensuite rincés plusieurs fois dans de l'eau MilliQ® et séchés sous flux d'azote.

3.2. XPS

Les supports **S0**, **S0-lav**, **S4**, **S4-lav** et **S4-lav 72h** ont été analysés par XPS.

Sur les supports non greffés, on constate comme attendu la présence d'aluminium à environ 25%, d'oxygène à 45.27% mais pas de soufre ni d'azote. Le carbone vient d'une contamination organique carbonée comme observée pour les capteurs d'or (partie 2.1. MEB-EDX).

L'analyse XPS de **S4** confirme la présence du matériau peptidique hybride grâce à la présence de 61.45% de carbone et 14.44% d'azote (comparés à **S0**, de 24.26% de carbone et la non-détection d'azote) mais également à la présence de 3.66% de silicium. Un nombre de 4.3 peptides/ nm^2 greffés a été déterminé sur la surface d' Al_2O_3 , par la même méthode expliquée plus haut dans ce chapitre, dans la partie 2.3. XPS.

Les différents lavages dans le tampon T après 48h ou 72h, puis rinçages dans l'eau MilliQ® et séchages sous flux d'azote, montrent une diminution de l'énergie de liaison de N1s 28% et 69% respectivement. La diminution d'environ 30% de C1s et de N1s suggèrent ici une perte du matériau peptidique hybride sur le support en Al_2O_3 . De plus, l'augmentation de O1s et de Al2p indique que le matériau peptidique hybride est enlevé de la surface puisqu'on atteint des valeurs similaires à celles analysées de l'échantillon **S0** ou encore de **S0-lav**. Enfin, il est constaté qu'au bout de 72h de lavage de l'échantillon dans le tampon biologique T, les

pourcentages des différentes énergies atomiques (C1s, O1s, Si2p, S2p, Al2p) reviennent à celles des échantillons **S0** / **S0-lav**.

Ceci nous montre que sur ce type de support, la couche peptidique hybride n'est pas suffisamment stable et que la liaison covalente Si-O-Al n'est donc pas stable sur l'Al₂O₃ pendant les différents lavages dans le tampon biologique T.

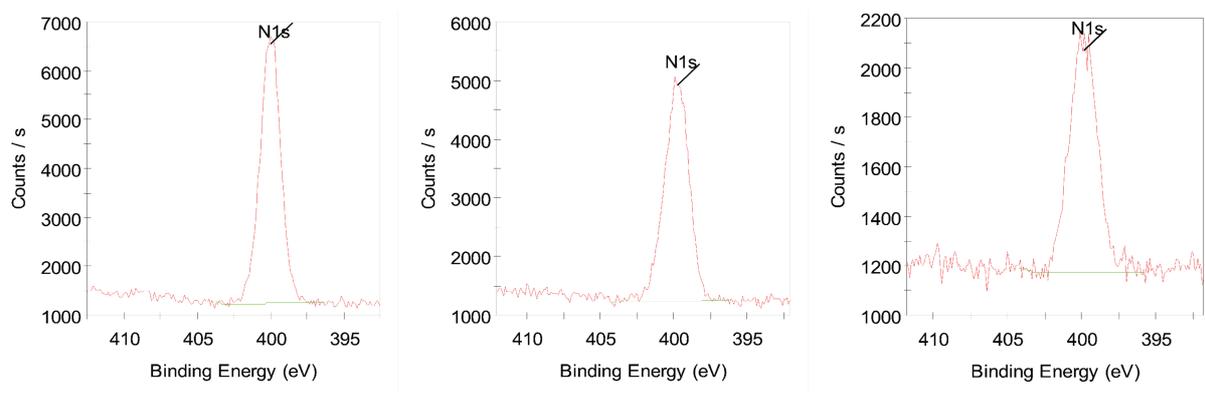


Figure 87. Énergies de liaison de l'atome d'azote N1s des échantillons S4, S4-lav et S4 lavé durant 72h.

Le Tableau 13 ci-dessous récapitule les différents pourcentages atomiques obtenus en fonction des énergies de liaisons analysées sur les différents échantillons.

Échantillon	C1s	O1s	Si2p	N1s	S2p	Al2p	P2p	N1s/Si2p
S0	24,26	45,27	2,05	ND	ND	24,98	3,45	ND
S0-lav	31,13	48,01	ND	ND	ND	18,82	1,05	ND
S4	61,45	19,10	3,66	14,44	1,36	ND	ND	3,94
S4-lav	42,04	29,28	2,35	9,67	0,75	12,28	3,04	4,11
S4-lav 72h	29,27	42,45	ND	2,53	ND	19,79	5,97	ND

Tableau 13. Pourcentages atomiques des énergies de liaison obtenues par XPS pour les échantillons en oxyde d'aluminium poreux.

Tous les échantillons en Al₂O₃ ont aussi été analysés par impédance et les résultats sont présentés dans le Chapitre 4. Étude par mesure d'impédance du capteur modifié avec le matériau peptidique hybride.

Chapitre 4 :

Étude par mesure d'impédance du
capteur modifié avec le matériau
peptidique hybride

Chapitre 4. Étude par mesure d'impédance du capteur modifié avec le matériau peptidique hybride

Dans le chapitre précédent, les matériaux hybrides contenant un groupement ferrocène ou un groupement fluorochrome (**S4** et **S6** respectivement) ont été caractérisés par différentes méthodes physicochimiques. Cela nous a permis de démontrer (i) le greffage covalent entre le capteur et le matériau, et sa stabilité en milieu aqueux (au moins dans le cas de la surface d'or), et (ii) la dégradation du matériau par la MMP-13, démontrant que les séquences conçues étaient reconnues et dégradées par cette enzyme.

Ce chapitre est entièrement dédié aux mesures par impédance réalisées sur ces matériaux. Aux côtés des matériaux **S4** et **S6**, deux autres matériaux ont été préparés comme contrôles négatifs. Le matériau **S7** a été obtenu avec le peptide hybride **7** qui ne possède pas de ferrocène. En effet, la lysine dont la chaîne latérale était couplée au ferrocène carboxylique a été remplacée par une norleucine possédant une simple chaîne alkyle linéaire.

Le matériau **S8** a été obtenu par polymérisation du peptide hybride **8** qui est l'analogue de **4** avec des aminoacides de configuration D, non reconnus par les enzymes. Il servira à contrôler la spécificité de l'activité enzymatique de la MMP-13 c'est-à-dire que cette enzyme ne dégrade pas n'importe quel matériau peptidique hybride.

La liste des matériaux caractérisés électriquement dans cette thèse sont regroupés dans le Tableau 14 ci-dessous.

Matériau	Fonctionnalisation	Peptide	Concentration	Lavage	MMP	Or	Al₂O₃
<i>S0</i>						✓	✓
<i>S-MPTMS</i>	MPTMS		1%			✓	
<i>S4</i>	MPTMS	4	10 mM			✓	✓
<i>S4-lav</i>	MPTMS	4	10 mM	48h		✓	✓
<i>S4-MMP</i>	MPTMS	4	10 mM		24h	✓	
<i>S6</i>	MPTMS	6	10 mM			✓	
<i>S6-lav</i>	MPTMS	6	10 mM	48h		✓	
<i>S6 MMP</i>	MPTMS	6	10 mM		24h	✓	
<i>S7</i>	MPTMS	7	10 mM			✓	

S7-lav	MPTMS	7	10 mM	48h		✓	
S7-MMP	MPTMS	7	10 mM		24h	✓	
S8	MPTMS	8	10 mM			✓	
S8-lav	MPTMS	8	10 mM	48h		✓	
S8-MMP	MPTMS	8	10 mM		24h	✓	

Tableau 14. Liste des matériaux caractérisés par mesure d'impédance électrique.

La première partie de ce chapitre justifie le choix du modèle électrique que nous avons utilisé et des propriétés électriques étudiées en fonction du type de capteur que nous aimerions mettre au point. La deuxième partie regroupe l'ensemble des résultats électriques obtenus sur le capteur modèle IDE en or. La dernière partie présente les résultats préliminaires obtenus avec le capteur en oxyde d'aluminium poreux dont la stabilité vis à vis du greffage doit être encore améliorée. Ce type de capteur pourrait être intégré en tant que capacité interdigitée au dispositif final RFID-Capteur, comme présenté sur la Figure 88 ci-dessous. À noter que la fréquence d'utilisation au sein du laboratoire de l'IES de ce dispositif RFID-Capteur est à 4 kHz.

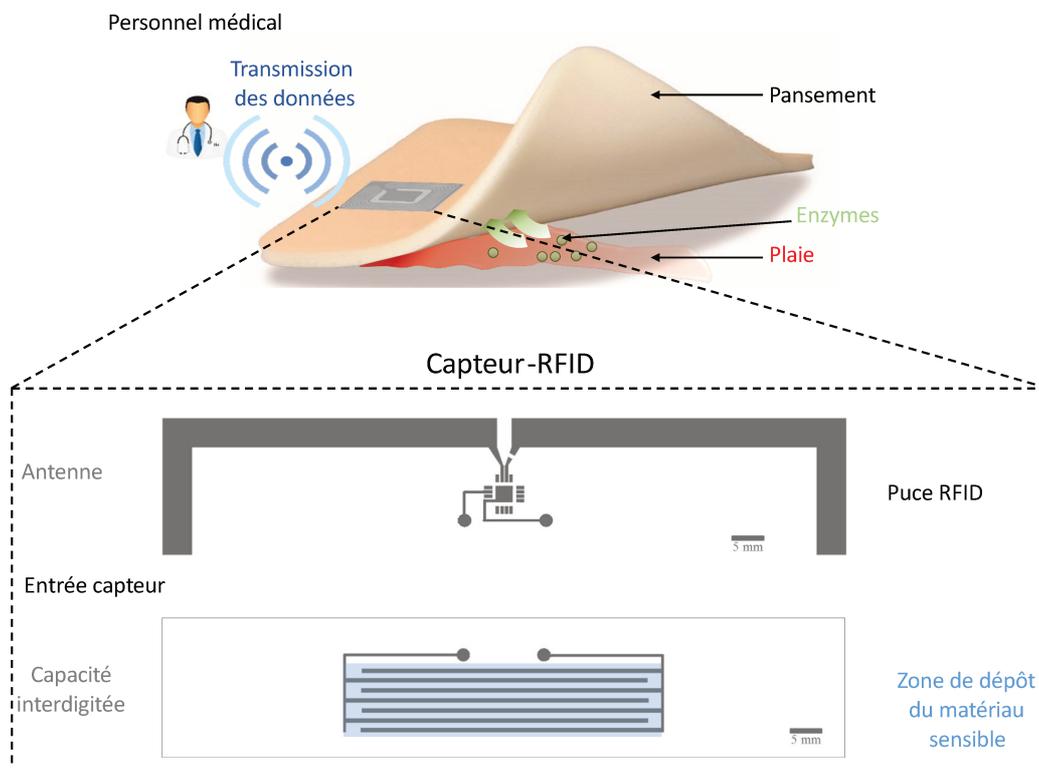


Figure 88. Schématisation du dispositif RFID-Capteur.

Partie 1. Généralités des mesures des propriétés électriques du capteur

1.1. Introduction au capteur

Un capteur est un dispositif qui permet de transformer l'état d'une grandeur physique d'entrée (mesurande) en une grandeur de sortie utilisable (réponse électrique).

La grandeur mesurable n'est pas convertible de façon directe en un signal électrique exploitable. L'élément sensible (de mesure) permet de convertir la grandeur mesurée en une grandeur intermédiaire qui peut être traduite en un signal électrique. C'est le transducteur, appelé capteur primaire, qui va assurer cette conversion. Il peut se comporter comme un générateur (on parle de capteur actif) ou comme une impédance (on parle alors de capteur passif). Pour cette étude, nous avons choisi l'impédance électrique (notée Z) qui correspond à son aptitude à s'opposer à l'écoulement des charges électriques qui le traverse. Sa définition sera expliquée dans la deuxième partie de ce chapitre.

Les dispositifs de capteurs électriques dépendent de l'évaluation des courants et/ou des tensions pour détecter la présence d'analyte.¹⁷⁶ Les changements des propriétés électriques comme la conductivité ou la permittivité agissent sur l'impédance. Elles agissent plus précisément sur la résistance et la capacité pour l'apparenter à l'évolution de la substance biologique ainsi mesurée. De tels exemples ont été montrés dans la partie 2.3.2.a. La flore bactérienne et 2.3.2.d. Les métalloprotéases matricielles (MMP) du Chapitre 1.

La modélisation de ce capteur peut conduire à proposer un modèle série ou parallèle. C'est ce dernier modèle (Figure 89) qui a été sélectionné dans ce travail de thèse.

C, représente la capacité, R représente la résistance, I le courant et U la tension appliquée.

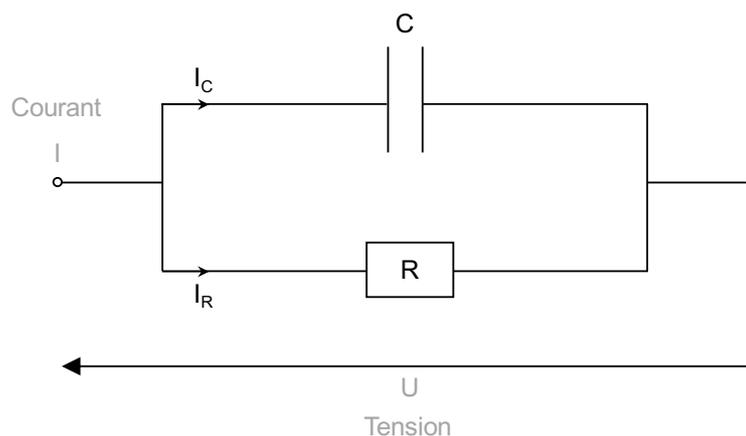


Figure 89. Modèle électrique parallèle type d'un capteur à électrodes interdigitées.

1.2. Notion d'impédance électrique

L'impédance électrique d'un matériau est définie par la loi d'Ohm entre le rapport de la tension mesurée (V) et le débit total de courant (I). En fonction de la nature du matériau, Z varie avec la fréquence (f) des mesures du signal électrique : Z diminue quand la fréquence augmente (Équation 9).

$$I = I_c + I_R \text{ et } I = \frac{U}{Z} = U \times \left(\frac{1}{Z_c} + \frac{1}{Z_R} \right)$$

$$\text{Avec, } Z_c = \frac{1}{j.C.\omega} \text{ et } \omega = 2.\pi.f \text{ et } Z_R = R$$

$$\text{Et, } Z = \frac{R}{1 + j.R.C.\omega} = \frac{R}{1 + R^2.C^2.\omega^2} - j \frac{R^2.C.\omega}{1 + R^2.C^2.\omega^2}$$

Équation 9. Formule générale de l'impédance électrique.

La résistance électrique, notée R et exprimée en Ohm (Ω), correspond à l'aptitude d'un matériau conducteur à s'opposer au passage du courant électrique sous une tension électrique donnée.

La capacité, notée C et exprimée en farad (F), représente la quantité de charges électriques stockée pour un potentiel électrique donnée. Elle est définie comme la somme des charges électriques Q (en coulomb) d'un matériau, divisée par le potentiel V (en volt) de ce matériau.

Le matériau peut être qualifié de diélectrique s'il a la capacité de stocker de l'énergie lorsqu'un champ électrique externe est appliqué. Si une source de tension continue (V) est placée aux bornes d'un condensateur à plaques parallèles (Figure 90), une plus grande quantité de charge est stockée lorsqu'un matériau diélectrique se trouve entre les plaques que si aucun matériau ne se trouve entre les plaques. Le matériau diélectrique augmente la capacité de stockage du condensateur en neutralisant les charges aux électrodes, qui contribueraient normalement au champ externe.

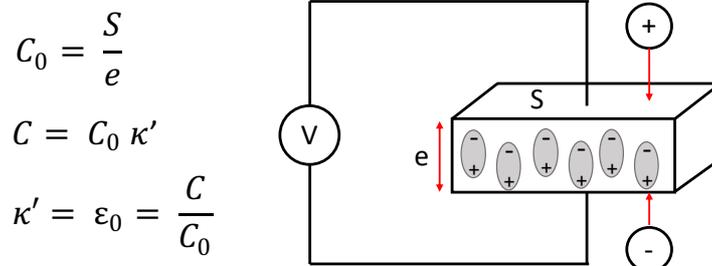


Figure 90. Condensateur à plaques parallèles, cas d'un courant continu.

C et C_0 (en F) sont les capacités avec et sans diélectrique, k' est la permittivité ($F \cdot m^{-1}$), et S (m^2) et e (m) correspondent à la surface des plaques du condensateur et la distance entre elles, respectivement (Figure 90). Le matériau diélectrique augmente la capacité de stockage du condensateur en neutralisant les charges aux électrodes, qui contribueraient normalement au champ externe. La capacité du matériau diélectrique est liée à la constante diélectrique comme indiqué dans les équations ci-dessus (Figure 90).

Si une source de tension alternative sinusoïdale V est placée aux bornes du même condensateur (Figure 91), le courant résultant sera composé d'un courant de charge I_c et d'un courant de perte I_l qui est lié à la constante diélectrique.

Dans un champ électrique alternatif, la polarisation est due à des mécanismes de déformation de la répartition des charges électriques. Ainsi, la polarisation ne suit pas ce champ d'une façon instantanée. Ceci induit des pertes d'énergie pouvant être équivalentes à une conductance (G) en parallèle avec un condensateur (C).

$$I = I_c + I_l = V(j\omega C_0 k' + G)$$

$$\text{Si } G = \omega C_0 k'', \text{ alors :}$$

$$I = V(j\omega C_0)(k' - jk'') = V(j\omega C_0)k$$

$$\omega = 2\pi f$$

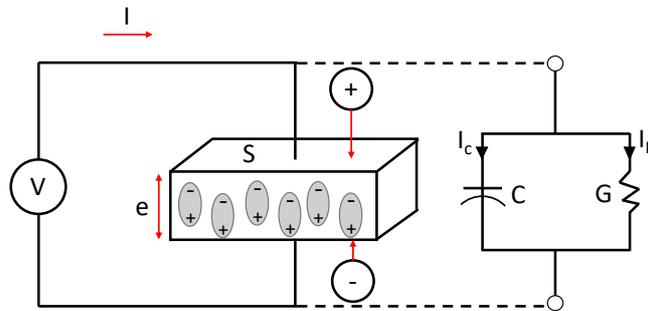


Figure 91. Condensateur à plaques parallèles, cas d'un courant alternatif.

La constante diélectrique (k) est équivalente à la permittivité relative (ϵ_r) ou à la permittivité absolue (ϵ) par rapport à la permittivité de l'espace libre (ϵ_0). k peut être décomposée en une partie réelle k' (ou encore ϵ_r') et une partie imaginaire k'' (ou ϵ_r''), on parle alors de permittivité complexe.

La partie réelle de la permittivité (ϵ_r') est une mesure de la quantité d'énergie d'un champ électrique externe stockée dans un matériau. La partie imaginaire de la permittivité (ϵ_r'') est appelée facteur de perte et mesure la dissipation ou la perte d'un matériau par rapport à un champ électrique externe. ϵ_r'' est toujours supérieure à zéro et est généralement beaucoup plus petite que ϵ_r' . Le facteur de perte comprend les effets de la perte diélectrique et de la conductivité.

Lorsque la permittivité complexe est représentée sous la forme d'un simple diagramme vectoriel (Figure 92), les composantes réelles et imaginaires sont déphasées de 90° . La somme vectorielle forme un angle δ avec l'axe réel (ϵ_r'). La « perte » relative d'un matériau est le rapport entre l'énergie perdue et l'énergie stockée.

$$\tan \delta = \frac{\epsilon_r''}{\epsilon_r'} = D = \frac{1}{Q}$$

$$= \frac{\text{Energie perdue par cycle}}{\text{Energie stockée par cycle}}$$

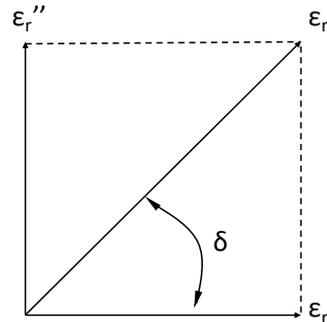


Figure 92. Diagramme vectoriel de la tangente de perte.

La tangente de perte, ou $\tan \delta$, est définie comme le rapport entre la partie imaginaire de la constante diélectrique et sa partie réelle. D désigne le facteur de dissipation et Q le facteur de qualité. Pour les matériaux à très faibles pertes, puisque $\tan \delta \approx \delta$, la tangente de perte peut être exprimée en unités d'angle, milliradians ou microradians. Cela signifie également qu'il a une meilleure efficacité.

Le facteur de dissipation peut être aussi calculé dans un modèle électrique parallèle selon l'Équation 10 suivante :

$$\tan \delta = \frac{I_R}{I_C} = \frac{\text{partie réelle}}{\text{partie imaginaire}} = \frac{1}{R.C.\omega} = \frac{\epsilon_r''}{\epsilon_r'}$$

Équation 10. Calcul du facteur de dissipation.

Le diélectrique a la propriété de se polariser sous l'effet d'un champ électrique. En effet, la polarisation est un paramètre qui quantifie l'effet d'un champ électrique sur le diélectrique.

La polarisation des matériaux est due à la modification de la répartition des charges électriques répartition lorsqu'un champ électrique est appliqué. La polarisation peut être due à divers phénomènes, allant de l'accumulation de charges à la surface de matériaux ayant des propriétés électriques différentes (polarisation inter faciale) à l'orientation dipolaire, en passant par la polarisation atomique et électronique.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹

Chacun de ces effets de polarisation contribue à la valeur globale de la constante diélectrique. Cette dernière est responsable (i) des phénomènes de relaxation (temps nécessaire au rétablissement de la neutralité électrique), qui se produisent jusqu'au THz, et (ii) des phénomènes de résonance se produisant à des fréquences supérieures au THz.

Ces phénomènes produisent des pics de facteur de perte diélectrique comme présenté dans la Figure 93.

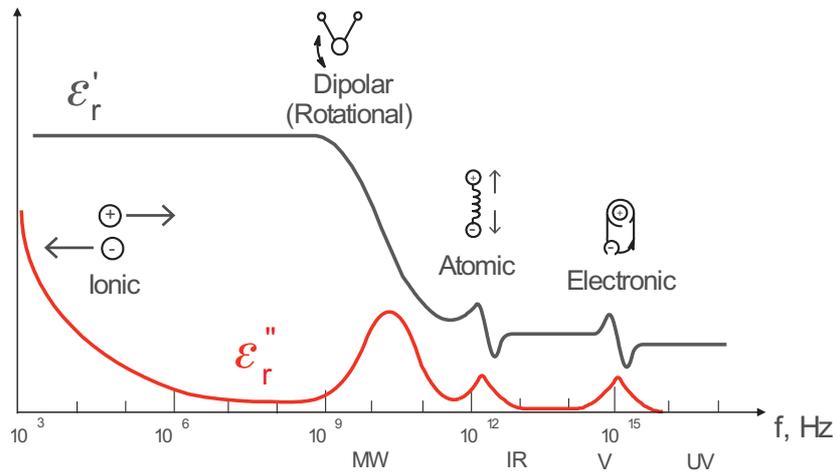


Figure 93. Influence des différents types de polarisation sur les paramètres diélectriques.

Ainsi, au niveau atomique, si un champ électrique est appliqué, l'atome se déforme, entraînant la création de pôles et l'apparition de charges positives et négatives qui s'éloignent d'une certaine distance. De ce fait, chaque atome d'une charge q va se comporter comme un dipôle électrique, selon la Figure 94 ci-dessous.

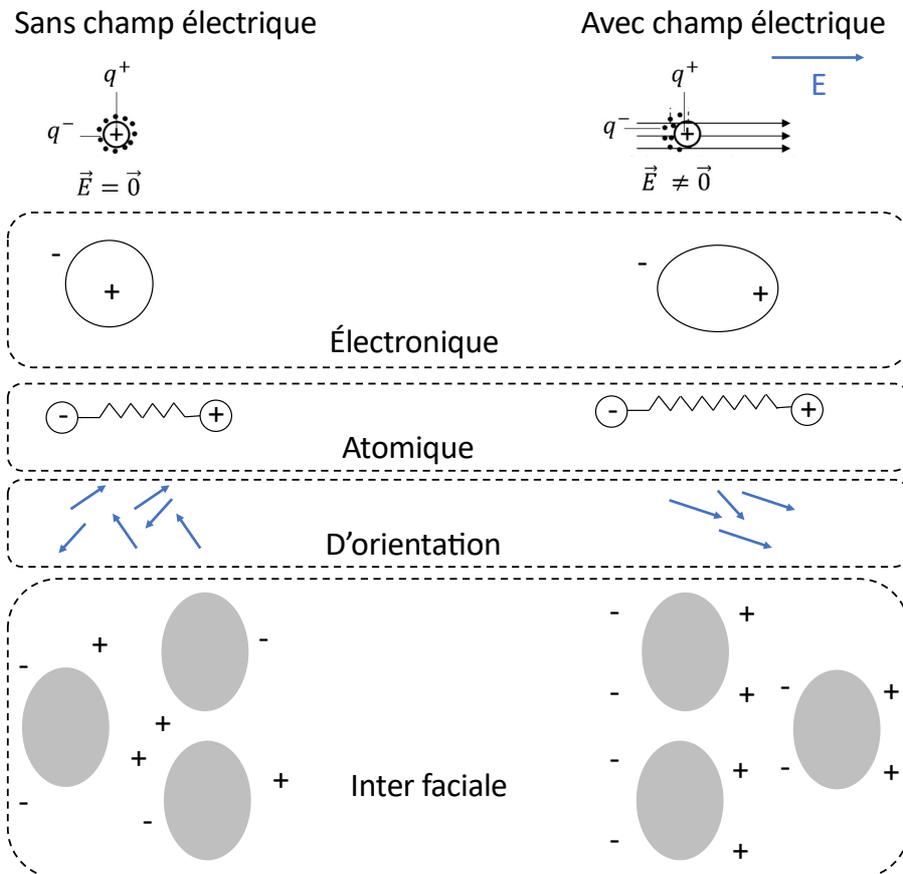


Figure 94. Représentation des phénomènes de polarisation.

La polarisation électronique, intervient lors d'un déplacement de charge ou d'une déformation du nuage électronique. Elle est présente dans tous les matériaux, pour des fréquences de l'ordre de 10^{15} à 10^{18} Hz.

La polarisation atomique, est présente lors d'un déplacement du noyau à l'intérieur d'une molécule ou d'un déplacement des ions. Elle se manifeste pour des fréquences de l'ordre de 10^{12} à 10^{13} Hz.

La polarisation d'orientation est présente dans le cas d'une molécule polaire (moment dipolaire permanent), où le champ électrique provoque une orientation des dipôles dans la direction du champ. Du fait de leur poids et du moment d'inertie, cette polarisation intervient à des fréquences de l'ordre de 10^6 à 10^{10} Hz.

Enfin, la polarisation inter faciale, intervient lors du déplacement des charges mobiles qui a pour effet l'accumulation des charges au voisinage des interfaces. Elle intervient pour des fréquences inférieures à 10^6 Hz.

C'est dans cette plage de fréquence que nous avons décidé de travailler avec le dispositif de capteur, en particulier sur la plage de fréquence variant de 100 Hz à 100 kHz.

1.3. Les électrodes interdigitées comme capteurs d'impédance et de capacité

Les électrodes interdigitées sont composées d'un ensemble d'électrodes chargées positivement et négativement, disposées en forme de « peigne » et entrelacées (Figure 95).¹⁸⁰ Notons que plus le nombre d'électrodes est élevé, meilleur sera le signal obtenu. Ceci est dû au nombre de capacités, qui sont montées en parallèle, permettant leur accumulation et où chaque valeur de capacité s'ajoute. La Figure 95B correspond à l'électrode interdigitée (IDE, Micrux Technologies) dont les caractéristiques ont été abordées dans le Chapitre 3. Matériaux peptidiques hybrides dégradables par l'activité enzymatique de la MMP-13. La Figure 95A correspond ainsi à la structure interdigitée.

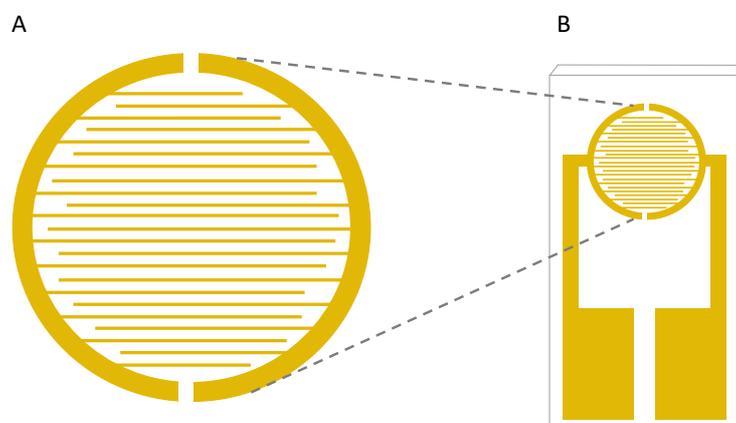


Figure 95. Représentation de la structure interdigitée : IDE (Micrux Technologies).

Les IDE sont très largement utilisées dans les applications technologiques, notamment dans le domaine des capteurs biologiques et chimiques, en raison de leur faible coût, de leur facilité de fabrication et de leur grande sensibilité. Afin de détecter et d'analyser une molécule biochimique ou un analyte, le signal d'impédance et de capacité doit être obtenu. Les électrodes interdigitées sont utilisées pour différentes applications biologiques comme pour la détection et la caractérisation de cellules cancéreuses¹⁸¹, la surveillance en temps réel de l'évolution bactérienne¹⁸² ou encore la détection de protéases.¹¹¹ L'avantage de cette structure est qu'elle est non destructrice pour les échantillons analysés et que la mesure peut être réalisée en continue, permettant de rendre rapidement l'analyse de la mesure. C'est cette structure que nous avons retenue pour ce travail de thèse.

La modalité de fonctionnement de cette structure sera réalisée par spectroscopie d'impédance où le transfert de courant résulte de la nature capacitive de l'électrode. Ce système est basé sur les changements de capacité entre les électrodes interdigitées pour indiquer les événements de liaison moléculaire se trouvant à la surface de l'électrode.¹⁸⁰

La mesure d'impédance de notre matériau ne correspondra pas à celle donnée dans l'Équation 9. En effet, l'attachement du matériau et l'étude de ses propriétés électriques se feront selon l'Équation 11 suivante :

$$|Z| = \sqrt{R^2 + \frac{1}{(2\pi fC)^2}}$$

Équation 11. Formule de module d'impédance électrique adaptée au dispositif choisi.

Lorsque la structure capacitive à plaques parallèles est mise sous tension, un champ électrique s'établit entre les électrodes. Ainsi, une ouverture progressive des électrodes entraîne l'expansion du champ électrique établi, représenté sur la Figure 96 ci-dessous.

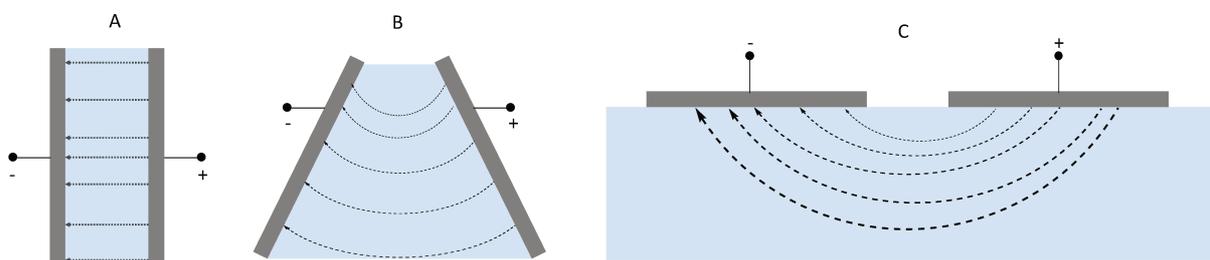


Figure 96. A, condensateur à plaques parallèles. B, électrodes légèrement écartées. C, électrodes complètement ouvertes.

Il est important de souligner que les lignes de champs traversent le champ diélectrique. En conséquence, l'impédance (capacité et conductance) mesurée entre les deux électrodes dépend des propriétés diélectriques du matériau ainsi que de la taille des électrodes et de leur nature.

La capacité interdigitée n'est qu'une capacité coplanaire avec n répétitions (avec n : nombre entier réel), son fonctionnement est le même qu'une capacité parallèle, la mise en tension des électrodes génère un champ électrique entre celles-ci. Cette configuration couvre une surface plus grande et le champ électrique est réparti d'une manière homogène.

Dans ce travail nous avons choisi d'étudier deux géométries capacitives : coplanaire (ou planes) et interdigitée.

La structure coplanaire, en Al_2O_3 est choisie pour sa simplicité de fabrication du masque et de conception, ainsi que la possibilité de fonctionnaliser la zone entre les électrodes.

La structure interdigitée en or est choisie parce qu'elle présente une meilleure sensibilité comparée à la géométrie coplanaire et elle permet la fonctionnalisation de la zone entre les électrodes. Théoriquement la géométrie de type capacité interdigitée a une meilleure réponse comparée à la capacité coplanaire car la surface des électrodes est plus importante et le champ électrique est plus grand.

Partie 2. Caractérisation électrique d'un matériau peptidique hybride greffé sur des électrodes interdigitées en or

Cette partie concerne la caractérisation électrique de matériaux peptidiques hybrides polymérisés sur un capteur en or. Le matériau hybride a été obtenu par casting d'une solution de peptide hybride bis-silylés possédant des groupements trialkoxysilane, Chapitre 3, Partie 1. Préparation d'une couche de matériau hybride dégradabile sur un capteur modèle en or et caractérisation physicochimique. La synthèse des matériaux utilisés sur les électrodes interdigitées en or (IDE) caractérisées électriquement, a été effectuée en salle blanche du laboratoire de l'IES. Ceci a été réalisé dans le but de se dépourvoir au maximum des particules de poussières qui pourraient être déposées sur les échantillons.

Les échantillons sont mesurés électriquement de la façon suivante. D'abord, une station sous pointe est reliée à un analyseur d'impédance HF (4192A HP) pouvant réaliser des mesures à des fréquences comprises entre 5 Hz et 10 MHz. Cet appareil est lui-même relié à un ordinateur équipé du logiciel LabVIEW qui permet de tracer des courbes représentatives des données (résistance et capacité) en fonction de la fréquence.

La station sous-pointe est placée dans une enceinte climatique à température et humidités contrôlées, 37°C et 90% HR respectivement. Les échantillons sont mesurés sur une plage de fréquence allant de 100 Hz à 100 KHz, comme expliqué dans la partie 1.2. Notion d'impédance électrique.

La Figure 97 représente l'ensemble du dispositif.



Figure 97. Photo de l'appareillage de mesure.

Grâce à cet appareillage, nous allons pouvoir mesurer deux informations : une capacité électrique et le facteur de dissipation ($\tan \delta$) qui correspondent à l'ordonnée du graphique, en fonction de la fréquence (abscisse du graphique). Les mesures sont effectuées pendant environ 2 minutes. Théoriquement, on s'attend à ce que la capacité électrique et le facteur de dissipation augmentent en fonction du greffage par le matériau peptidique hybride **S4**

contenant le groupement ferrocène. En effet, nous nous attendons à ce que les ions ferriques Fe^{3+} augmentent significativement les valeurs de capacité électrique et du facteur de dissipation. Ainsi, lorsque le matériau peptidique hybride sera dégradé par l'activité enzymatique de la MMP-13, les différences de signaux enregistrées seront significativement plus importantes.

2.1. Mesure électrique de la surface de l'IDE en or fonctionnalisée

Pour caractériser électriquement l'échantillon, celui-ci est placé sur le banc de caractérisation électrique (la station sous pointe) décrit dans le paragraphe précédent. Les échantillons ont été placés successivement sous la station sous-pointe dans l'enceinte climatique. Pour chacun des échantillons le logiciel LabVIEW a enregistré les mesures de la capacité et de la résistance sur une plage de fréquence de 100 Hz à 100 kHz.

Les données sont ensuite exportées sous format Excel et les courbes de capacité électrique (Figure 98A) et du facteur de dissipation ($\tan \delta$, Figure 98B) sont tracées en fonction de la fréquence.

La fréquence de 4 kHz a été sélectionnée puisqu'elle correspond à la fréquence d'utilisation de ce capteur lorsqu'il sera associé avec un système RFID.

Ainsi, à cette fréquence, la capacité électrique de **S-MPTMS** est augmentée d'un facteur 1.6 lorsqu'elle est comparée à **S0**. De même, le facteur de dissipation de **S-MPTMS** est augmenté d'un facteur 1.2 lorsqu'il est comparé à **S0**.

Il en résulte qu'électriquement, nous sommes capables de confirmer la fonctionnalisation de l'électrode **S0** (courbe noire) par le MPTMS (**S-MPTMS**, courbe rouge). Ces résultats permettent notamment d'établir une référence pour les futurs échantillons qui seront analysés.

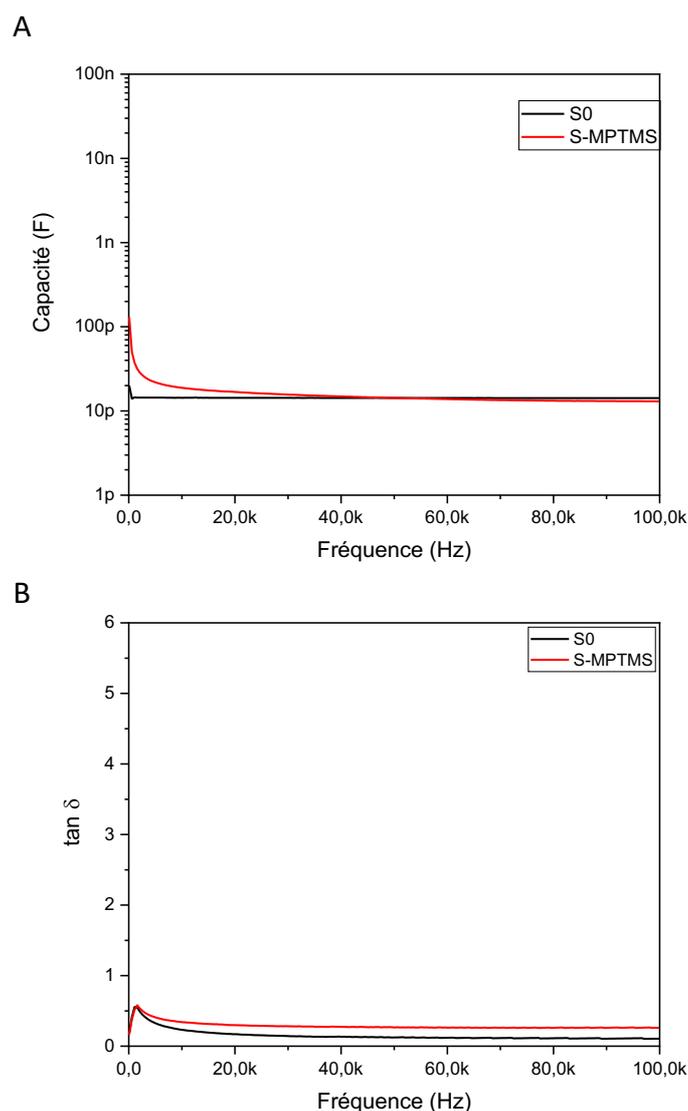


Figure 98. Courbes représentant la capacité électrique (A) et $\tan \delta$ (B) des échantillons **S0** (courbe noire) et **S-MPTMS** (courbe rouge) en fonction de la fréquence.

2.2. Mesure électrique du greffage du matériau peptidique hybride sur l'IDE en or

Après la fonctionnalisation de la surface de l'électrode rendant ainsi possible l'ancrage du matériau peptidique, une goutte de 3 μL d'une solution de sol-gel (solution EtOH/H₂O-HCl v/v 98/2 à pH 1.4) contenant 10 mM de peptide hybride **4** est déposée sur la zone de dépôt de l'échantillon. L'évaporation est effectuée dans une étuve à 60°C durant 30 minutes. Par la suite, l'échantillon est rincé dans de l'eau MilliQ® afin d'éliminer le surplus de matériau hybride qui n'aura pas adhéré à la surface, puis l'échantillon est séché sous flux d'azote.

Comme pour les IDE **S0** et **S-MPTMS**, les valeurs de $\tan \delta$ et de la capacité ont été mesurés pour **S4** (Figure 99, courbe verte). Au contraire de la modification par le MTPMS qui a entraîné des changements mineurs, le greffage de la couche peptidique hybride a engendré des modifications très importantes.

Ainsi, à une fréquence de 4 kHz, C a augmenté d'un facteur 140 (Figure 99A) et $\tan \delta$ a augmenté d'un facteur 100 environ (Figure 99B) par rapport aux valeurs mesurées pour l'échantillon **S-MPTMS**.

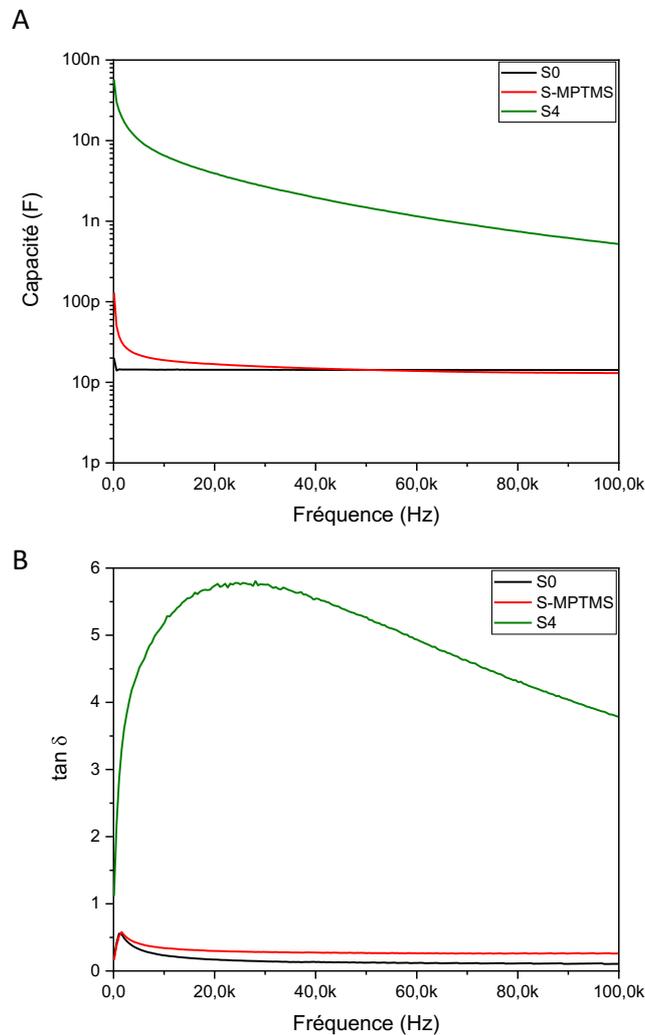


Figure 99. Courbes représentant la capacité électrique (A) et $\tan \delta$ (B) du matériau greffé **S4** sur le capteur en or, en fonction de la fréquence.

On peut conclure que le matériau hybride **S4** entraîne des modifications très importantes, facilement détectées par mesure d'impédance électrique. Ces changements sont probablement en partie dus au groupement ferrocène et aux cations ferriques Fe^{3+} présents dans le matériau. Afin de le prouver, nous comparerons ces mesures avec celles obtenues pour les échantillons **S6** et **S7**, préparés à partir de peptides hybrides analogues **6** et **7**, ne contenant pas de ferrocène.

Avant ce contrôle sur l'efficacité du ferrocène, nous avons évalué la stabilité de la couche de matériau hybride **S4**.

2.3. Étude de la résistance du matériau S4 dans un tampon par mesure électrique

L'électrode **S4** a été plongée dans une solution de tampon T (Chapitre 2 partie 4.1. Activation de la pro MMP-13) pendant 48h à température ambiante. L'échantillon est ensuite rincé 3 fois 5 minutes dans de l'eau MilliQ® et séché sous flux d'azote. On obtient ainsi l'échantillon **S4-lav**. La Figure 100A correspond à la mesure de la capacité électrique des échantillons non lavés (**S4**) et lavés (**S4-lav**) en fonction de la fréquence. Peu de variations sont constatées d'un échantillon à l'autre.

En effet, à 4 kHz, la capacité électrique diminue d'un facteur 0.26. Sur la Figure 100B, la même observation est constatée et le facteur $\tan \delta$ diminue de 5.8%, ce qui reste très négligeable. Ceci nous permet de confirmer les résultats obtenus par caractérisation physicochimique (Chapitre 3. Matériaux peptidiques hybrides dégradables par l'activité enzymatique de la MMP-13).

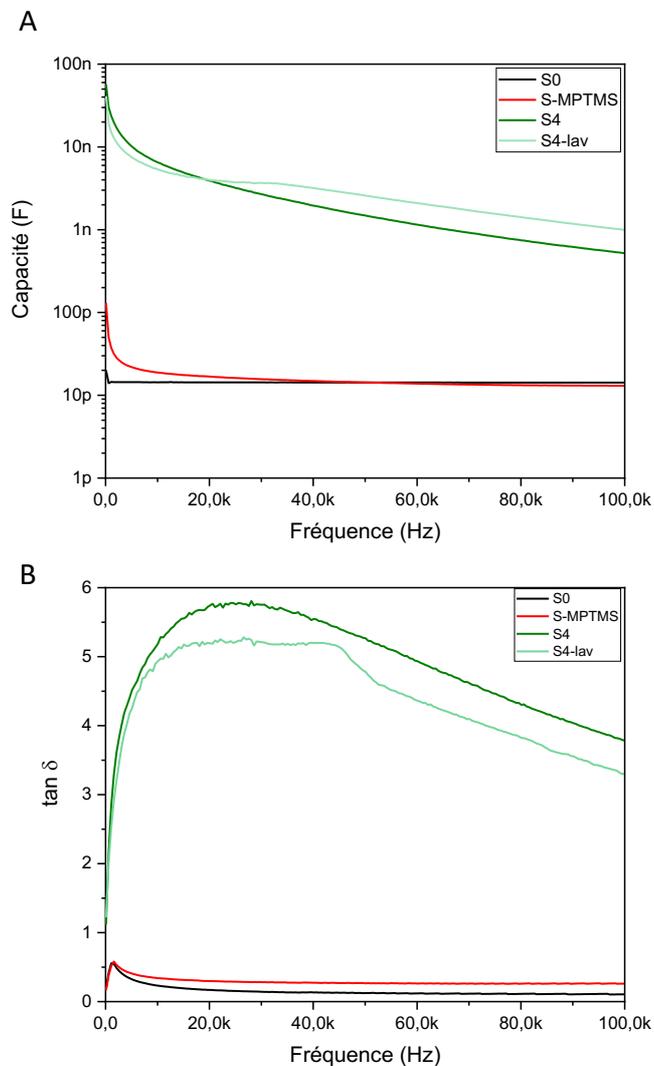


Figure 100. Courbes représentant la capacité électrique (A) et $\tan \delta$ (B) du matériau peptidique hybride avant (S4, courbe vert foncé) et après différents lavages (courbe vert clair).

2.4. Intérêt du ferrocène en tant qu'amplificateur de signal

Comme nous l'avons montré (partie 2.2. Mesure électrique du greffage du matériau peptidique hybride sur l'IDE en or), nous avons observé une différence significative de signal entre les électrodes non fonctionnalisées **S0** et fonctionnalisées avec le peptide hybride **4**, expliquée par la présence de ferrocène. Nous devons prouver notre hypothèse en comparant les électrodes **S4** avec les électrodes **S6** ou **S7** qui ne comportent pas de ferrocène. Pour rappel, **S6** est un matériau préparé à partir de la même séquence peptidique hybride possédant une lysine fluorescéine à la place de la lysine portant le ferrocène carboxylique. Le peptide hybride **7** possède une norleucine (Figure 101).

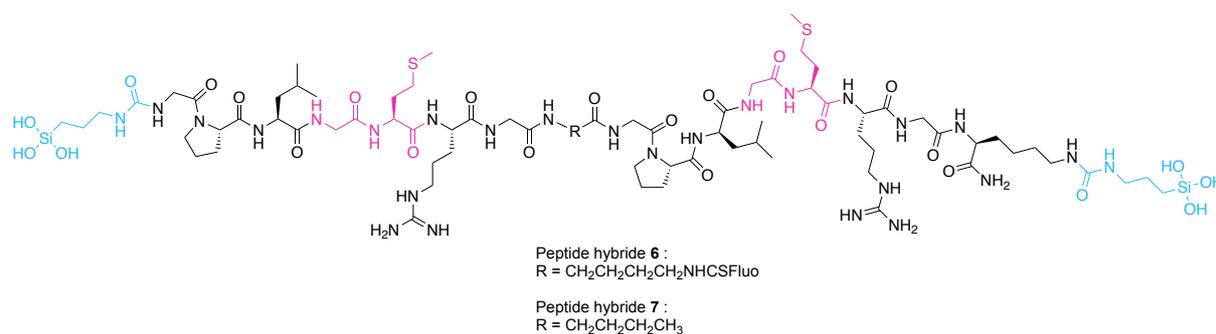


Figure 101. Peptides hybrides 6 et 7.

La Figure 102 permet la comparaison de la mesure de la capacité électrique et de $\tan \delta$ du matériau **S4** (courbe verte) avec le matériau **S6** (courbe orange) en fonction de la fréquence.

Comme attendu, à la fois la capacité et le $\tan \delta$ obtenus pour le matériau possédant le ferrocène, sont supérieurs à ceux mesurés pour le matériau fluorescent. La capacité de **S4** est 132 fois supérieure et $\tan \delta$ est augmenté d'un facteur 3.

La même observation peut être faite en comparant **S4** et **S7**. Les graphes C et D de la Figure 102 correspondent à la comparaison de la mesure de la capacité électrique et de $\tan \delta$ du matériau **S4** avec le matériau **S7** (courbe violette) en fonction de la fréquence. La capacité de **S4** est augmentée d'un facteur 138 et $\tan \delta$ est augmenté d'un facteur 2.5.

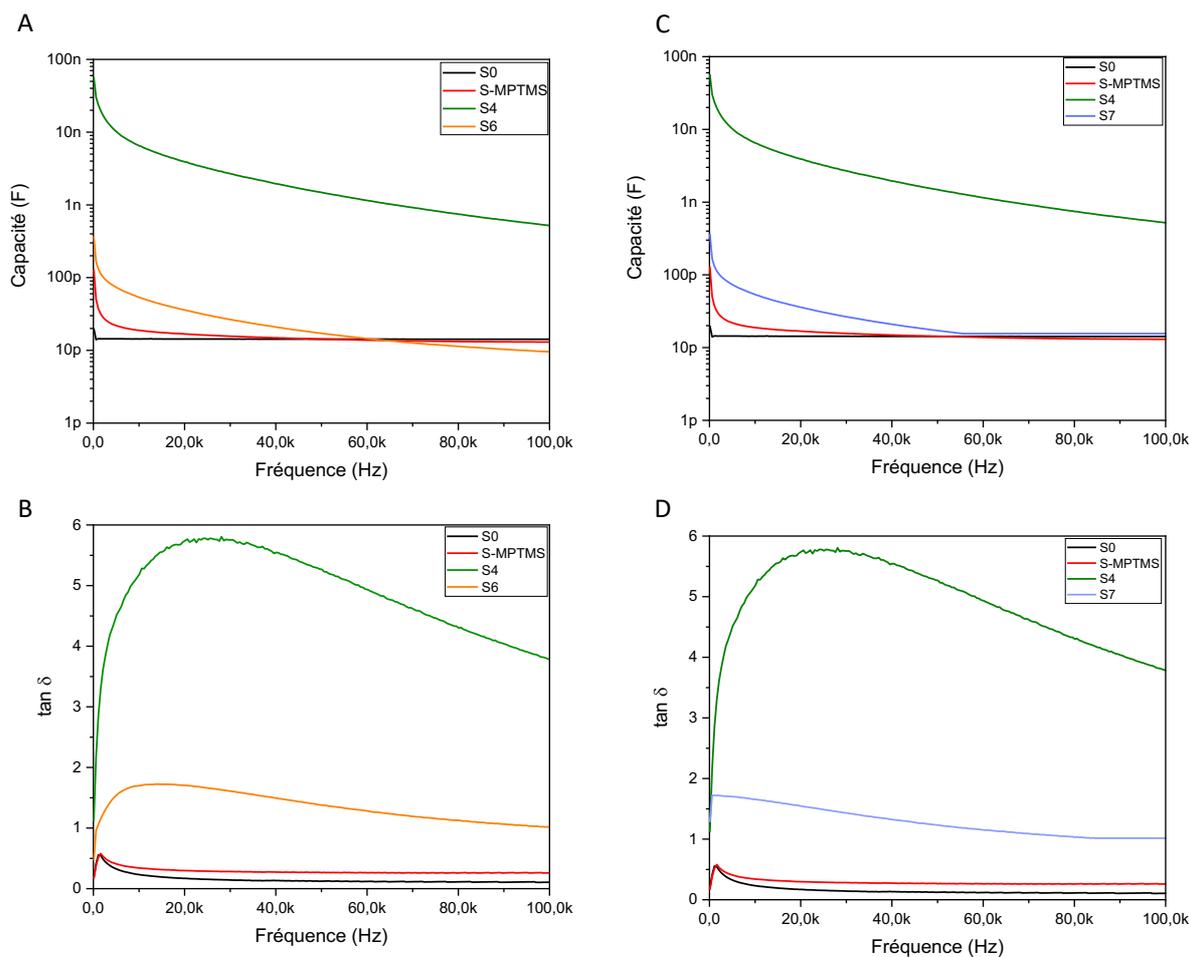


Figure 102. A et B, comparaison de la capacité électrique et de $\tan \delta$ du matériau peptidique hybride **S4** (courbe verte) et **S6** (courbe orange). C et D, comparaison de la capacité électrique et de $\tan \delta$ du matériau peptidique hybride **S4** (courbe verte) et **S7** (courbe violette).

Nous avons démontré ici notre hypothèse de manière probante : l'introduction d'un métallocène dans le matériau permet d'amplifier la réponse électrique tant au niveau de la capacité qu'au niveau de $\tan \delta$.

2.5. Étude de l'activité enzymatique de la MMP-13 sur le matériau par mesure électrique

Comme présenté dans les chapitres précédents, nous avons soumis des électrodes fonctionnalisées avec différents matériaux hybrides, à l'action de 1 μM de MMP-13 durant 24h. Les échantillons sont ensuite rincés dans de l'eau MilliQ® et séchés sous flux d'azote.

Nous avons d'abord travaillé sur l'électrode **S4**. Les résultats sont présentés dans la Figure 103. La courbe verte correspond aux mesures réalisées avec l'électrode **S4** traitée uniquement avec le tampon biologique T pendant la même durée (24h). La courbe rose correspond au matériau **S4-MMP** qui a été soumis à la digestion enzymatique. L'activité enzymatique de la

MMP-13 a induit une perte spectaculaire de $\tan \delta$ de 50% à 4 kHz. De plus, la capacité électrique de **S4** a diminué d'un facteur 2.8.

Le facteur de dissipation nous a permis d'évaluer les quantités de charge présentes dans l'échantillon, ce qui a confirmé les résultats obtenus par XPS.

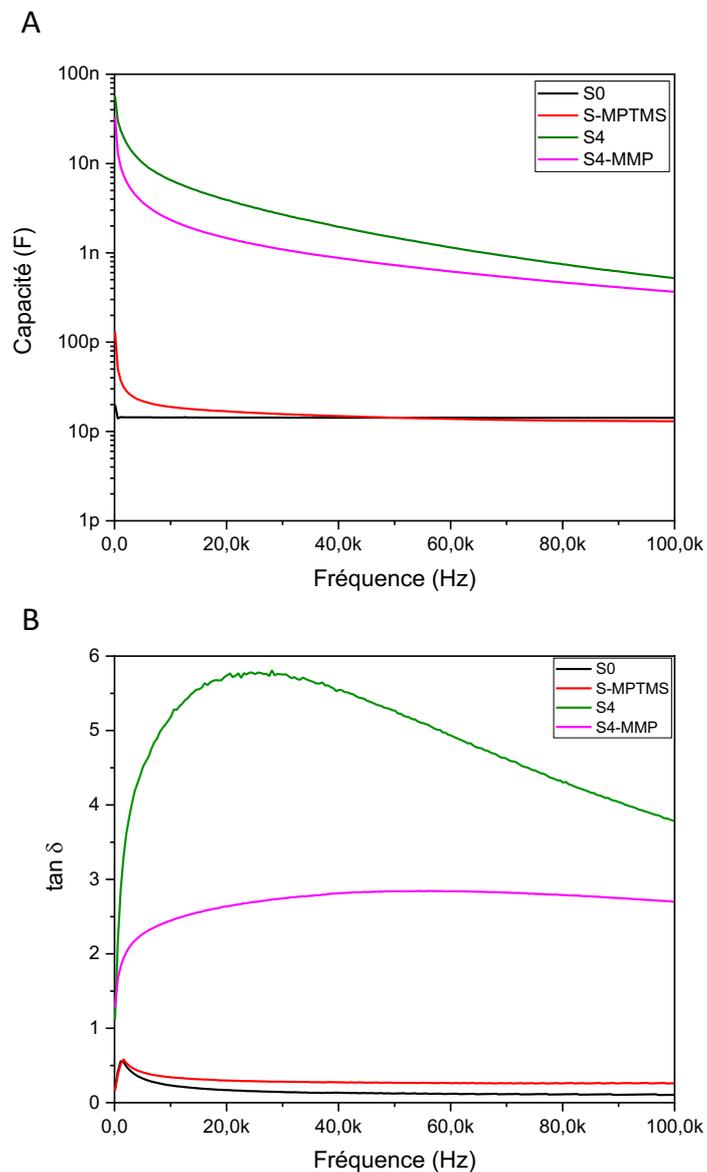


Figure 103. Courbes représentant la dégradation du matériau S4 (courbe verte) par la MMP-13 (S4-MMP, courbe rose). A représente la capacité électrique et B, le facteur de dissipation $\tan \delta$.

Nous avons par la suite étudié la dégradation du matériau fluorescent **S6** par la MMP-13 (Figure 104).

Comme attendu, on observe une diminution de la capacité et du facteur de dissipation dû à l'activité enzymatique. À 4 kHz, l'activité enzymatique de la MMP-13 sur **S6** a induit une perte de $\tan \delta$ d'un facteur 5 et la capacité électrique de **S6** a diminué d'un facteur 15.

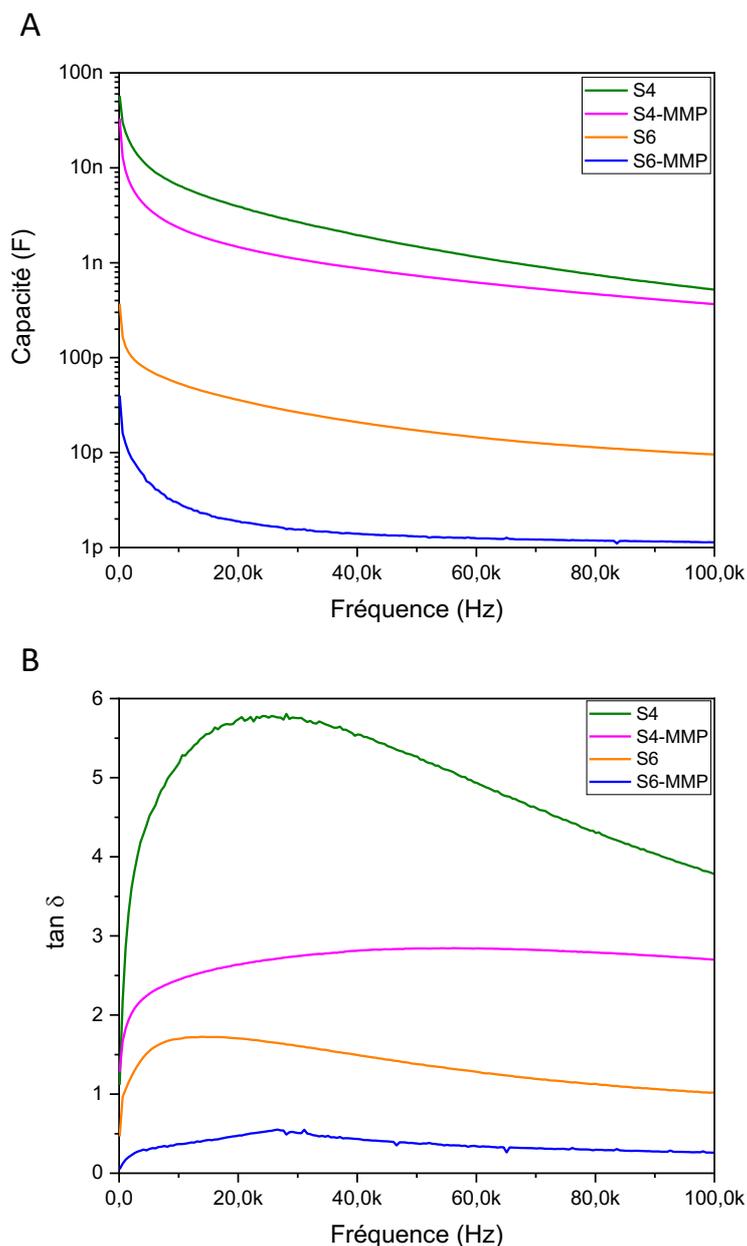


Figure 104. Comparaison de la capacité électrique (A) et de $\tan \delta$ (B) du matériau peptidique hybride **S4** (courbe verte) et **S6** (courbe orange) après la digestion enzymatique de la MMP-13 (**S4-MMP** et **S6-MMP**, respectivement).

Ces différences très importantes restent aussi intéressantes que celles observées pour le matériau **S4** contenant le ferrocène. Toutefois, le matériau **S4** reste plus intéressant. En effet, en calculant les rapports des mesures de capacité électrique entre **S4/S4-MMP** et **S6/S6-MMP**, celle du matériau **S4** est 6 fois plus importante que celle du matériau **S6**.

2.6. Étude de l'activité enzymatique de la MMP-13 sur le matériau en (D)

Afin démontrer la spécificité de la MMP-13 pour son substrat, nous avons répété l'expérience avec le matériau **S8**. Cette électrode a été fonctionnalisée avec un peptide composé d'acides aminés (D). Une telle configuration stéréochimique ne permet pas la reconnaissance par le site actif de l'enzyme, et devrait inhiber ou largement diminuer le clivage de MMP-13.

Les résultats de la capacité électrique et du facteur de dissipation de **S8** sont présentés en Figure 105.

Comme prévu, aucune différence significative n'a été observée entre **S8** (courbe grise) et **S8-MMP** (courbe jaune) correspondant à l'électrode traitée avec le tampon de test et la MMP-13, respectivement. Presque aucun changement n'a été remarqué avec la mesure de la capacité et seulement une perte de 10% pour $\tan \delta$, confirmant la stabilité de la couche de peptide hybride comprenant des acides aminés non protéinogéniques.

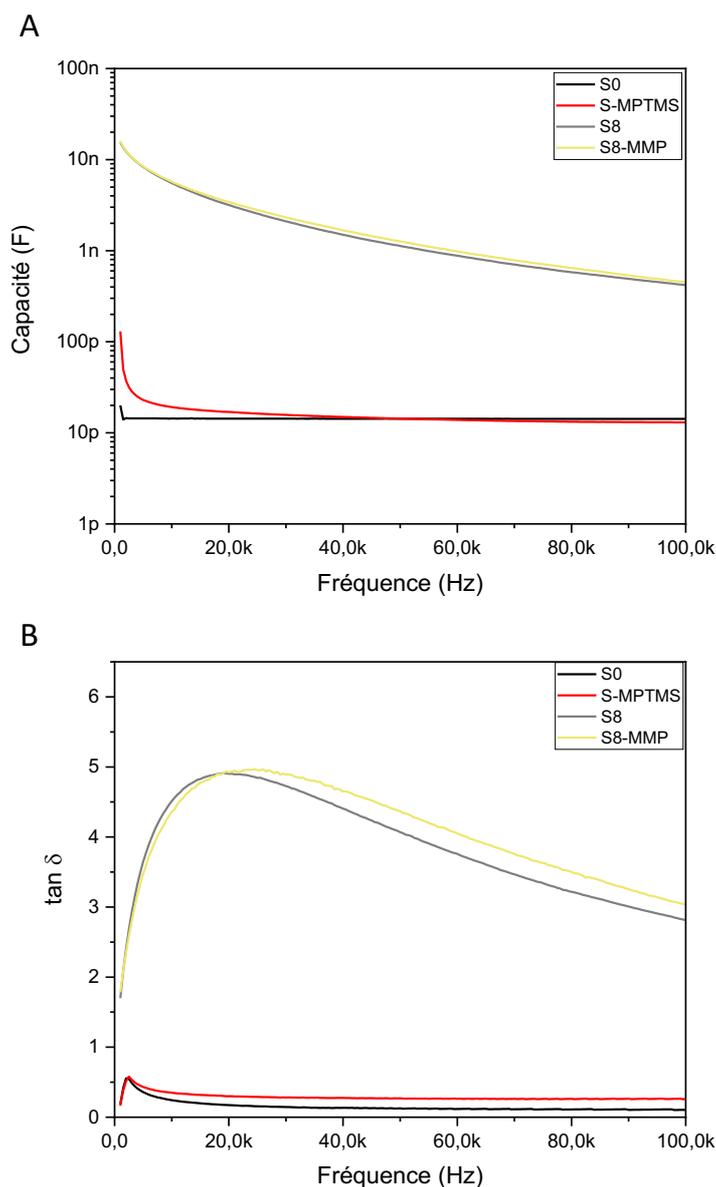


Figure 105. Courbes représentant le matériau S8 (courbe grise) dans le tampon biologique T sans l'enzyme et le matériau S8-MMP (courbe jaune) dans le tampon biologique T en présence d'enzyme.

Nous avons pu valider sur un capteur modèle avec des électrodes d'or interdigitées, qu'il été possible de suivre par mesure électrique de la capacité et du facteur de dissipation ($\tan \delta$) l'état de surface des électrodes. Nous avons pu montrer (i) la fonctionnalisation de l'électrode par le MPTMS, (ii) le greffage d'un matériau peptidique hybride (iii) sa résistance à différents lavages dans un tampon biologique. Plus intéressant, nous avons montré de façon claire qu'il était possible de mesurer la dégradation spécifique du matériau hybride par une enzyme.

Ces résultats ouvrent la voie à la fonctionnalisation de capteurs à bas coût pour monitorer l'action d'enzyme in situ. Pour cela, nous avons proposé de développer des capteurs jetables intégrables dans les pansements. Nous avons donc réalisé des mesures électriques sur des capteurs préparés par nos soins, en Al_2O_3 poreux.

Partie 3. Caractérisation électrique du matériau peptidique hybride greffé sur l'Al₂O₃ poreux

L'une des difficultés inhérentes aux capteurs en Al₂O₃ poreux est justement la présence de nombreux pores qui pourraient poser des problèmes de reproductibilité au niveau de leur nombre et géométrie, mais aussi à cause de la présence possible de nombreux ions et de molécules d'eau qui pourraient y rester malgré les lavages et le séchage.

Les premières expériences ont consisté à montrer qu'il était tout de même possible de limiter les variations de mesures électriques.

Si l'on peut s'affranchir de ces variations sur des capteurs non fonctionnalisés, il nous faudra montrer que l'on a bien une réponse électrique différente lorsque le matériau hybride est greffé à la surface du capteur. Comme pour les capteurs en or, nous vérifierons que la couche de peptide hybride est stable et qu'elle peut en revanche être dégradée spécifiquement par la MMP-13.

3.1. Stabilité de la mesure électrique sur le capteur en Al₂O₃ non greffé

Le capteur en Al₂O₃ poreux (**S0**) a été préparé comme décrit dans le Chapitre 3, partie 1.3.1. Préparation des supports en oxyde d'aluminium

La Figure 106 compare la capacité électrique du capteur **S0** non immergé (en bleu), avec celle du capteur immergé durant 48h (**S0-lav** en noir), ou immergé durant 24h de plus (**S0-lav 72h** en rouge). L'échantillon est ensuite rincé 3 fois pendant 5 minutes dans de l'eau MilliQ® afin d'éliminer au maximum les ions du tampon T.

La capacité électrique mesurée ne varie que très légèrement, de 1.14 nF pour l'échantillon non lavé (**S0**), à 1.24 nF pour l'échantillon rincé pendant 48h (**S0-lav**) et 1.31 nF pour l'échantillon rincé pendant 72h (**S0-lav**).

On peut ainsi valider la stabilité du capteur en Al₂O₃ non greffé (**S0**) lorsqu'il est immergé sur une période de 72h dans un tampon biologique T.

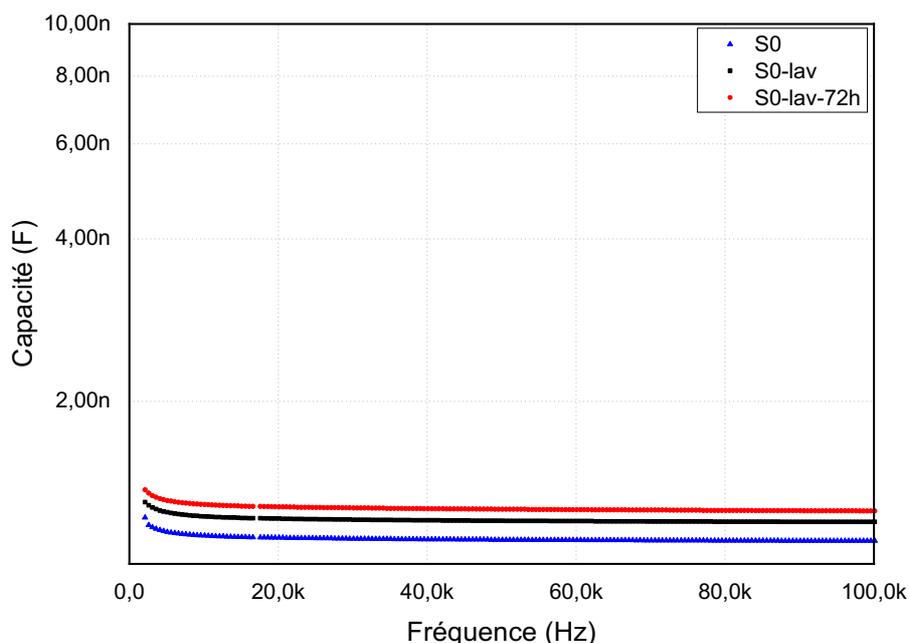


Figure 106. Étude de la stabilité de **S0** dans un tampon biologique T en fonction de la fréquence.

3.2. Mesure électrique du greffage du matériau peptidique hybride sur le capteur en Al_2O_3

Nous avons polymérisé le peptide hybride **4** possédant le groupe ferrocène, à la surface du capteur en aluminium poreux (partie 2.2. Mesure électrique du greffage du matériau peptidique hybride sur l'IDE en or). Une goutte de 3 μL de solution de peptide hybride est déposée entre les deux électrodes et l'échantillon est ensuite placé à 60°C dans un four avant d'évaporer les solvants. Ensuite, l'échantillon est rincé rapidement avec de l'eau MilliQ® puis est séché sur une période de 5 minutes sous flux d'azote.

La Figure 107 correspond aux mesures de capacité et $\tan \delta$ en fonction de la fréquence.

En choisissant la même fréquence que précédemment, à 5 kHz, la capacité mesurée pour **S0** correspond à 1.31 nF est celle mesurée pour **S4** correspond à 2 nF. La capacité de **S4** plus élevée que celle de **S0** d'un facteur 1.5. Elle est 93 fois plus faible que la valeur de capacité mesurée pour le capteur modèle en or. Pour ce qui est de $\tan \delta$, les mesures enregistrées sont très négligeables (proches de 0.25 pour **S0** et **S4** à 5 kHz).

Ceci peut être expliqué quant à la structure du capteur. En effet, comme vu dans la première partie de ce chapitre, la structure interdigitée présente une meilleure sensibilité en termes de mesures. Ceci est expliqué aussi par le nombre d'électrodes. Le capteur modèle en possède beaucoup plus que le capteur en Al_2O_3 , qui lui, n'en possède que deux en aluminium.

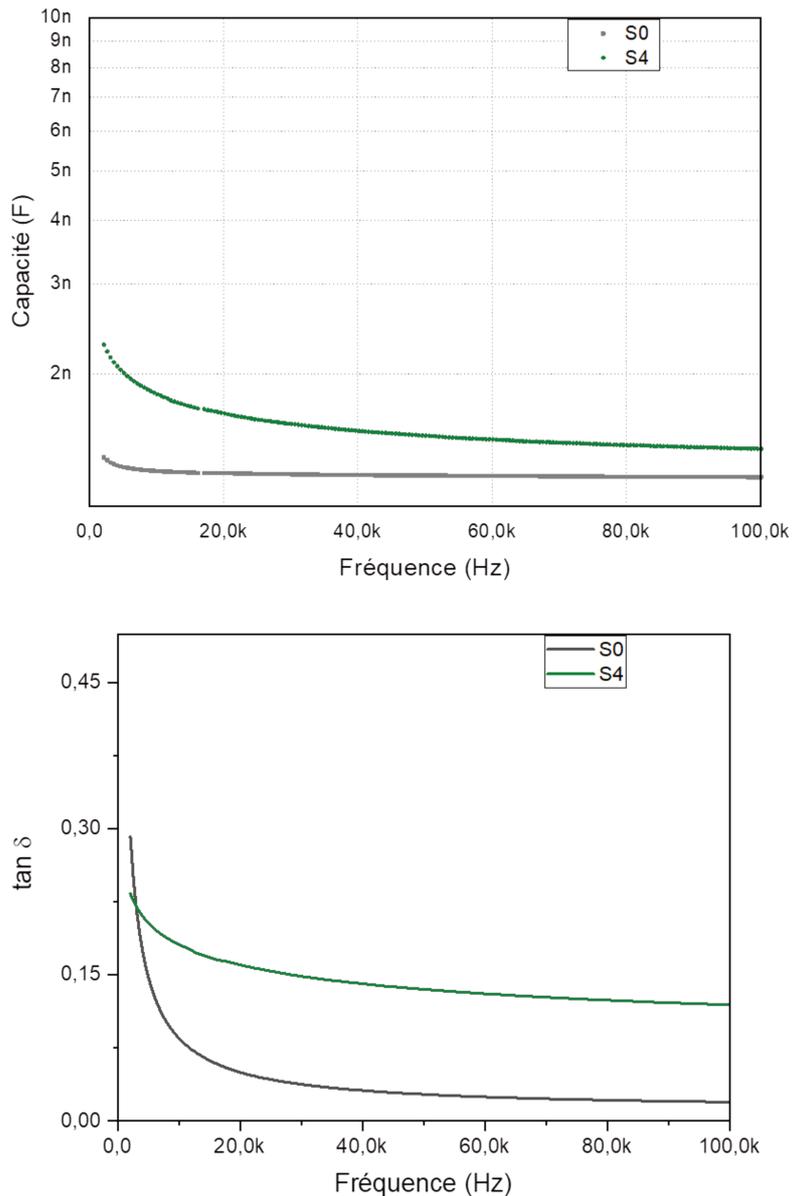


Figure 107. Greffage du matériau hybride **S4** sur l' Al_2O_3 (**S0**)

Nous avons ensuite contrôlé la stabilité de ce matériau peptidique.

3.3. Étude de la résistance du matériau S4 dans un tampon par mesure électrique sur le capteur en Al_2O_3

Afin d'étudier la stabilité de **S4**, le capteur a été immergé dans le tampon biologique T durant 48h (**S4-lav**), puis 24h supplémentaires (**S4-lav 72h**).

La Figure 108 présente les mesures de capacité et de $\tan \delta$ de **S4** (courbe verte), de S4 lavé durant 48h dans le tampon biologique T (**S4-lav**) et lavé 24h de plus dans le tampon T (**S4-lav 72h**) en fonction de la fréquence.

Malheureusement, les mesures de capacité ou de $\tan \delta$ enregistrées en fonction du temps d'incubation dans le tampon ne sont pas cohérentes et ne donnent pas de résultats similaires à ceux obtenus avec le capteur modèle en or qui montrait une grande stabilité des mesures.

Les valeurs ainsi enregistrées ne nous permettent pas de poursuivre l'étude de la dégradation de la MMP-13 sur le matériau greffé sur le capteur en Al_2O_3 .

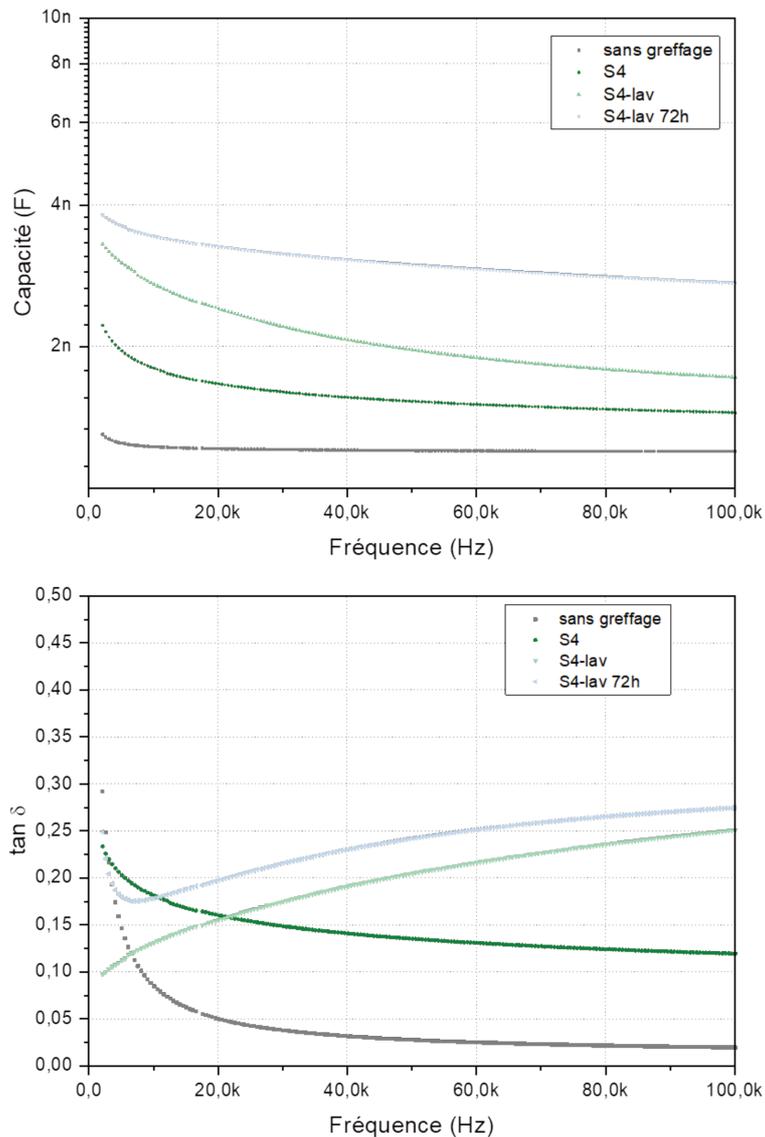


Figure 108. Étude de la covalence du greffage de **S4** sur le capteur en Al_2O_3 .

Pour la suite de ce projet, il est possible d'envisager une structure interdigitée en Al_2O_3 , moins poreuse, qui pourrait être réalisée au sein de l'équipe RFEF de l'IES. Ceci permettrait d'augmenter la sensibilité du dispositif et de retrouver des valeurs similaires mesurées avec le capteur IDE en or.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Nous avons conçu un capteur électrique capable d'évaluer l'activité enzymatique de la MMP-13. Polymérisé à la surface d'un capteur, un peptide hybride composé de séquences répétitives reconnues par l'enzyme cible a formé une couche stable de 300 nm d'épaisseur environ et d'une densité de 420 peptides/nm². Ce matériau a été obtenu par le procédé sol-gel à partir de peptides hybrides possédant deux groupes alcoxysilanes. Ainsi, par leur hydrolyse et leur condensation chemosélective, la polymérisation inorganique a permis de former une couche à la surface du capteur. Ce nouveau matériau hybride a été dégradé par la MMP-13. L'élimination de la surface de fragments de peptides a entraîné à une variation de la capacité et de la tangente de perte. Lorsque la séquence éliminée du matériau porte un ferrocène, les variations électriques ont été plus marquées.

La preuve de concept réalisée avec la MMP-13 pourrait être généralisée à d'autres types de protéases associées à une infection bactérienne, comme l'élastase neutrophile humaine (HNE), la MMP-9 ou la MMP-12.

Afin d'utiliser des capteurs de ce type dans des pansements il est nécessaire de développer des supports moins coûteux et plus flexibles que les électrodes d'or modèles qui ont été utilisées pour la validation de l'approche. Un dernier objectif de ce travail de thèse a été de préparer des supports en oxyde d'aluminium poreux et de les fonctionnaliser avec les mêmes peptides hybrides. Le greffage du matériau peptidique hybride a été validé mais il s'est avéré instable lors des lavages, probablement à cause de la liaison Si-O-Al. Pour améliorer ce support, le temps d'anodisation de l'aluminium pourrait être augmenté dans le but d'obtenir une couche plus épaisse d'oxyde d'aluminium et plus résistante mais surtout de déposer une couche de silice fine avant de greffer le peptide hybride, stratégie qui a déjà été appliquée avec succès pour le greffage sur du titane.¹⁶⁹ De plus ce support de capteur capacitif pourrait être réalisé sous forme interdigitée, ce qui permettrait d'augmenter considérablement la sensibilité du dispositif final.

De manière beaucoup plus intéressante, ce type de système de capteurs électriques pourrait être associé à une étiquette RFID passive.¹⁸³ S'il est placé à l'intérieur d'un pansement en contact avec les exsudats de la plaie, le système sans fil résultant pourrait être intéressant pour fournir un identifiant unique et un retour d'information en temps réel pour la gestion des plaies complexes enflammées ou infectées.

Références

Références

1. Leider, M. On the Weight of the Skin**From the New York Skin and Cancer Unit, Department of Dermatology and Syphilology (Marion B. Sulzberger, M.D. Director) and the Post Graduate Medical School of the New York University-Bellevue Medical Center. *Journal of Investigative Dermatology* **12**, 187–191 (1949).
2. Démarchez, M. Biologie de la peau. <https://biologiedelapeau.fr> http://biologiedelapeau.fr/spip.php?page=forum&id_article=62 (2021).
3. Wickett, R. R. & Visscher, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control* **34**, S98–S110 (2006).
4. Haake, A., Scott, G. A. & Holbrook, K. Structure and function of the skin: Overview of the epidermis and dermis. *The Biology of the Skin* 19–45 (2001).
5. Kanitakis, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* **12**, 390–399; quiz 400–401 (2002).
6. Oltulu, P., Ince, B., Kökbudak, N., Fındık, S. & Kiliç, F. Measurement of epidermis, dermis, and total skin thicknesses from six different body regions with a new ethical histometric technique. *Turk Plastik, Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Dergisi* **26**, 56–61 (2018).
7. Robinson, W. Use of urea to stimulate healing in chronic purulent wounds. *The American Journal of Surgery* **33**, 192–197 (1936).
8. Prost-Squarcioni, C. Histologie de la peau et des follicules pileux. *Med Sci (Paris)* **22**, 131–137 (2006).
9. Aerts, A., Nevelsteen, D. & Renard, F. *Soins de plaies*. (De Boeck Supérieur, 1997).
10. Bonneville, M. Physiopathologie de l’inflammation cutanée : rôle de l’activation de l’immunité innée cutanée dans le développement de l’eczéma allergique de contact. (Université Claude Bernard - Lyon I, 2006).
11. Brown, M. S., Ashley, B. & Koh, A. Wearable Technology for Chronic Wound Monitoring: Current Dressings, Advancements, and Future Prospects. *Front Bioeng Biotechnol* **6**, 47 (2018).
12. Zhao, R., Liang, H., Clarke, E., Jackson, C. & Xue, M. Inflammation in Chronic Wounds. *Int J Mol Sci* **17**, (2016).
13. Kerstein, M. D. The scientific basis of healing. *Adv Wound Care* **10**, 30–36 (1997).
14. Singer, A. J. & Clark, R. A. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* **341**, 738–746 (1999).
15. Haas, A. F. Wound healing. *Dermatol Nurs* **7**, 28–34, 74 (1995).
16. Medzhitov, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* **140**, 771–776 (2010).
17. Eichler, M. J. & Carlson, M. A. Modeling dermal granulation tissue with the linear fibroblast-populated collagen matrix: a comparison with the round matrix model. *J. Dermatol.*

Sci. **41**, 97–108 (2006).

18. Stadelmann, W. K., Digenis, A. G. & Tobin, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am. J. Surg.* **176**, 26S-38S (1998).
19. Stein, C. & Küchler, S. Targeting inflammation and wound healing by opioids. *Trends Pharmacol. Sci.* **34**, 303–312 (2013).
20. Dulmovits, B. M. & Herman, I. M. Microvascular remodeling and wound healing: a role for pericytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 1800–1812 (2012).
21. *Wounds: Biology and Management.* (Oxford University Press, 1998).
22. C, S. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 634–640 (1999).
23. Lazaro, J. L. *et al.* Elevated levels of matrix metalloproteinases and chronic wound healing: an updated review of clinical evidence. *J Wound Care* **25**, 277–287 (2016).
24. Sen, C. K. *et al.* Human Skin Wounds: A Major and Snowballing Threat to Public Health and the Economy. *Wound Repair Regen* **17**, 763–771 (2009).
25. Gianino, E. *et al.* Smart Wound Dressings for Diabetic Chronic Wounds. *Bioengineering* **5**, 51 (2018).
26. Bommer, C. *et al.* Global Economic Burden of Diabetes in Adults: Projections From 2015 to 2030. *Diabetes Care* **41**, 963–970 (2018).
27. Dowsett, C., Bielby, A. & Searle, R. Reconciling increasing wound care demands with available resources. *J Wound Care* **23**, 552, 554, 556-558 passim (2014).
28. Zhang, P. *et al.* Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis †. *Ann. Med.* **49**, 106–116 (2017).
29. Schaper, N. C. *et al.* Practical Guidelines on the prevention and management of diabetic foot disease (IWGDF 2019 update). *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* **36**, e3266 (2020).
30. Singh, N., Armstrong, D. & Lipsky, B. Preventing Foot Ulcers in Patients with Diabetes. *Jama* **293**, 217–28 (2005).
31. Tandara, A. A. & Mustoe, T. A. Oxygen in wound healing--more than a nutrient. *World J Surg* **28**, 294–300 (2004).
32. Woo, K., Ayello, E. A. & Sibbald, R. G. The edge effect: current therapeutic options to advance the wound edge. *Adv Skin Wound Care* **20**, 99–117; quiz 118–119 (2007).
33. Vincent, A. M., Russell, J. W., Low, P. & Feldman, E. L. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr. Rev.* **25**, 612–628 (2004).
34. American Diabetes Association. Consensus Development Conference on Diabetic Foot Wound Care: 7-8 April 1999, Boston, Massachusetts. American Diabetes Association. *Diabetes Care* **22**, 1354–1360 (1999).
35. Edmonds, M. Diabetic foot ulcers: practical treatment recommendations. *Drugs* **66**,

913–929 (2006).

36. Everett, E. & Mathioudakis, N. Update on management of diabetic foot ulcers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1411**, 153–165 (2018).
37. Cicatrisation : les plaies et leurs évolutions. *Actusoins - infirmière, infirmier libéral actualité de la profession* <https://www.actusoins.com/279861/cicatrisation-plaies-leurs-evolutions.html> (2017).
38. Atiyeh, B. S., Ioannovich, J., Al-Amm, C. A. & El-Musa, K. A. Management of acute and chronic open wounds: the importance of moist environment in optimal wound healing. *Curr Pharm Biotechnol* **3**, 179–195 (2002).
39. Gethin, G. *et al.* Monitoring of pH and temperature of neuropathic diabetic and nondiabetic foot ulcers for 12 weeks: An observational study. *Wound Repair and Regeneration* **26**, 251–256 (2018).
40. Whitney, J. D. Overview: Acute and Chronic Wounds. *Nursing Clinics* **40**, 191–205 (2005).
41. Powers, J. G., Morton, L. M. & Phillips, T. J. Dressings for chronic wounds. *Dermatol Ther* **26**, 197–206 (2013).
42. Hong, W. X. *et al.* The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **3**, 390–399 (2014).
43. Davis, F. M., Kimball, A., Boniakowski, A. & Gallagher, K. Dysfunctional Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers: New Crossroads. *Curr. Diab. Rep.* **18**, 2 (2018).
44. Milne, S. D., Connolly, P., Hamad, H. A. & Seoudi, I. Development of wearable sensors for tailored patient wound care. in *2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* 618–621 (2014). doi:10.1109/EMBC.2014.6943667.
45. Jones, R. E., Foster, D. S. & Longaker, M. T. Management of Chronic Wounds-2018. *JAMA* **320**, 1481–1482 (2018).
46. Aderibigbe, B. A. & Buyana, B. Alginate in Wound Dressings. *Pharmaceutics* **10**, (2018).
47. Brett, D. A Review of Collagen and Collagen-based Wound Dressings. *Wounds* **20**, 347–356 (2008).
48. Kawabata, S. *et al.* The Utility of Silk-elastin Hydrogel as a New Material for Wound Healing. *Plast Reconstr Surg Glob Open* **6**, (2018).
49. Shimizu, N., Ishida, D., Yamamoto, A., Kuroyanagi, M. & Kuroyanagi, Y. Development of a functional wound dressing composed of hyaluronic acid spongy sheet containing bioactive components: evaluation of wound healing potential in animal tests. *J Biomater Sci Polym Ed* **25**, 1278–1291 (2014).
50. Liu, H. *et al.* A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. *RSC Adv.* **8**, 7533–7549 (2018).

51. Schoukens, G. Bioactive dressings to promote wound healing. in *Adv. Text. Wound Care* vol. 85 114–152 (2009).
52. Paul, W. & Sharma, C. Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs* **18**, (2004).
53. Martău, G. A., Mihai, M. & Vodnar, D. C. The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector—Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability. *Polymers* **11**, 1837 (2019).
54. Alginate fibres: An overview of the production processes and applications in wound management.
https://www.researchgate.net/publication/233692949_Alginate_fibres_An_overview_of_the_production_processes_and_applications_in_wound_management.
55. Formation of the Scab and the Rate of Epithelization of Superficial Wounds in the Skin of the Young Domestic Pig | Nature. <https://www.nature.com/articles/193293a0>.
56. Girrbach, U. Bioactive textiles - Trend or gimmick? *International Textile Bulletin* **49**, 34–36 (2003).
57. Botella, H., Stadthagen, G., Chastellier, C. de & Neyrolles, O. Un rôle nouveau des métaux de transition dans l'immunité antimicrobienne. *Med Sci (Paris)* **28**, 18–21 (2012).
58. Klasen, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* **26**, 131–138 (2000).
59. Dealey, C. The Care of Wounds: A Guide for Nurses, Third Edition. *The Care of Wounds: A Guide for Nurses, Third Edition* 1–240 (2008) doi:10.1002/9780470774946.
60. Cockbill, S. M. E. The Development of Wound Management Products. 20.
61. Jones, V., Grey, J. E. & Harding, K. G. Wound dressings. *BMJ* **332**, 777–780 (2006).
62. Patents Assigned to Coloplast A/S - Justia Patents Search. <https://patents.justia.com/assignee/coloplast-a-s>.
63. Hollisaz, M. T., Khedmat, H. & Yari, F. A randomized clinical trial comparing hydrocolloid, phenytoin and simple dressings for the treatment of pressure ulcers [ISRCTN33429693]. *BMC Dermatol.* **4**, 18 (2004).
64. Alm, A. *et al.* Care of pressure sores: a controlled study of the use of a hydrocolloid dressing compared with wet saline gauze compresses. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* **149**, 1–10 (1989).
65. Kim, Y. C. *et al.* Efficacy of hydrocolloid occlusive dressing technique in decubitus ulcer treatment: a comparative study. *Yonsei Med. J.* **37**, 181–185 (1996).
66. National Clinical Guideline Centre (UK). *The Prevention and Management of Pressure Ulcers in Primary and Secondary Care*. (National Institute for Health and Care Excellence (UK), 2014).
67. Chang, K. W., Alsagoff, S., Ong, K. T. & Sim, P. H. Pressure ulcers--randomised controlled trial comparing hydrocolloid and saline gauze dressings. *Med. J. Malaysia* **53**, 428–

431 (1998).

68. Bella, J. Collagen structure: new tricks from a very old dog. *Biochem. J.* **473**, 1001–1025 (2016).
69. Electrospinning for Tissue Regeneration | ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/book/9781845697419/electrospinning-for-tissue-regeneration>.
70. Nwomeh, B. C., Liang, H. X., Cohen, I. K. & Yager, D. R. MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. *J. Surg. Res.* **81**, 189–195 (1999).
71. Lockhart, L. K., Pampolina, C., Nickolaychuk, B. R. & McNicol, A. Evidence for a role for phospholipase C, but not phospholipase A2, in platelet activation in response to low concentrations of collagen. *Thromb. Haemost.* **85**, 882–889 (2001).
72. Tolstykh, P. I., Gostishchev, V. K., Virnik, A. D. & Arutunian, B. N. [Biologically active dressings and surgical suture materials]. *Khirurgiia (Mosk)* 3–8 (1988).
73. Balasubramani, M., Kumar, T. R. & Babu, M. Skin substitutes: a review. *Burns* **27**, 534–544 (2001).
74. Fleck, C. A. & Simman, R. Modern collagen wound dressings: function and purpose. *J Am Col Certif Wound Spec* **2**, 50–54 (2010).
75. Acute and Chronic Wounds, 5th Edition - 9780323316217. <https://evolve.elsevier.com/cs/product/9780323316217?role=student>.
76. Schultz, G. S. & Wysocki, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen* **17**, 153–162 (2009).
77. Annabi, N. *et al.* Synthesis of highly porous crosslinked elastin hydrogels and their interaction with fibroblasts in vitro. *Biomaterials* **30**, 4550–4557 (2009).
78. Price, R. D., Myers, S., Leigh, I. M. & Navsaria, H. A. The role of hyaluronic acid in wound healing: assessment of clinical evidence. *Am J Clin Dermatol* **6**, 393–402 (2005).
79. Chen, W. Y. J. & Abatangelo, G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration* **7**, 79–89 (1999).
80. West, D. C., Hampson, I. N., Arnold, F. & Kumar, S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* **228**, 1324–1326 (1985).
81. Sheridan, R. L. & Tompkins, R. G. Skin substitutes in burns. *Burns* **25**, 97–103 (1999).
82. Stanulis-Praeger, BetzabéM. & Gilchrest, B. A. Growth factor responsiveness declines during adulthood for human skin-derived cells. *Mechanisms of Ageing and Development* **35**, 185–198 (1986).
83. Colwell, A., Faudoa, R., Krummel, T., Longaker, M. & Lorenz, H. Transforming Growth Factor- β , Smad, and Collagen Expression Patterns in Fetal and Adult Keratinocytes. *Plastic and Reconstructive Surgery* **119**, 852–857 (2007).
84. Phillips, T. J., Kehinde, O., Green, H. & Gilchrest, B. A. Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. *J. Am. Acad. Dermatol.* **21**, 191–199 (1989).

85. Wainwright, D. J. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns* **21**, 243–248 (1995).
86. Leigh, I. M. & Purkis, P. E. Culture grafted leg ulcers. *Clin. Exp. Dermatol.* **11**, 650–652 (1986).
87. Alaba, P. *et al.* Insight into Wastewater Decontamination Using Polymeric Adsorbents. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **6**, 1651–1672 (2018).
88. O'Connor, Nicholas E., Mulliken, John B., Banks-Schlegel, S., Kehinde, O. & Green, H. GRAFTING OF BURNS WITH CULTURED EPITHELIUM PREPARED FROM AUTOLOGOUS EPIDERMAL CELLS. *The Lancet* **317**, 75–78 (1981).
89. Moura, L. I. F., Dias, A. M. A., Carvalho, E. & de Sousa, H. C. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment--a review. *Acta Biomater* **9**, 7093–7114 (2013).
90. Boateng, J. & Catanzano, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing—A Review. *JPharmSci* **104**, 3653–3680 (2015).
91. Téot, L. Les pansements de traitement par pression négative. [/data/revues/00380814/v61i802/S0038081415004648/](#) (2016).
92. Manz, A., Pamme, N. & Iossifidis, D. *Bioanalytical Chemistry*. (PUBLISHED BY IMPERIAL COLLEGE PRESS AND DISTRIBUTED BY WORLD SCIENTIFIC PUBLISHING CO., 2004). doi:10.1142/p297.
93. Dreifke, M. B., Jayasuriya, A. A. & Jayasuriya, A. C. Current wound healing procedures and potential care. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **48**, 651–662 (2015).
94. Kaufman, T., Eichenlaub, E. H., Angel, M. F., Levin, M. & Futrell, J. W. Topical acidification promotes healing of experimental deep partial thickness skin burns: a randomized double-blind preliminary study. *Burns* **12**, 84–90 (1985).
95. Tamayol, A. *et al.* Flexible pH-Sensing Hydrogel Fibers for Epidermal Applications. *Adv Healthc Mater* **5**, 711–719 (2016).
96. Kassal, P. *et al.* Smart bandage with wireless connectivity for optical monitoring of pH. *Sensors and Actuators B: Chemical* **246**, 455–460 (2017).
97. Vu, H. *et al.* A Device to Predict Short-Term Healing Outcome of Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **9**, 312–324 (2020).
98. Fierheller, M. & Sibbald, R. G. A clinical investigation into the relationship between increased periwound skin temperature and local wound infection in patients with chronic leg ulcers. *Adv Skin Wound Care* **23**, 369–379; quiz 380–381 (2010).
99. Salvo, P. *et al.* Temperature- and pH-sensitive wearable materials for monitoring foot ulcers. *Int J Nanomedicine* **12**, 949–954 (2017).
100. Matzeu, G. *et al.* Skin temperature monitoring by a wireless sensor. in *IECON 2011 - 37th Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society* 3533–3535 (2011). doi:10.1109/IECON.2011.6119881.

101. Pang, Q. *et al.* Smart Flexible Electronics-Integrated Wound Dressing for Real-Time Monitoring and On-Demand Treatment of Infected Wounds. *Adv Sci (Weinh)* **7**, 1902673 (2020).
102. Milne, S. D. *et al.* A wearable wound moisture sensor as an indicator for wound dressing change: an observational study of wound moisture and status. *Int Wound J* **13**, 1309–1314 (2016).
103. Du, Y.-C. & Ciou, W.-S. A Sensor Gauze With Multi-Channel Moisture and pH Monitoring for Chronic Wound Care. *IEEE Access* **7**, 29185–29192 (2019).
104. Chan, S., Horner, S. R., Fauchet, P. M. & Miller, B. L. Identification of Gram negative bacteria using nanoscale silicon microcavities. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11797–11798 (2001).
105. Qiao, B., Pang, Q., Yuan, P., Luo, Y. & Ma, L. Smart wound dressing for infection monitoring and NIR-triggered antibacterial treatment. *Biomater. Sci.* **8**, 1649–1657 (2020).
106. Kaneko, S. *et al.* Photocontrol of cell adhesion on amino-bearing surfaces by reversible conjugation of poly(ethylene glycol) via a photocleavable linker. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 4051–4059 (2011).
107. Mostafalu, P. *et al.* Wireless Flexible Smart Bandage for Continuous Monitoring of Wound Oxygenation. *IEEE Trans Biomed Circuits Syst* **9**, 670–677 (2015).
108. Fernandez, M. L., Upton, Z., Edwards, H., Finlayson, K. & Shooter, G. K. Elevated uric acid correlates with wound severity. *Int Wound J* **9**, 139–149 (2012).
109. Smart bandage with wireless connectivity for uric acid biosensing as an indicator of wound status - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388248115000946>.
110. Thiha, A. & Ibrahim, F. A Colorimetric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Detection Platform for a Point-of-Care Dengue Detection System on a Lab-on-Compact-Disc. *Sensors (Basel)* **15**, 11431–11441 (2015).
111. Biela, A. *et al.* Disposable MMP-9 sensor based on the degradation of peptide cross-linked hydrogel films using electrochemical impedance spectroscopy. *Biosens Bioelectron* **68**, 660–667 (2015).
112. Liu, Y. *et al.* Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* **32**, 117–119 (2009).
113. Li, G. *et al.* Expression and Influence of Matrix Metalloproteinase-9/Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 and Vascular Endothelial Growth Factor in Diabetic Foot Ulcers. *Int J Low Extrem Wounds* **16**, 6–13 (2017).
114. EP 2671081 A2 20131211 - WOUND PROGNOSIS. <https://data.epo.org/gpi/EP2671081A2-WOUND-PROGNOSIS>.
115. Schechter, I. & Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **27**, 157–162 (1967).
116. Gross, J. & Lapiere, C. M. COLLAGENOLYTIC ACTIVITY IN AMPHIBIAN

- TISSUES: A TISSUE CULTURE ASSAY*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**, 1014–1022 (1962).
117. Bauer, E. A., Eisen, A. Z. & Jeffrey, J. J. Immunologic relationship of purified human skin collagenase to other human and animal collagenases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **206**, 152–160 (1970).
118. Chantrain, C. & DeClerck, Y. A. Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Med Sci (Paris)* **18**, 565–575 (2002).
119. Rio, M. C. From a unique cell to metastasis is a long way to go: clues to stromelysin-3 participation. *Biochimie* **87**, 299–306 (2005).
120. Visse, R. & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* **92**, 827–839 (2003).
121. Bode, W., Gomis-Rüth, F. X. & Stöckler, W. Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the ‘metzincins’. *FEBS Lett* **331**, 134–140 (1993).
122. Vandembroucke, R. E. & Libert, C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nature Reviews Drug Discovery* **13**, 904–927 (2014).
123. Pei, D. CA-MMP: a matrix metalloproteinase with a novel cysteine array, but without the classic cysteine switch. *FEBS Lett* **457**, 262–270 (1999).
124. Velasco, G. *et al.* Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J Biol Chem* **274**, 4570–4576 (1999).
125. Folgueras, A. R., Pendas, A. M., Sanchez, L. M. & Lopez-Otin, C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 411–424 (2004).
126. Wart, H. E. V. & Birkedal-Hansen, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *PNAS* **87**, 5578–5582 (1990).
127. Gururajan, R., Grenet, J., Lahti, J. M. & Kidd, V. J. Isolation and Characterization of Two Novel Metalloproteinase Genes Linked to the Cdc2L Locus on Human Chromosome 1p36.3. *Genomics* **52**, 101–106 (1998).
128. Murphy, G. & Knäuper, V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the ‘hemopexin’ domain? *Matrix Biol* **15**, 511–518 (1997).
129. Löffek, S., Schilling, O. & Franzke, C.-W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *European Respiratory Journal* **38**, 191–208 (2011).
130. Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L. & Matrisian, L. M. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* **18**, 1135–1149 (2000).
131. Welgus, H. G. *et al.* A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human

- skin fibroblasts. *J Biol Chem* **254**, 1938–1943 (1979).
132. Maskos, K. & Bode, W. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol Biotechnol* **25**, 241–266 (2003).
133. David, A. Protéomique fonctionnelle des Métalloprotéases Matricielles (MMPs) dédiée à la détection des formes actives de MMPs dans des protéomes complexes. (Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2007).
134. Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E. & Iwata, K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Letters* **298**, 29–32 (1992).
135. Pietschnig, R. Polymers with pendant ferrocenes. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 5216–5231 (2016).
136. Ebelmen, M. M. Ebelmen *Ann. Chim. Phys.*, 16 (1846), p. 129. *Ann. Chim. Phys.*, 129 (1846).
137. Ebelmen, M. M. Ebelmen, C.R.Acad. Sci. 25 (1847), p. 854. *C.R.Acad. Sci.* **25**, 854 (1847).
138. Graham, T. XXXV.—On the properties of silicic acid and other analogous colloidal substances. *J. Chem. Soc.* **17**, 318–327 (1864).
139. Quand l'air et l'eau remplacent le pétrole. *Le Monde.fr* (1977).
140. Zha, J. & Roggendorf, H. Sol–gel science, the physics and chemistry of sol–gel processing, Ed. by C. J. Brinker and G. W. Scherer, Academic Press, Boston 1990, xiv, 908 pp., bound—ISBN 0-12-134970-5. *Advanced Materials* **3**, 522–522 (1991).
141. Golub, A. A., Zubenko, A. I. & Zhmud, B. V. γ -APTES Modified Silica Gels: The Structure of the Surface Layer. *Journal of Colloid and Interface Science* **179**, 482–487 (1996).
142. Shiomi, T., Matsui, M., Mizukami, F. & Sakaguchi, K. A method for the molecular imprinting of hemoglobin on silica surfaces using silanes. *Biomaterials* **26**, 5564–5571 (2005).
143. Ruiz-Cañas, M. C., Corredor, L. M., Quintero, H. I., Manrique, E. & Romero Bohórquez, A. R. Morphological and Structural Properties of Amino-Functionalized Fumed Nanosilica and Its Comparison with Nanoparticles Obtained by Modified Stöber Method. *Molecules* **25**, (2020).
144. Stamenkovic, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Seminars in Cancer Biology* **10**, 415–433 (2000).
145. Bank, R. P. D. RCSB PDB - 4FU4: Human collagenase 3 (MMP-13) with peptide from pro-domain. <https://www.rcsb.org/structure/4FU4>.
146. Bode, W. *et al.* The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity. *EMBO J* **13**, 1263–1269 (1994).
147. Blast results [running].
<https://www.uniprot.org/blast/uniprot/B20210411A2A5A37CD3FF71F97605B695F360A9F>

A002B48V.

148. Rawlings, N. D. *et al.* The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research* **46**, D624–D632 (2018).
149. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M. & Brenner, S. E. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* **14**, 1188–1190 (2004).
150. Grinnell, F. & Zhu, M. Identification of neutrophil elastase as the proteinase in burn wound fluid responsible for degradation of fibronectin. *J Invest Dermatol* **103**, 155–161 (1994).
151. Grinnell, F. & Zhu, M. Fibronectin degradation in chronic wounds depends on the relative levels of elastase, alpha1-proteinase inhibitor, and alpha2-macroglobulin. *J Invest Dermatol* **106**, 335–341 (1996).
152. Herrick, S. E. *et al.* Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers. *Am J Pathol* **141**, 1085–1095 (1992).
153. Weitz, J. I., Landman, S. L., Crowley, K. A., Birken, S. & Morgan, F. J. Development of an assay for in vivo human neutrophil elastase activity. Increased elastase activity in patients with alpha 1-proteinase inhibitor deficiency. *J Clin Invest* **78**, 155–162 (1986).
154. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* **13**, 159–175 (2013).
155. Ferreira, A. V. *et al.* Detection of human neutrophil elastase (HNE) on wound dressings as marker of inflammation. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**, 1443–1454 (2017).
156. Vasconcelos, A., Pêgo, A. P., Henriques, L., Lamghari, M. & Cavaco-Paulo, A. Protein Matrices for Improved Wound Healing: Elastase Inhibition by a Synthetic Peptide Model. *Biomacromolecules* **11**, 2213–2220 (2010).
157. Vasconcelos, A. *et al.* Tailoring elastase inhibition with synthetic peptides. *European Journal of Pharmacology* **666**, 53–60 (2011).
158. Hasmann, A. *et al.* Sensor materials for the detection of human neutrophil elastase and cathepsin G activity in wound fluid. *Exp Dermatol* **20**, 508–513 (2011).
159. Jebors, S. *et al.* Bioorganic hybrid OMS by straightforward grafting of trialkoxysilyl peptides. *J. Mater. Chem. B* **1**, 2921–2925 (2013).
160. Ciccione, J. *et al.* Unambiguous and Controlled One-Pot Synthesis of Multifunctional Silica Nanoparticles. *Chem. Mater.* **28**, 885–889 (2016).
161. Pinese, C. *et al.* Simple and Specific Grafting of Antibacterial Peptides on Silicone Catheters. *Advanced Healthcare Materials* **5**, 3067–3073 (2016).
162. Drexler, C., Milne, M., Morgan, E., Jennings, M. & Kraatz, H.-B. Synthesis and characterization of new ferrocene peptide conjugates. *Dalton Trans* 4370–4378 (2009) doi:10.1039/b817670a.
163. Miklán, Z. *et al.* New ferrocene containing peptide conjugates: Synthesis and effect on human leukemia (HL-60) cells. *Peptide Science* **88**, 108–114 (2007).

164. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* (1963) doi:10.1021/ja00897a025.
165. Kim, J.-K. *et al.* Effects of polymer grafting on a glass surface for protein chip applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **33**, 67–75 (2004).
166. Mesoporous Silica-Coated Gold Nanorods with Designable Anchor Peptides for Chemo-Photothermal Cancer Therapy | ACS Applied Nano Materials. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsanm.0c00311>.
167. Complexity in Nanoparticle Assembly and Function Obtained by Direct-Grafted Peptides | Langmuir. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la903466b>.
168. Pinese, C. *et al.* Bioactive peptides grafted silicone dressings: A simple and specific method. *Materials Today Chemistry* **4**, 73–83 (2017).
169. Masurier, N. *et al.* Site-specific grafting on titanium surfaces with hybrid temporin antibacterial peptides. *J. Mater. Chem. B* **6**, 1782–1790 (2018).
170. Echalié, C. *et al.* Selective homodimerization of unprotected peptides using hybrid hydroxydimethylsilane derivatives. *RSC Adv.* **6**, 32905–32914 (2016).
171. Jebors, S. *et al.* A New Way to Silicone-Based Peptide Polymers. *Angewandte Chemie International Edition* **54**, 3778–3782 (2015).
172. Mishra, B. *et al.* Site specific immobilization of a potent antimicrobial peptide onto silicone catheters: evaluation against urinary tract infection pathogens. *J. Mater. Chem. B* **2**, 1706–1716 (2014).
173. Byun, I., Coleman, A. & Kim, B. Transfer of thin Au films to polydimethylsiloxane (PDMS) with reliable bonding using (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPTMS) as a molecular adhesive. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **23**, 085016 (2013).
174. Gothe, P. K., Gaur, D. & Gopal Achanta, V. MPTMS self-assembled monolayer deposition for ultra-thin gold films for plasmonics. *Journal of Physics Communications* **2**, 035005 (2018).
175. Tanuma, S., Powell, C. J. & Penn, D. R. Calculation of electron inelastic mean free paths (IMFPs) VII. Reliability of the TPP-2M IMFP predictive equation. *Surface and Interface Analysis* **35**, 268–275 (2003).
176. Daniels, J. S. & Pourmand, N. Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. *Electroanalysis* **19**, 1239–1257 (2007).
177. Willis, M. Dielectric and Electronic Properties of Biological Materials: by R Pethig. pp 376. John Wiley & Sons, Chichester and New York. 1979. £15. *Biochemical Education* **8**, 31 (1980).
178. Castro-Giráldez, M., Fito, P. J. & Fito, P. Application of microwaves dielectric spectroscopy for controlling pork meat (*Longissimus dorsi*) salting process. *Journal of Food Engineering* **97**, 484–490 (2010).
179. Castro-Giráldez, M., Botella, P., Toldrá, F. & Fito, P. Low-frequency dielectric

spectrum to determine pork meat quality. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **11**, 376–386 (2010).

180. Wang, L. *et al.* A sensitive DNA capacitive biosensor using interdigitated electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* **87**, 646–653 (2017).

181. Alexander, F., Price, D. & Bhansali, S. Optimization of interdigitated electrode (IDE) arrays for impedance based evaluation of Hs 578T cancer cells. *Journal of Physics: Conference Series* **224**, 012134 (2010).

182. Choi, A., Park, J. & Jung, H.-I. Solid-medium-integrated impedimetric biosensor for real-time monitoring of microorganisms. *Sensors and Actuators B: Chemical* **137**, 357–362 (2009).

183. SAGGIN, B. *et al.* A Flexible Biopolymer based UHF RFID-Sensor for food quality monitoring. in *2019 IEEE International Conference on RFID Technology and Applications (RFID-TA)* 484–487 (2019). doi:10.1109/RFID-TA.2019.8892248.

Conception d'un capteur impédancemétrique à base de peptides pour surveiller l'activité enzymatique de la protéase liée à l'inflammation des plaies :
Vers un pansement intelligent et connecté

Résumé : Notre objectif est de mettre au point un nouveau dispositif capable de détecter une activité enzymatique liée à l'inflammation ou à l'infection des plaies. Ce dispositif sans fil, intégré au pansement serait capable de transmettre un signal électrique permettant de suivre l'évolution de la plaie. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons conçu la partie communicante : le capteur. Nous avons sélectionné comme biomarqueur une protéase surexprimée dans les plaies chroniques : la MMP-13. Cette métalloprotéase matricielle témoigne d'une inflammation anormale. La conception du capteur repose sur la modification de sa surface avec un matériau préparé à partir des séquences de peptides reconnues et spécifiques de ces protéases. Ces matériaux innovants sont synthétisés par le procédé sol-gel à partir de peptides hybrides. Ils possèdent un ou plusieurs groupes alcoxysilanes capables de former un réseau tridimensionnel par polymérisation à la surface du capteur. Afin d'améliorer la sensibilité du capteur, nous avons rajouté un groupement métallocène aux peptides qui seront dégradés, ce qui permet de modifier significativement le signal électrique. Les propriétés physicochimiques du matériau hybride ont été étudiées par différentes techniques spectroscopiques et par microscopie. Elles ont permis de valider le greffage covalent du matériau hybride sur le capteur ainsi que la dégradation spécifique de ce matériau par une activité enzymatique. Enfin, il a été possible de détecter l'activité de l'enzyme par mesure électrique d'impédance en utilisant des électrodes d'or greffées avec des peptides hybrides. Ces travaux ouvrent la voie à la mise au point de dispositifs RFID à faible coût et à leur intégration dans des pansements, ce qui pourrait permettre de concevoir des dispositifs intelligents.

Mots clés : peptides hybrides, sol-gel, plaies chroniques, pansement intelligent, activité enzymatique

Design of a peptide-based electrical sensor to monitor protease activity in wound inflammation: a smart wound dressing

Abstract: Our objective is to develop a new type of sensor based on enzymatic activity related to inflammation or infection in wounds. This wireless device, integrated into the dressing, would be able to transmit an electrical signal to monitor wound evolution. In this thesis, we focused on designing the sensor part of the device. As biomarkers, we identified a protease that is over-expressed in chronic wounds: the MMP-13. This matrix metalloproteinase indicates inflammation. The design of the sensor relies on surface modification a biomaterial composed of specific peptide sequences which are substrates of the target protease. These innovative materials are prepared by sol-gel process from hybrid silylated peptides bearing one or several alcoxysilane groups able to form a three-dimensional network by polymerization on the sensor surface. We hypothesized that the degradation of this material would lead to a significant change in the electrical properties of the sensor to be detected, indicating active enzymes. To improve sensitivity, we added a metallocene moiety to the peptides that would be degraded, allowing a significant change in the electrical signal. Physicochemical properties of these materials were studied and allowed to validate covalent grafting of hybrid material on the sensor and specific degradation of this material by enzymatic activity. At last, impedance measurement confirmed that this type of sensor was able to detect MMP-13 activity. This work paves the way to the design of a smart dressing in which a RFID sensor will be integrated.

Key words: hybrid peptides, sol-gel, chronic wounds, smart wound dressing, enzymatic activity