

Université de Montréal

**Développement de matériaux à base de protéines extraites
du byssus de la moule bleue *Mytilus edulis***

par
Frédéric Byette

Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D.)
en chimie

Mars 2016

© Frédéric Byette, 2016

Résumé

Le byssus est un amas de fibres que les moules produisent afin de s'ancrer aux surfaces immergées sous l'eau. Ces fibres sont pourvues de propriétés mécaniques impressionnantes combinant rigidité, élasticité et ténacité élevées. De plus, elles possèdent un comportement d'auto-guérison de leurs propriétés mécaniques en fonction du temps lorsque la contrainte initialement appliquée est retirée. Les propriétés mécaniques de ces fibres sont le résultat de l'agencement hiérarchique de protéines de type copolymère blocs riches en collagène et de la présence de métaux formant des liens sacrificiels réversibles avec certains acides aminés comme les DOPA et les histidines. Bien que cette fibre soit très intéressante pour la production de matériaux grâce à son contenu élevé en collagène potentiellement biocompatible, cette ressource naturelle est traitée comme un déchet par les mytiliculteurs. L'objectif de cette thèse était de valoriser cette fibre en extrayant les protéines pour générer une nouvelle classe de matériaux biomimétiques.

Un hydrolysate de protéines de byssus (BPH) riche en acides aminés chargés, i.e. ~30 % mol, et permettant de former des films a pu être généré. Lorsque solubilisé à pH 10.5, le BPH forme un hydrogel contenant des structures en triple hélice de collagène et des feuillettes β anti-parallèles intra- et inter-moléculaires. Suite à l'évaporation de l'eau, le film de BPH résultant est insoluble en milieu aqueux à cause des structures secondaires très stables agissant comme points de réticulation effectifs. Les propriétés mécaniques des films de BPH sont modulables en fonction du pH. Au point isoélectrique ($pI = 4.5$), les interactions électrostatiques entre les charges opposées agissent comme points de réticulation et augmentent la rigidité des films et leur contrainte à la rupture sans affecter la déformation à la rupture. À pH plus élevé ou plus bas que le pI , les performances mécaniques des films sont plus faibles à cause de la répulsion entre les groupements fonctionnels de même charge qui interagissent plutôt avec les molécules d'eau et causent le gonflement de la matrice protéique des films.

Le BPH contenant un nombre élevé d'acides aminés chargés et réactifs, nous avons pu réticuler les films de manière covalente à l'aide d'EDC ou de glutaraldéhyde. Les propriétés mécaniques des films sont modulables en fonction de la concentration d'EDC utilisée lors de la réticulation ou en employant du glutaraldéhyde comme agent réticulant. Les films sont à la

fois plus rigides et plus forts avec un degré de réticulation élevé, mais perdent leur extensibilité à mesure que les segments libres de s'étirer lors d'une traction deviennent entravés par les points de réticulation. La réticulation augmente également la résistance à la dégradation enzymatique par la collagénase, les films les plus fortement réticulés lui étant pratiquement insensibles. La spectroscopie infrarouge montre enfin que la réticulation entraîne une transition de feuilletts β anti-parallèles inter-moléculaires vers des structures de type hélices de collagène/PPH hydratées.

Des liens sacrificiels ont été formés dans les films de BPH par traitement au pI et/ou avec différents métaux, i.e. Na^+ , Ca^{2+} , Fe^{3+} , afin de moduler les propriétés mécaniques statiques et d'évaluer le rôle de ces traitements sur le comportement d'auto-guérison lors de tests mécaniques cycliques avec différents temps de repos. Plus la valence des ions métalliques ajoutés augmente, plus les propriétés mécaniques statiques affichent un module, une contrainte à la rupture et une ténacité élevés sans toutefois affecter la déformation à la rupture, confirmant la formation de liens sacrificiels. Les tests mécaniques cycliques montrent que les traitements au pI ou avec Ca^{2+} créent des liens sacrificiels ioniques réversibles qui mènent à un processus d'auto-guérison des performances mécaniques dépendant du pH. L'ajout de Fe^{3+} à différentes concentrations module les performances mécaniques sur un plus large intervalle et la nature plus covalente de son interaction avec les acides aminés permet d'atteindre des valeurs nettement plus élevées que les autres traitements étudiés. Le Fe^{3+} permet aussi la formation de liens sacrificiels réversibles menant à l'auto-guérison des propriétés mécaniques. Les spectroscopies Raman et infrarouge confirment que le fer crée des liaisons avec plusieurs acides aminés, dont les histidines et les DOPA.

Les résultats dans leur ensemble démontrent que les films de BPH sont des hydrogels biomimétiques du byssus qui peuvent être traités ou réticulés de différentes façons afin de moduler leurs performances mécaniques. Ils pourraient ainsi servir de matrices pour des applications potentielles dans le domaine pharmaceutique ou en ingénierie tissulaire.

Mots-clés : Byssus, Protéines, Réticulation, Spectroscopie, Propriétés mécaniques, Liens sacrificiels, Biomimétisme

Abstract

The byssus is a set of protein-based anchoring threads produced by marine mussels to tether to water immersed surfaces. These fibers have impressive mechanical properties combining stiffness, elasticity and toughness, as well as a self-healing behavior of their mechanical performance upon rest following removal of stress. These properties are the result of collagen-rich block copolymer-like proteins hierarchically assembled and of the presence of organo-metallic reversible sacrificial bonds. Even though these fibers have outstanding mechanical properties and a high content of potentially biocompatible collagen, the mussel farming industry still treats them as a waste. The main objective of this thesis was to use byssus as a sustainable biological feedstock to produce a new family of biomimetic protein-based materials.

We developed a method to produce a byssus protein hydrolyzate (BPH) rich in charged amino acids (~30 % mol) and with good film-forming capabilities. A hydrogel rich in inter- and intra-molecular anti-parallel β -sheets and in collagen triple helical structures forms following the BPH solubilization at pH 10.5. After evaporation of water, the resulting film is insoluble in aqueous media as a result of the BPH self-assembly into stable secondary structures. The mechanical properties of the films are pH-responsive owing to their high electrostatic charges content that act like effective crosslinking points at the isoelectric point (pI = 4.5), but causes swelling of the protein matrix and loss of mechanical performance at pH higher or lower than the pI. The strain at fracture remains constant, which increases the toughness of the materials when moving toward the pI.

The high content in charged and reactive amino acids was used to covalently crosslink the BPH films using either EDC or glutaraldehyde. Increasing the crosslinking degree gives rise to stiffer and stronger films but leads to a loss of extensibility as a consequence of protein chains being trapped by the crosslinking points. The crosslinked films become resistant to collagenase degradation even though infrared spectroscopy shows the conversion of aggregated strands to hydrated collagen/PPII related structures following the crosslinking reaction. Thus, the crosslinked collagen-related structural elements hinder the collagenase action on the BPH films.

Sacrificial bonds were formed in the BPH films by treatments at their pI and/or with various metallic ions, i.e. Na^+ , Ca^{2+} , Fe^{3+} , in order to tune the mechanical properties and to evaluate the role of sacrificial bonds on the self-healing behavior during cyclic mechanical testing. Using metallic ions of higher valence to treat the films results in an increase of the modulus, strength and toughness without reducing the strain at fracture, confirming the formation of organo-metallic sacrificial bonds. Cyclic mechanical testing shows that pI and Ca^{2+} treatments create reversible ionic sacrificial bonds that induce a pH-dependent self-healing behavior. Fe^{3+} addition at various concentrations enables tuning the mechanical performances over a larger interval and to reach higher values than other treatments. This behavior is attributed to the more covalent nature of the iron-amino acids bonding and to the affinity of iron with numerous amino acids, including histidines and DOPA, as detected using Raman and infrared spectroscopy. Iron addition also leads to the formation of reversible sacrificial bonds that procure a self-healing behavior of the mechanical properties to BPH films.

Altogether, our results show that the BPH films are byssus biomimetic hydrogels whose mechanical properties can be tuned by using various treatments or crosslinking reactions. The materials could thus find a niche as protein matrix in domains such as the pharmaceutical industry or soft tissue engineering.

Keywords : Byssus, Proteins, Crosslinking, Spectroscopy, Mechanical properties, Sacrificial bonds, Biomimetism

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des symboles et abréviations	xv
Remerciements	xvii
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 Le biomimétisme et les biopolymères pour le développement de matériaux de pointe	1
1.2 Les protéines pour la confection de matériaux	3
1.2.1 Structures et auto-assemblage des protéines.....	3
1.2.2 Protéines fibreuses : exemples de la relation structure-fonction	7
1.2.3 Polyampholytes biologiques	9
1.2.4 Applications biomédicales et ingénierie tissulaire.....	11
1.3 Origine et contrôle des propriétés mécaniques de matériaux protéiques.....	13
1.3.1 Méthodes de réticulation covalente	15
1.3.2 Méthodes de réticulation physique non-covalente : altération de la structure secondaire	18
1.3.3 Liens sacrificiels et longueur de segments enfouis.....	20
1.4 Le byssus de la moule, un déchet à valoriser.....	25
1.4.1 Structure hiérarchique du byssus et de son contenu en protéines.....	26
1.4.2 Mécanisme d'adhésion du byssus.....	29
1.4.3 Propriétés mécaniques des fibres de byssus.....	29
1.5 Objectifs de la thèse	33
1.6 Contenu de la thèse	35
1.7 Références.....	36
Chapitre 2 : Self-assembled pH-responsive Films Prepared from Mussel Anchoring Threads.....	46

2.1	Abstract.....	46
2.2	Introduction.....	47
2.3	Materials and methods.....	49
2.3.1	Materials.....	49
2.3.2	Methods.....	49
2.4	Results and discussion.....	52
2.4.1	Byssal protein hydrolyzate (BPH) isolation and characterization.....	52
2.4.2	Film-forming ability of the BPH and structural characterization by FTIR.....	55
2.4.3	pH-responsive swelling and mechanical properties.....	59
2.4.4	FTIR study of the BPH self-assembly and hydrogelation during film formation.....	63
2.5	Conclusion.....	66
2.6	Acknowledgements.....	67
2.7	References.....	67
2.8	Supporting information.....	70
	Chapitre 3 : Covalently Crosslinked Mussel Byssus Protein-Based Materials with Tunable Mechanical Properties.....	73
3.1	Abstract.....	73
3.2	Introduction.....	74
3.3	Material and Methods.....	75
3.3.1	Materials.....	75
3.3.2	Methods.....	76
3.4	Results and discussion.....	80
3.4.1	Free amino groups and degree of crosslinking.....	80
3.4.2	Tensile mechanical properties.....	82
3.4.3	Resistance to enzymatic degradation.....	84
3.4.4	Infrared spectroscopy analysis of the pristine and crosslinked BPH films.....	86
3.5	Conclusion.....	91
3.6	Acknowledgments.....	92
3.7	References.....	92
3.8	Supporting information.....	95

Chapitre 4 : Metal-Ligand Interactions and Salt Bridges as Sacrificial Bonds in Mussel Byssus-Derived Materials	100
4.1 Abstract.....	100
4.2 Introduction.....	101
4.3 Material and Methods	102
4.3.1 Materials	102
4.3.2 Methods.....	103
4.4 Results and discussion	106
4.4.1 Effect of metal addition on tensile mechanical properties.....	106
4.4.2 Investigation of the metal-ligand interactions at the molecular scale.....	109
4.4.3 Mechanical performance and self-healing behavior under cyclic loads.....	113
4.5 Conclusion	121
4.6 References.....	121
4.7 Supporting information.....	124
Chapitre 5 : Conclusion	133
5.1 Conclusions générales.....	133
5.1.1 Extraction des protéines de byssus et mise en forme des matériaux	133
5.1.2 Effet du pH sur les films de BPH.....	134
5.1.3 Effet de la réticulation covalente sur les films de BPH	135
5.1.4 Liens sacrificiels dans les films de BPH.....	137
5.2 Perspectives.....	139
5.2.1 Production de peptides et protéines avec capacité d'auto-assemblage.....	140
5.2.2 Hiérarchie des structures et rôle des interfaces dans les matériaux	146
5.3 Références.....	150
Annexe I: Spectres FTIR de protéines, dérivées secondes et spectres de différence	xviii

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Systèmes biologiques et leurs particularités ayant mené au développement de technologies biomimétiques.....	2
Tableau 1.2. Structure et nomenclature des 20 acides aminés naturels retrouvés dans les systèmes biologiques.....	4
Table 2.1. Assignment of the band components in the Amide I region.....	58
Table 2.2. Tensile mechanical properties of hydrated BPH films treated in buffers at various pH. The bottom lines demonstrate the reversibility of the pH-responsive tensile mechanical properties.	60
Table 2.S1. Amino acid composition of the byssus thread and of the BPH extract (residues/1000).....	70
Table 3.1. Uniaxial tensile mechanical properties of the pristine BPH films and the EN and GTA crosslinked BPH films.....	84
Table 4.1. Modulus, ultimate tensile strength (UTS) and strain at fracture (SF) of the different BPH films investigated (average \pm standard deviation for $N \geq 5$). ..	108
Table 4.S1. Stress recovery percentage at maximum strain (35 %), after different recovery times, for the BPH materials tested by cyclic uniaxial tensile deformation. ..	130

Liste des figures

- Figure 1.1.** (a) Séquence primaire d'acides aminés montrant les carbones α , l'angle ω et les angles de torsion Φ et ψ , (b) diagramme de Ramachandran général présentant les différentes combinaisons d'angles dièdres énergétiquement favorables et certaines structures secondaires qui s'y retrouvent et (c) représentation des structures en triple hélice de collagène, feuillet- β anti-parallèle et hélice- α 5
- Figure 1.2.** Représentation des interactions dans (a) la structure tertiaire d'une protéine et (b) la structure quaternaire d'une protéine. 6
- Figure 1.3.** Schéma de l'état d'hydrogels de protéines en fonction du pH de la solution aqueuse par rapport au pI. 10
- Figure 1.4.** Gamme des modules d'élasticité de différents tissus biologiques. 14
- Figure 1.5.** Exemples de courbes de contrainte-déformation lors d'un test d'étirement d'un matériau (a) parfaitement élastique et (b) viscoélastique. 15
- Figure 1.6.** Schéma réactionnel de la réticulation covalente des groupements amines libres des protéines par le glutaraldéhyde. 16
- Figure 1.7.** Schéma réactionnel de réticulation covalente des protéines en présence de EDC et NHS. 17
- Figure 1.8.** Comparaison des courbes de traction mesurées à l'aide d'une pointe de microscope à force atomique (AFM) sur une macromolécule avec (courbe du haut) et sans (courbe du bas) liens sacrificiels. 21
- Figure 1.9.** Schéma des mécanismes menant à la grande ténacité des os, de l'échelle macroscopique à l'échelle nanoscopique. Les liens sacrificiels font partie des mécanismes à l'échelle nanoscopique permettant la plasticité des os et sont des phénomènes qui se produisent avant l'apparition des fractures. 23
- Figure 1.10.** Moule accrochée à une surface solide à l'aide de byssus et les différentes parties impliquées dans les fibres et leur formation. 26

Figure 1.11.	Photo d'une moule accrochée à une autre moule par son byssus et schéma des différentes parties composant une fibre.	27
Figure 1.12.	Schéma d'un preCol et de la disposition en paquet 6 + 1 à l'intérieur de la fibre de byssus.	28
Figure 1.13.	Schéma d'un byssus déformé à différents pourcentages de sa longueur initiale et montrant le comportement des granules dans la cuticule, avant, pendant et après la déformation.	31
Figure 1.14.	(a) Courbe de contrainte-déformation en traction de la partie distale d'une fibre de byssus jusqu'à sa rupture (noir) superposée à une courbe cyclique exercée au delà de la limite d'élasticité de la fibre. (b) Courbes cycliques entre 0 et 35 % de déformation sur une même fibre de byssus.	32
Figure 1.15.	Schéma de la déformation et de la réparation des éléments du byssus soumis à une contrainte et menant au processus d'auto-guérison des propriétés mécaniques de la fibre.	33
Figure 2.1.	Amino acid analysis of the byssus and of the BPH and (inset) SDS-PAGE of the purified BPH (lanes 2 and 3). Lane 1 presents the protein standards.	53
Figure 2.2.	Processing of the BPH films. The BPH solution goes through a hydrogel phase during the film formation, and the resulting material is water-insoluble.	55
Figure 2.3.	SEM and AFM images of the surface of the films at increasing magnification. The arrows point at fibril-like structure.	56
Figure 2.4.	FTIR spectra (top) and the respective second derivative traces (bottom) of the BPH and of a BPH-made film in the amide I region.	57
Figure 2.5.	Swelling ratio and water uptake (a) and modulus and ultimate tensile strength (UTS) (b) of the BPH films after treatments at various pH. Open symbols correspond to reversibility tests.	61
Figure 2.6.	FTIR spectra of the BPH films treated at various pH. The inset highlights the protonation of carboxylic acids (Asp, Glu and chain ends) at acidic pH, resulting in a shoulder at 1735 cm^{-1}	63

Figure 2.7.	Second derivative FTIR spectra of freeze-dried BPH solutions with different concentrations (a, d: 10 mg/mL, b, e: 20 mg/mL, and c, f: 30 mg/mL). Solutions a-c were quickly frozen, while solutions d-f were aged at room temperature for one week before being freeze-dried.	64
Figure 2.S1.	Representative tensile mechanical testing curves of the BPH films treated at various pH.	71
Figure 2.S2.	FTIR spectra of freeze-dried BPH solutions with different concentrations (a, d: 10 mg/mL, b, e: 20 mg/mL, and c, e: 30 mg/mL). Solutions a-c were quickly frozen, while solutions d-f were aged at room temperature for one week before being freeze-dried.....	71
Figure 2.S3.	FTIR spectra of the 3 macroscopic sections of a byssus single fiber (distal part, proximal part and plaque), the BPH, and a film as prepared.	72
Figure 3.2.	Representative tensile stress-strain curves for the pristine BPH films and the EN and GTA crosslinked BPH films.....	83
Figure 3.3.	(a) Resistance to collagenase degradation of the pristine, EN and GTA crosslinked BPH films after 24 h of incubation <i>in vitro</i> . Average \pm standard deviation, $N \geq 3$. (b) Optical microscopy images of the BPH films after incubation in the presence of collagenase.	86
Figure 3.4.	FTIR spectra in the Amide I region (top) and their corresponding second derivative (bottom) for pristine and crosslinked BPH films (a) before and (b) after incubation in the presence of collagenase.....	88
Figure 3.5.	Intensity ratio of the second derivative components associated to aggregated strands (1620 and 1698 cm^{-1}) and collagen-like structures (1660 , 1644 and 1632 cm^{-1}) (a) before and (b) after collagenase digestion of the BPH films.	89
Figure 3.6.	Representation of the protein network in the BPH films before and after the covalent crosslinking reaction.	91

Figure 3.S1.	Amide A (a,b), Amide I (c,d) and Amide II (e,f) regions of the FTIR spectra of the pristine and GTA-crosslinked films before (left) and after (right) incubation with collagenase.	95
Figure 3.S2.	FTIR spectra in the Amide A region for pristine and EN-crosslinked films (a) before and (b) after incubation with collagenase.	96
Figure 3.S3.	FTIR spectra in the Amide II region (top) and their corresponding second derivative curves (bottom) for pristine and EN-crosslinked films (a) before and (b) after incubation in the presence of collagenase.	97
Figure 4.1.	Representative uniaxial tensile stress-strain curves of (a) pristine (pH 10.5) films without and with treatment with 500 mM NaCl, CaCl ₂ or FeCl ₃ , (b) pI (pH 4.5) treated films without and with further treatment in 500 mM NaCl or CaCl ₂ , and of KCl pH 1 pre-treated films immersed in a 500 mM CaCl ₂ solution, and (c) pI-treated films soaked in FeCl ₃ solutions of 500, 50, 5, 0.5 and 0.05 mM.	107
Figure 4.2.	Optical and fluorescence microscopy images of BPH films treated in the conditions indicated.....	110
Figure 4.3.	(a) Raman spectra of pI-treated BPH films incubated with FeCl ₃ solutions of different concentrations and (b) FTIR spectra of the same films in the Amide II region and their difference spectra relative to pI-treated films.	112
Figure 4.4.	Representative cyclic tensile testing curves for the pI-treated films stretched in (a) a water bath and (b) a bath containing 500 mM NaCl.....	115
Figure 4.5.	Modulus (a), toughness (b), and work hysteresis (c) of pI-treated BPH films measured during cyclic tensile deformation in distilled water or in a 500 mM NaCl solution.....	115
Figure 4.6.	Modulus (a), toughness (b) and work hysteresis (c) values of BPH films pre-conditioned at three different pH (pI = 4.5, pristine = 10.5, and 1), further treated with 500 mM CaCl ₂ and measured under cyclic tensile deformation in a bath at a pH similar to their pre-treatment.	117

Figure 4.7.	Modulus (a), toughness (b) and work hysteresis (c) values of pI pre-treated BPH films treated with various FeCl ₃ concentrations and measured during the cyclic tensile deformation in a water bath.....	119
Figure 4.S1.	FTIR spectra of BPH films treated in the various conditions presented in this study.	124
Figure 4.S2.	FTIR spectra in the Amide II region of the pristine films, pI-treated films and pH 1 pre-treated films further incubated with 500 mM CaCl ₂	125
Figure 4.S3.	Overlay of an uniaxial stress-strain experiment (black curve) and of a cyclic experiment with incrementing strain (colored dashed curves) performed on (a) a pI-treated BPH film and (b) a 500 mM FeCl ₃ treated film in a water bath at 37 °C.....	126
Figure 4.S4.	Cyclic tension testing of pristine BPH films in (a) a distilled water bath and (b) a pH 10.5 buffer bath.....	127
Figure 4.S5.	Modulus (a), toughness (b) and work hysteresis (c) values measured during the cyclic tensile deformation of pristine BPH films in distilled water or in a pH 10.5 bath.	128
Figure 4.S6.	Representative cyclic tensile testing curves for BPH films treated in a 500 mM CaCl ₂ solution, for (a) pI-treated films stretched in a distilled water bath, (b) pristine films stretched in a pH 10.5 bath, and (c) pH 1 pre-treated films stretched in a pH 1 bath.....	128
Figure 4.S7.	Representative cyclic tensile testing curves for pI-treated BPH films further treated with FeCl ₃ solutions of (a) 500 mM, (b) 50 mM, (c) 5 mM, (d) 0.5 mM and (e) 0.05 mM. All samples were stretched in a distilled water bath.	129
Figure 4.S8.	Modulus recovery relative to the initial value for the various recovery times between the uniaxial tensile cycles. Results show the effects of (a) the bath pH on pristine films; (b) the presence of 500 mM NaCl in the testing bath on pI-treated films; (c) bath pH on CaCl ₂ -treated films; and (d) FeCl ₃ treatment at different concentrations on pI-treated films.	131

Figure 4.S9.	Toughness recovery relative to the initial value for the various recovery time between the uniaxial tensile cycles showing the effects of (a) the bath pH on the pristine films; (b) the presence of 500 mM NaCl in the testing bath on pI-treated films; (c) bath pH on CaCl ₂ -treated films; and (d) FeCl ₃ treatment at different concentrations on pI-treated films.	132
Figure 5.1.	Structure d'un peptide amphiphile montrant (a) ses différents domaines et (b) sa représentation en 3D. (c) Schéma de l'auto-assemblage en micelle cylindrique formant un réseau de fibrilles biomimétique de la matrice extra-cellulaire retrouvée dans les os.	142
Figure 5.2.	Représentation d'un peptide RADA 16-I, composé de 16 acides aminés alternant les motifs hydrophiles arginine (R, +) et aspartate (D, -) avec les motifs hydrophobes alanine (A).	143
Figure 5.3.	Schéma représentant la méthode de production de copolymère blocs à base de protéines.	145
Figure 5.4.	Exemples démontrant l'impact des interfaces sur les propriétés de matériaux biologiques	148
Figure I.I.	Illustration du traitement mathématique impliqué dans le calcul d'une dérivée seconde sur un spectre infrarouge. Reproduite de la référence 6 © 2007 avec la permission de John Wiley & Sons, Inc.	xix
Figure I.II.	Spectre infrarouge d'une fibre de soie dans la région amide I (rouge) et sa dérivée seconde (bleu), incluant l'attribution des différentes composantes détectées.	xx
Figure I.III.	Spectres infrarouge et leurs spectres de différence dans les régions amide I et II enregistrés lors de l'application d'une contrainte mécanique (extension) sur des caillots de fibrine.	xxi

Liste des symboles et abréviations

A, Ala: Alanine

AAA: Amino acid analysis / Analyse des acides aminés

ADN: Acide désoxyribonucléique

AFM: Atomic force microscopy / Microscopie à force atomique

ATR: Attenuated total reflectance / Réflexion totale atténuée

BPH: Byssus protein hydrolyzate / Hydrolysats de protéines de byssus

cm⁻¹: Nombre d'onde

D, Glu: Glutamate

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine

E, Asp: Aspartate

EDC: 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EN: EDC-NHS

FEG: Field emission gun / Canon à effet de champ

FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy / Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

G, Gly: Glycine

GTA: Glutaraldéhyde

His: Histidine

HPLC: High pressure liquid chromatography / Chromatographie liquide haute pression

K, Lys: Lysine

kDa: kiloDalton = kg/mol

MES: 2-morpholinoethane sulphonic acid

Mfp: Mussel foot proteins / Protéines du pied de la moule

MWCO: Molecular weight cut off / Limite de poids moléculaire

NA : Numerical aperture / Ouverture numérique

NHS: N-hydroxysuccinimide

P, Pro : Proline

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis / Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

PBS: Phosphate buffer saline / Solution saline tamponnée au phosphate

pI: Point isoélectrique

PPII: Polyproline II

Pro: Proline

R, Arg: Arginine

RGD: Arginine-Glycine-Acide aspartique

rpm: Rotation par minute

SDS: Sodium dodecyl sulfate

SEM: Scanning electron microscopy / Microscopie électronique à balayage

SF / SB: Strain at fracture / Strain at break / Déformation à la rupture

TES: 2-[[1,3-dihydroxy-2-(hydroxyméthyl)propan-2-yl]amino]ethanesulfonic acid

T_g: Glass transition temperature / Température de transition vitreuse

TMP: Thread matrix protein / Protéine de matrice de la fibre de byssus

TNBS: 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid

Tris: 2-Amino-2-hydroxyméthyl-propane-1,3-diol

UTS: Ultimate tensile strength / Contrainte ultime

UV: Ultraviolet

V, Val : Valine

α : Structures secondaires des protéines (hélices)

β : Structures secondaires des protéines (Feuillets, coude ou spirale)

ϵ : Déformation dans le contexte de propriétés mécaniques

ϵ : Groupement amine terminal (lysine)

σ : Contrainte

Φ, Ψ : Angles de torsion du squelette peptidique

ω : Angle de torsion entre le carbonyle et l'azote de l'amide du squelette peptidique

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier mes directeurs de thèse Christian Pellerin et Isabelle Marcotte qui m'ont encouragé à entreprendre mes études au Ph.D. et soutenu tout au long de mon parcours. Vous m'avez grandement aidé à évoluer dans le domaine de la chimie physique des polymères, de la chimie des matériaux et de la biophysique des protéines. Grâce à vous, j'ai pu acquérir des compétences multidisciplinaires qui me seront certainement utiles tout au long de ma future carrière. Je suis très heureux de vous avoir vu cheminer dans votre carrière, à travers vos accomplissements tant personnels que professionnels.

Je remercie aussi Sylvain Essiembre et Pierre Ménard Tremblay pour toute l'aide apportée sur le plan technique lors de mes études et pour tous les échanges intéressants que nous avons eus. Un grand merci aux membres des groupes de recherche des Pr. Pellerin et Pr. Marcotte : Alexandre A. Arnold, Andrée Gravel, Souryvanh Nirasay, Marie Richard-Lacroix, Damien Mauran, Audrey Laventure et Xiaoxiao Wang. Vous avez été à la fois des collègues, conseillers, motivateurs et amis d'une grande valeur.

Merci aux membres du Jury pour votre temps ainsi que pour les précieux conseils prodigués ayant mené à l'amélioration et au succès de cette thèse.

Enfin, je remercie de tout mon cœur ma compagne Nathalie, mes parents et beaux-parents Serge/Francine et Carole/Michel, ainsi que toute ma famille et amis qui m'ont accompagné et encouragé durant ces années d'effort; Je vous aime très fort!

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Le biomimétisme et les biopolymères pour le développement de matériaux de pointe

La vie sur notre planète est estimée être apparue il y a plus de 3,8 milliards d'années (laissons les barres d'incertitude de côté à ce niveau!), suite à un bombardement de météorites sur la surface de la terre qui aurait ainsi permis l'apparition de vie microbienne.¹ Les êtres vivants ont par la suite évolué en s'adaptant de façon à assurer leur pérennité. De nos jours, la biodiversité sur la terre est extrêmement large, et les stratégies adaptatives de plusieurs espèces en matière d'efficacité énergétique, de reproduction, de transformation des ressources, de locomotion, etc. sont des plus surprenantes. Par exemple, certaines araignées sont dotées de glandes leur permettant de produire différents types de soies avec des propriétés mécaniques combinant force, extensibilité et résilience.² Ces soies peuvent parfois servir à protéger leur progéniture grâce à des cocons, mais aussi à attraper leurs proies ou à se déplacer. En observant et en étudiant la nature, les chercheurs ont su trouver une panoplie de moyens pour générer des solutions aux défis de tous les jours. Ainsi est né le biomimétisme, soit l'innovation technologique par l'imitation de formes, de systèmes ou de phénomènes rencontrés dans la nature. Le tableau 1.1 liste quelques-unes des inventions issues du biomimétisme.

Les organismes vivants sont majoritairement composés de molécules organiques avec des assemblages particuliers permettant de remplir des rôles spécifiques et souvent multifonctionnels. Plusieurs de ces composants organiques sont des biomacromolécules ou biopolymères. Par exemple, deux des biopolymères les plus abondants sur terre se retrouvent dans les végétaux, soit la lignine et la cellulose. La lignine est composée d'unités phénoliques ramifiées alors que la cellulose est un polymère linéaire à base d'unités de D-glucoses. Leur quantité et organisation hiérarchique, à l'intérieur d'un arbre par exemple, rendent le bois à la fois fort et partiellement flexible dans une direction préférentielle. Aussi, l'exosquelette rigide servant de charpente à plusieurs insectes et crustacés est composé de chitine, un polymère composé d'unités de glucosamines N-acétylées.

Tableau 1.1. Systèmes biologiques et leurs particularités ayant mené au développement de technologies biomimétiques.

Système biologique	Particularité	Inspiration technologique
Pattes de gecko	Adhésion directionnelle à plusieurs types de surfaces	Matériaux texturés et adhésifs à base de polymères (adhésion directionnelle) ³⁻⁵
Byssus de moules	Adhésion à des surfaces submergées dans l'eau	Polymères adhésifs sur des surfaces sèches ou humides (voir section 1.4.2) ^{3,6,7}
	Auto-guérison des propriétés mécaniques	Hydrogels de polymères ayant des propriétés mécaniques auto-guérisables (voir section 1.4.3) ⁸⁻¹⁰
Feuilles de Lotus	Surface super-hydrophobe	Matériaux et revêtements auto-nettoyant ¹¹
Nacre des coquilles de mollusques	Composite organique / minéral de style brique et mortier permettant de dissiper l'énergie mécanique lors d'une contrainte	Céramiques et composites combinant force, rigidité et ténacité ^{12,13}
Fibronectine (glycoprotéine de la matrice extra-cellulaire de vertébrés)	Motif tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD) responsable de l'adhésion des cellules	Greffage de motifs RGD sur des biomatériaux polymériques pour favoriser l'adhésion, la croissance, la migration et la différenciation des cellules ¹⁴

D'autre part, les griffes des animaux sont composées de protéines (kératine) leur conférant une grande rigidité et leur permettant d'être utilisées comme arme de défense ou comme outil pour creuser, grimper, détalier en vitesse ou dépecer une proie. L'utilisation de tels biopolymères pour le développement de matériaux présente plusieurs avantages. D'un point de vue biomimétique, il favorise considérablement les chances de comprendre et de reproduire efficacement le phénomène ou système biologique voulu dans le nouveau matériau confectionné. De plus, les biopolymères sont généralement disponibles en grande quantité et sont des ressources renouvelables et biodégradables, leur utilisation s'inscrivant donc dans un contexte de développement durable. Ils offrent aussi un bon potentiel de biocompatibilité puisque ce sont des matières pouvant être reconnues, assimilées et métabolisées par le corps

humain.¹⁵ Ce sont donc généralement de bons candidats pour la préparation de biomatériaux et de produits cosmétiques et pharmaceutiques.

L'utilisation de biopolymères présente cependant certains défis. Leur provenance d'origine biologique peut entraîner des réactions immunogènes et mener au rejet des matériaux ou du système utilisé.¹⁵ Aussi, bien que les matières qu'ils constituent soient habituellement disponibles à un moindre coût, leur extraction et leur purification sont parfois longues et complexes, engendrant des coûts élevés d'ingénierie pour une production de masse. De plus, ces processus d'extraction et purification doivent être bien contrôlés afin de conserver l'intégrité des macromolécules et leurs propriétés physico- et biochimiques inhérentes. Enfin, n'ayant aucun contrôle sur la nature, il est difficile d'obtenir et d'assurer la reproductibilité entre les différents lots, ce qui peut affecter la qualité des matériaux ou système régénérés. En lien avec l'objectif principal de cette thèse, la section suivante décrit l'utilité des protéines pour la confection de matériaux.

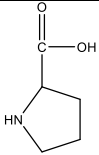
1.2 Les protéines pour la confection de matériaux

1.2.1 Structures et auto-assemblage des protéines

Les protéines sont des macromolécules constituées d'un enchaînement linéaire de plusieurs acides aminés. Il existe 20 acides aminés naturels couramment retrouvés dans les systèmes biologiques (tableau 1.2), en plus de quelques autres modifiés qui sont spécifiques à certaines protéines. Ils comportent tous un groupement amine suivi d'un atome de carbone (carbone α) avec une chaîne latérale variable suivi d'un groupement acide carboxylique. Les différents acides aminés sont assemblés par des liens amide dans la structure polypeptidique. Cette séquence se nomme la structure primaire. La particularité du squelette peptidique des protéines réside dans les angles dièdres (Φ , ψ , figure 1.1 a) qui, pour des raisons d'encombrement stérique, limitent les possibilités de repliement des chaînes peptidiques en structure bien définies, soit les structures secondaires. L'angle entre le groupement carbonyle et l'azote de l'amide est noté ω et détermine la configuration cis ou trans. Les structures secondaires sont stabilisées par des ponts hydrogène et leur assemblage est limité par la taille

et la nature des chaînes latérales des acides aminés dans la structure primaire. Le diagramme de Ramachandran rapporte les différentes structures énergétiquement favorables en fonction des angles dièdres du squelette peptidique (figure 1.1 b). Des diagrammes spécifiques pour différents acides aminés existent aussi afin de montrer leur présence dans des structures secondaires précises.

Tableau 1.2. Structure et nomenclature des 20 acides aminés naturels retrouvés dans les systèmes biologiques

$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ <p>Glycine (Gly, G)</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Alanine (Ala, A)</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Sérine (Ser, S)</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Thréonine (Thr, T)</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$ <p>Cystéine (Cys, C)</p>
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Valine (Val, V)</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Leucine (Leu, L)</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Isoleucine (Ile, I)</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Méthionine (Met, M)</p>	 <p>Proline (Pro, P)</p>
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ <p>Phénylalanine (Phe, F)</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Tyrosine (Tyr, Y)</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{Indole ring} \end{array}$ <p>Tryptophane (Trp, W)</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Acide Aspartique (Asp, D)</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Acide Glutamique (Glu, E)</p>
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Asparagine (Asn, N)</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Glutamine (Gln, Q)</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{Imidazole ring} \end{array}$ <p>Histidine (His, H)</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Lysine (Lys, K)</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Arginine (Arg, R)</p>

Les protéines se replient et s'auto-assemblent donc en structures secondaires bien précises en fonction de leur structure primaire et des conditions auxquelles elles sont exposées (température, pression, solvant, pH du milieu, force ionique, etc.). Certaines séquences primaires mènent intrinsèquement à des repliements non-structurés, alors que d'autres peuvent favoriser la formation de certaines structures seulement dans des conditions thermodynamiquement favorables bien précises.¹⁶

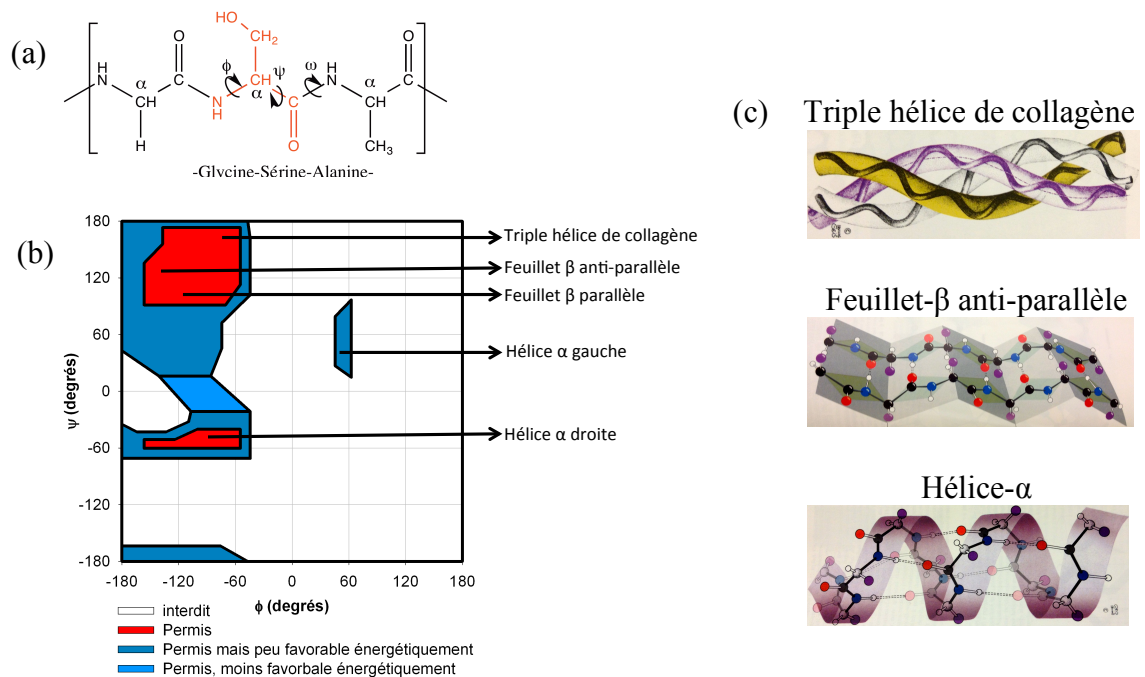


Figure 1.1. (a) Séquence primaire d'acides aminés montrant les carbones α , l'angle ω et les angles de torsion Φ et ψ , (b) diagramme de Ramachandran général présentant les différentes combinaisons d'angles dièdres énergétiquement favorables et certaines structures secondaires qui s'y retrouvent et (c) représentation des structures en triple hélice de collagène, feuillet- β anti-parallèle et hélice- α , tiré de la référence 17.

Les structures secondaires formées peuvent ensuite adopter une structure tridimensionnelle nommée structure tertiaire (figure 1.2 a). Cette dernière est généralement stabilisée par des ponts hydrogène, des interactions hydrophobes, des interactions ioniques ou

des ponts disulfure.¹⁷ Finalement, différentes sous-unités de protéines avec des structures tertiaires peuvent s'assembler pour former une superstructure quaternaire stabilisée par les moments dipolaires des différentes sous-unités (figure 1.2 b).¹⁷

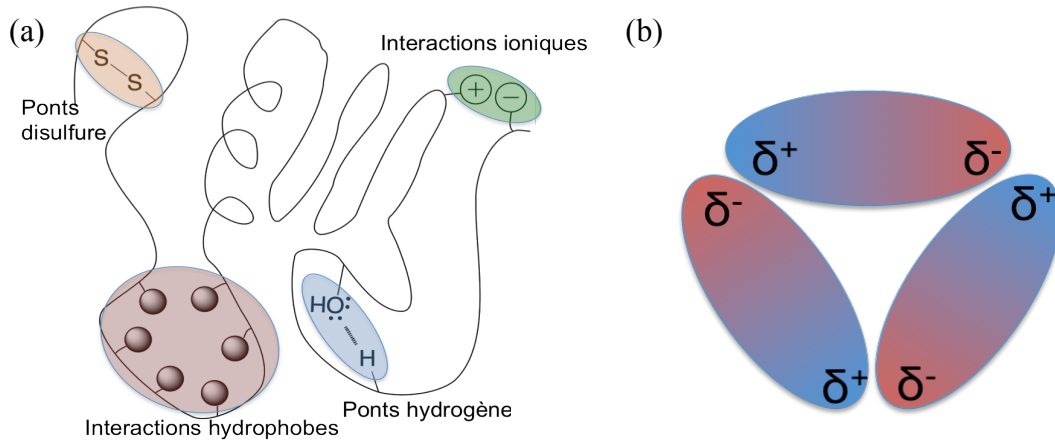


Figure 1.2. Représentation des interactions dans (a) la structure tertiaire d'une protéine et (b) la structure quaternaire d'une protéine.

Il existe deux types de protéines très répandues dans les systèmes biologiques, soit les protéines globulaires et les protéines fibreuses. Les protéines globulaires possèdent des structures primaires menant à des interactions intermoléculaires plus faibles que celles retrouvées dans les protéines fibreuses. Elles ont des structures tertiaires, et souvent quaternaires, qui leur permettent d'adopter une forme tridimensionnelle plus ou moins sphérique. De leur côté, les protéines fibreuses possèdent une structure primaire répétitive menant à des structures secondaires thermodynamiquement très stables. Différentes unités secondaires peuvent s'auto-assembler pour former des oligomères possédant des structures hélicoïdales ou sous forme de rubans. Ces structures leur procurent une forme plutôt allongée et mènent à des fibrilles ou fibres suite à leur assemblage final. Ainsi, la structure des protéines globulaires leur confère une solubilité dans l'eau, alors que celle des protéines fibreuses leur procure plutôt une insolubilité dans ce milieu. L'assemblage particulier des protéines fibreuses leur octroie des propriétés intéressantes d'un point de vue du développement de matériaux.

L'utilisation de protéines, autant celles retrouvées directement dans la nature que celles produites par bioingénierie, représente un défi de taille pour la préparation de matériaux. En effet, il faut généralement les extraire et/ou les purifier tout en tâchant de conserver l'intégrité de leur structure primaire et parfois même secondaire ou tertiaire. Cette contrainte est nécessaire d'un point de vue biomimétique puisque les propriétés des protéines (soutien mécanique, bioactivité, lubrifiant, etc.) découlent de leur assemblage particulier dans les superstructures biologiques qu'elles composent. La stratégie d'isolation des protéines la plus utilisée consiste à les solubiliser pour former des colloïdes en milieu aqueux. Il est par la suite possible de contrôler leur auto-assemblage en sélectionnant les conditions appropriées de mise en forme des matériaux (concentration, solvants, pH, température, etc.). Différentes stratégies pour modifier, générer ou contrôler les structures secondaires des protéines formant des matériaux seront décrites plus en détail à la section 1.3.2.

1.2.2 Protéines fibreuses : exemples de la relation structure-fonction

L'assemblage particulier des protéines fibreuses leur confère des propriétés physico-chimiques et mécaniques impressionnantes qui ont su attirer la curiosité des scientifiques depuis de nombreuses années.¹⁸ Le collagène, l'élastine et la soie sont trois protéines comprises dans cette grande famille qui font l'objet d'importants efforts de recherche pour le développement de matériaux.

Le collagène est la famille de protéines la plus abondante retrouvée chez les vertébrés.¹⁹ Il se retrouve dans tous les tissus conjonctifs du corps humain. Au moins 29 différents types de collagène ont été répertoriés jusqu'à maintenant, dont plusieurs sont fibrillaires.²⁰ Le collagène s'auto-assemble grâce à sa structure répétitive en acides aminés sous forme Gly-X-Y, où la glycine revient à pratiquement tous les 3 acides aminés alors que X et Y sont généralement des prolines ou hydroxy-prolines.²¹ Cette séquence primaire d'acides aminés mène d'abord à une sous-unité (chaines α) ayant une structure secondaire hélicoïdale nommée poly-proline II.^{21,22} Trois chaines α s'enroulent ensuite pour former une triple hélice, soit le motif récurrent à tous les différents types de collagène. Plusieurs de ces types de collagène s'auto-assemblent ensuite pour former des fibrilles et des fibres. Ces fibres

se retrouvent dans les tendons, les cartilages, la peau, les os, etc. Elles procurent de la rigidité aux tissus mais peu d'extensibilité. Malgré tout, le collagène est très résilient (90 % d'efficacité élastique lors de tests mécaniques cycliques) car il peut emmagasiner l'énergie mécanique fournie lors de son étirement puis la dissiper en reprenant sa forme quasi initiale.²³ Ce comportement est possible grâce à sa superstructure fibreuse et son haut niveau d'orientation dans plusieurs tissus.²³ Ainsi, le collagène auto-assemblé sous forme de fibres dans un tissu a comme effet de le rigidifier tout en le maintenant élastique sur une courte plage de déformation.

L'élastine est une autre protéine fibreuse importante se retrouvant chez les vertébrés et les insectes.²⁴⁻²⁶ Cette protéine est d'abord produite sous forme d'un précurseur soluble dans l'eau, la tropoélastine, qui s'assemble ensuite en un réseau fibrillaire hautement réticulé par des liaisons covalentes entre des lysines.^{26,27} Cette réticulation est possible car l'élastine possède des régions riches en alanine et lysines.²⁷ De plus, l'élastine possède des domaines hydrophobes constitués de motifs répétitifs VPGG, VPGVG et APGVGV (V = Valine, P = Proline, G = Glycine et A = Alanine) dans sa structure primaire.^{24,28} Ces domaines forment des structures secondaires en coudes- β , tandis que le reste de la protéine est plutôt non-structuré ou en hélices- α . Des études sur des peptides modèles de l'élastine ont montré la formation d'hélices- β avec plusieurs séquences hydrophobes répétitives.^{24,28} Cette structure serait stabilisée latéralement par des interactions hydrophobes et un centre libre de laisser circuler des molécules d'eau.²⁴ L'élastine se retrouve dans plusieurs tissus possédant une bonne élasticité comme la peau, les artères et les poumons. Cette protéine est d'ailleurs reconnue comme un modèle d'élasticité idéale, à cause de sa grande extensibilité couplée à une excellente résilience (90 %).²³ Les forces de rappel de nature entropique et énergétique seraient respectivement attribuables aux structures en coude- β (et hélice- β) et à la présence de domaines hydrophobes à travers le réseau de protéine réticulé.^{23-25,28,29}

La soie est aussi une protéine fibreuse produite par certains insectes comme des araignées, des chenilles, des vers, etc. Comme pour le collagène, il existe plusieurs types de soies dans la nature, dont les structures primaires et secondaires varient en fonction de l'insecte et de la fonction à laquelle la soie est destinée. Dans le cas du ver à soie *Bombyx mori*, la soie produite se nomme la fibroïne et possède une séquence primaire répétitive

contenant essentiellement de la glycine (43 %), de l'alanine (30 %) et de la sérine (12 %).³⁰ La structure secondaire est principalement constituée de régions cristallines faites de feuillets- β antiparallèles empilés et stabilisés par des interactions hydrophobes. Ces régions cristallines sont séparées par des zones hydrophiles sous forme de pelote statistique amorphe ou en hélice- α .³¹ Le rôle de la soie de *B. mori* est de protéger le ver par la formation d'un cocon. La structure de la fibroïne génère des propriétés mécaniques combinant force et élasticité, menant donc à une très grande ténacité.^{23,31} Les araignées (e.g. *Nephila clavipes*) possèdent aussi une soie à caractère semi-cristallin nommée la spidroïne.² Les araignées ont cependant la capacité de produire différents types de soies grâce à la présence de plusieurs glandes sécrétoires. Ces soies possèdent un taux de cristallinité plus ou moins élevé, ce qui mène à des propriétés mécaniques variant avec le besoin, par exemple une plus grande élasticité ou rigidité.³²⁻³⁴ Dans le cas des fils de trame, soit les fils formant l'échafaudage principal des toiles d'araignées, une grande rigidité et une faible extensibilité sont de mise pour conserver l'intégrité de la construction.^{2,32} Cependant, pour la soie flagelliforme (entre les fils de trame), une grande extensibilité et une faible rigidité sont nécessaires afin de capturer et retenir les proies. Malgré tout, les deux types de soie possèdent une ténacité similaire.^{2,32}

Ces trois exemples de protéines fibreuses illustrent bien la relation entre la structure des protéines et les fonctions biologiques pour lesquelles elles sont produites. Il est donc primordial de contrôler partiellement la structure des protéines lors de la confection *in vitro* de matériaux puisque cela permettra de s'approcher de leurs remarquables propriétés initiales dans leur milieu biologique.

1.2.3 Polyampholytes biologiques

Une autre caractéristique importante des protéines est qu'elles sont le plus souvent des polyampholytes biologiques puisque leur structure primaire contient généralement des acides aminés pouvant être chargés positivement (histidine, lysine et arginine) et d'autres pouvant être chargés négativement (acide aspartique et glutamique) selon le pH.³⁵⁻³⁸ La présence de ces acides aminés avec des groupements fonctionnels chargés peut être mise à profit dans la production de matériaux à base de protéines. Par exemple, les matériaux protéiques réticulés

gènèrent des hydrogels en milieu aqueux grâce à la nature hydrophile des acides aminés polaires ou chargés. Ces hydrogels doivent d'abord être formés par un processus de réticulation ou d'enchevêtrement des protéines solubilisées. Différentes méthodes de réticulation seront décrites à la section 1.3. Ensuite, si les protéines possèdent une quantité suffisante d'acides aminés chargés, les propriétés des hydrogels peuvent alors être modulées en fonction du pH.^{39,40} Au point isoélectrique (pI), la charge nette de la protéine est neutre. Les interactions électrostatiques à l'intérieur d'un hydrogel de protéine au pI agissent alors comme des points de réticulation effectifs produisant ainsi une matrice compacte. À l'opposé, un hydrogel de protéine contenant majoritairement des fonctions carboxylates sera anionique à pH basique, tandis qu'un hydrogel contenant principalement des fonctions amines sera cationique à pH acide. Les hydrogels avec des charges nettes négatives ou positives possèdent ainsi une répulsion interne entre leurs groupements fonctionnels qui, en plus de favoriser l'interaction avec les molécules d'eau environnantes, cause un gonflement du réseau de protéines.^{38,40} La figure 1.3 illustre le gonflement des hydrogels de protéines en fonction du pH de la solution par rapport au pI de la protéine.

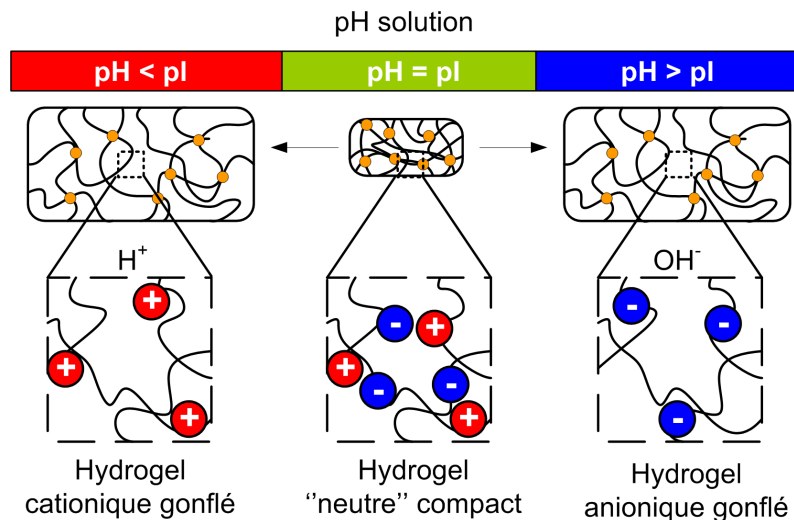


Figure 1.3. Schéma de l'état d'hydrogels de protéines en fonction du pH de la solution aqueuse par rapport au pI.

Les hydrogels de polymères possédant des propriétés variant en fonction du pH sont connus depuis de nombreuses années. Ils sont couramment employés dans le domaine pharmaceutique afin de créer des matrices pour la libération contrôlée ou la protection d'agent thérapeutiques lors de leur passage dans le système digestif. Ils sont aussi grandement utilisés dans la production de biomatériaux à application médicale ou pour l'ingénierie tissulaire. Cependant, contrairement aux macromolécules d'origine biologique, ils possèdent un champ d'application limité à cause de leur nature synthétique qui les rend difficilement dégradables tant par hydrolyse que par processus enzymatique.³⁸ D'autre part, les matériaux à base de protéines peuvent aussi être utilisés dans le domaine pharmaceutique et pour des applications biomédicales (section 1.2.4), mais ils trouvent aussi des niches dans le domaine cosmétique et alimentaire puisque ce sont des matières premières généralement biocompatibles et biodégradables. Plusieurs exemples d'hydrogels répondant aux variations de pH et ayant un bon potentiel pour la libération contrôlée dans le domaine pharmaceutique, thérapeutique ou l'ingénierie tissulaire peuvent être retrouvés dans la littérature. C'est le cas des hydrogels de collagène ou de gélatine,^{39,41} d'albumine,^{42,43} et de protéines de petit lait³⁸ ou de soja⁴⁴ réticulés. Il faut noter que les variations de pH peuvent cependant mener à un changement de la conformation des protéines ou à leur hydrolyse, et ainsi modifier les propriétés ou l'intégrité des matériaux.

1.2.4 Applications biomédicales et ingénierie tissulaire

Les matériaux voués à une utilisation dans le domaine biomédical se nomment des biomatériaux.⁴⁵ Ainsi, le préfixe *bio* réfère à l'application biologique de ce type de matériaux plutôt qu'à leur origine, qui peut être synthétique ou naturelle. La composition et l'apparence d'un biomatériau dépendent de plusieurs facteurs relevant du besoin à combler et du rôle à tenir. Ainsi, un biomatériau destiné à un rôle de soutien mécanique et structural, e.g. remplacer une articulation ou réparer une fracture osseuse, sera généralement constitué de matériaux inertes et rigides tel que des alliages métalliques.⁴⁵ D'un autre côté, un biomatériau destiné à réparer ou remplacer des tissus mous, e.g. des bandages cornéens ou des implants mammaires, sera généralement composé d'hydrogels de polymères biologiques ou

synthétiques tel que le collagène ou le silicone.⁴⁵ La mise en œuvre des biomatériaux doit tenir compte de la nature chimique des matières premières, de l'aspect morphologique et des propriétés mécaniques requises, des conditions du milieu biologique, et des interactions possibles entre ce dernier et les matériaux.^{46,47} Enfin, pour remplir leurs différents rôles, les biomatériaux doivent être biocompatibles et être pourvus d'une biodurabilité adaptée aux applications visées.

Pour être jugé biocompatible, un biomatériau doit pouvoir remplir son rôle dans le système biologique avec lequel il est mis en contact, tout en ne produisant que peu ou pas de réactions indésirables.⁴⁵ Les réactions indésirables peuvent être multiples, e.g. des réactions inflammatoires et/ou immunologiques, des intoxications suite à une dégradation des matériaux, la nécrose des tissus environnants, etc. La biocompatibilité est donc la réponse du milieu biologique lors de son contact avec le biomatériau. De son côté, la biodurabilité est plutôt reliée à la réponse des biomatériaux face à l'action du milieu biologique dans lequel ils sont introduits. Ce critère dépend de la nature chimique du matériau mais aussi des contraintes chimiques et physiques imposées par l'environnement biologique en contact avec lui.^{48,49} Ainsi, le biomatériau peut être altéré ou dégradé sous l'action de contraintes mécaniques au lieu d'implantation, par l'infiltration et la croissance de cellules à l'intérieur ou à la surface de ce dernier, par le pH du système biologique, la présence d'enzymes, la température du système, etc.^{46,49,50}

L'étude des interactions entre les biomatériaux destinés au domaine biomédical et les systèmes biologiques a mené au domaine de recherche se nommant l'ingénierie tissulaire. Ce domaine multidisciplinaire rassemble des connaissances et procédés reliés à la médecine, la chimie, la biochimie, la biologie moléculaire et la science des matériaux. Ce secteur d'activité est axé sur la production de substituts biologiques visant à restaurer ou maintenir l'intégrité et les fonctions des tissus biologiques.^{46,51} Le paradigme général des biomatériaux voués à l'ingénierie tissulaire consiste à créer des matrices 2D ou 3D à la surface ou à l'intérieur desquelles serontensemencées et cultivées des cellules en lien avec l'application finale pour laquelle ils sont destinés. Les cellulesensemencées vont adhérer à la matrice, croître, produire leur propre matrice extracellulaire et enfin s'organiser pour générer un tissu *in vitro*. Les interactions biomatériaux-cellules *in vitro* peuvent ensuite être étudiées et optimisées au

besoin. Si les résultats de biocompatibilité et biodurabilité sont satisfaisants, le système peut être implanté *in vivo* afin d'évaluer s'il est apte à remplir le rôle pour lequel il était destiné. Les avantages et inconvénients décrits en section 1.1 sont directement applicables à l'utilisation de protéines pour la confection de biomatériaux destinés au génie tissulaire. Ainsi, les protéines fibreuses décrites en section 1.2.2, i.e. le collagène,^{20,52} l'élastine⁵³ et la soie,^{31,54} ont toutes trouvé une niche dans la production de biomatériaux destinés à l'ingénierie tissulaire.

1.3 Origine et contrôle des propriétés mécaniques de matériaux protéiques

Les performances mécaniques des matériaux dictent très souvent leur application finale. Les propriétés mécaniques sont quantifiables à l'aide d'une panoplie de différents tests offrant une variété d'informations tant sur l'assemblage macroscopique, microscopique et nanoscopique, que sur le comportement moléculaire des matériaux soumis à une contrainte mécanique. L'objectif de cette section est d'abord d'introduire quelques principes de base relatifs aux propriétés mécaniques, puis de présenter des méthodes pour moduler les performances mécaniques d'un biomatériau protéique afin de rencontrer les critères requis lors de sa mise en œuvre *in vitro* ou *in vivo*. Quelques exemples de tissus biologiques humains et leurs intervalles de module d'élasticité (rigidité) respectifs sont schématisés à la figure 1.4.⁵⁵⁻⁵⁷ Récemment, des études ont démontré que le module d'élasticité des matrices utilisées comme support pour la culture cellulaire en ingénierie tissulaire jouait un rôle important dans la migration, la croissance et la différenciation des cellules cultivées.⁵⁸⁻⁶⁰ Ainsi, posséder des propriétés mécaniques adaptées aux tissus visés par l'application des biomatériaux augmente grandement les chances de succès tant lors d'une culture de cellules *in vitro* que lors d'une implantation *in vivo*.

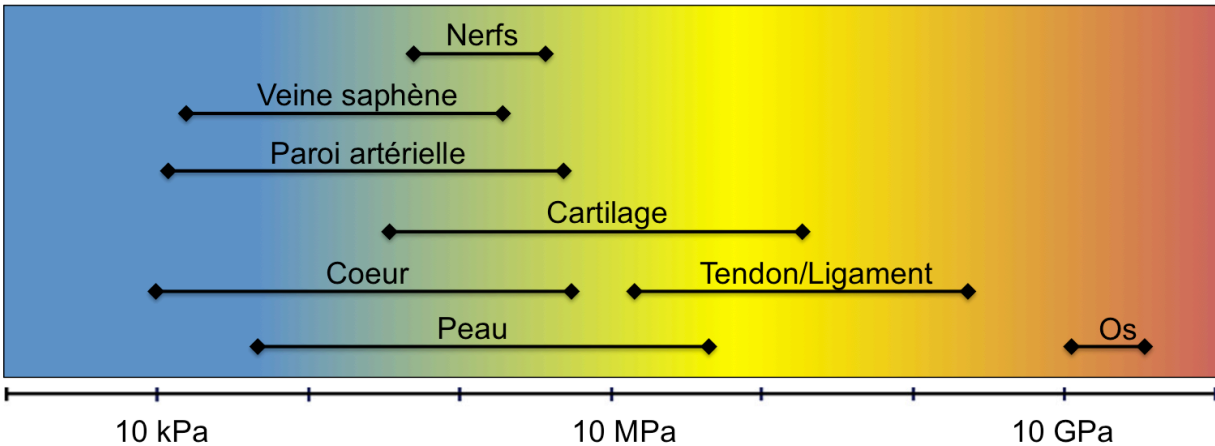


Figure 1.4. Gamme des modules d'élasticité de différents tissus biologiques. Reproduite et traduite de la référence 55 © 2014 avec la permission de Elsevier.

Comme la plupart des tissus biologiques, les matériaux d'origine biologique et les plastiques polymériques possèdent un comportement viscoélastique.^{61,62} Ce comportement implique que l'ampleur de la déformation de ces matériaux face à une contrainte mécanique varie en fonction de la vitesse à laquelle elle est appliquée; le comportement viscoélastique de ces matériaux est donc dépendant du temps.^{61,63-66} La viscosité est une propriété des fluides et se mesure par la résistance à l'écoulement produit par la force appliquée. L'élasticité est plutôt une propriété des solides et est la réponse linéaire et réversible de la déformation lors de l'application et du retrait d'une contrainte mécanique. Au niveau moléculaire, l'élasticité d'un matériau est associée au déplacement des atomes et/ou des chaînes hors de leur position d'équilibre lors de l'application d'une contrainte mécanique.^{61,63,64} L'énergie fournie au système est alors emmagasinée sous forme d'énergie potentielle qui est ensuite libérée lors du retour des chaînes et des atomes à leur position d'équilibre initial.^{63,66} La viscosité est plutôt reliée à la diffusion des molécules dans les zones amorphes d'un matériau. L'énergie mécanique fournie au système lors de l'application d'une contrainte est alors dissipée sous forme de chaleur, notamment à cause de la friction et des collisions intermoléculaires.^{61,63,66} Ainsi, contrairement aux matériaux parfaitement élastiques, les courbes de traction et de retrait obtenues lors de l'étirement d'un matériau viscoélastique ne coïncident pas, mais

forment plutôt une boucle d'hystérèse (figure 1.5). Cette hystérèse est due à la dissipation sous forme de chaleur d'une partie de l'énergie mécanique emmagasinée lors de l'extension.⁶³⁻⁶⁶

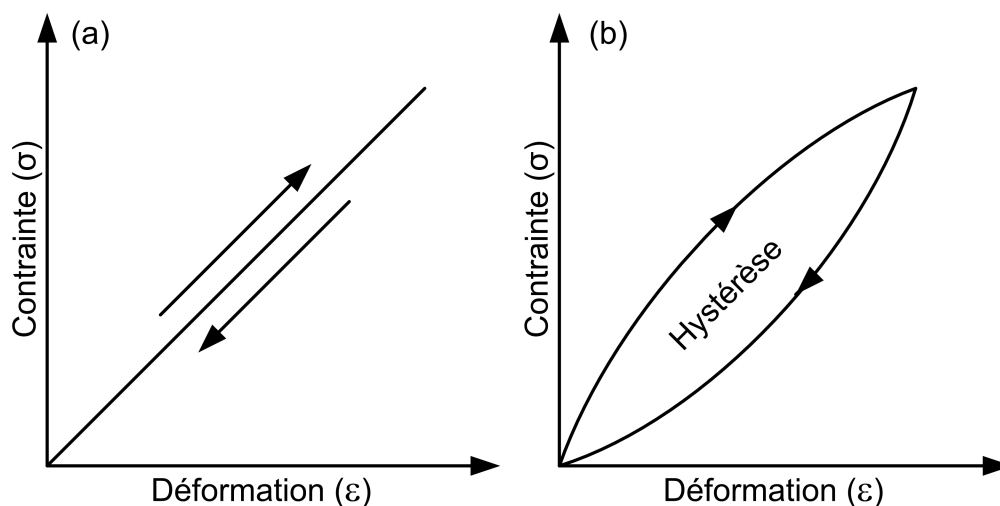


Figure 1.5. Exemples de courbes de contrainte-déformation lors d'un test d'étirement d'un matériau (a) parfaitement élastique et (b) viscoélastique.

1.3.1 Méthodes de réticulation covalente

Tel que mentionné à la section 1.2, les protéines sont constituées d'un assemblage d'acides aminés pourvus de chaînes latérales variables. Certains de ces acides aminés possèdent des groupements fonctionnels pouvant être exploités pour effectuer des réticulations covalentes. La méthode de réticulation peut être chimique, biochimique ou physique. La nature de la réaction utilisée dépendra, entre autres, des groupements fonctionnels disponibles dans les protéines, de leur quantité, du taux de réticulation recherché ainsi que de la toxicité potentielle associée à la méthode choisie. D'une manière générale, la réticulation covalente des protéines génère des matériaux plus rigides et plus forts mais diminue leur extensibilité.^{67,68} De plus, la plupart de ces méthodes de réticulation génèrent des matériaux possédant une plus grande résistance face à la dégradation enzymatique.^{52,69}

Le glutaraldéhyde est une molécule largement utilisée pour la réticulation covalente des protéines à cause de son faible coût et de la simplicité et la rapidité de son utilisation.^{52,70-}

⁷² Cette molécule réagit avec les groupements amines libres, e.g. lysines et hydroxy-lysines, présents dans les protéines pour créer des liens imine tel que schématisé sur la figure 1.6.⁷¹ Le processus de réticulation exact est cependant complexe car il se produit des réactions de polymérisation aléatoires entre les molécules de glutaraldéhyde, avec ou sans les protéines, pour former un large éventail de structures.⁷¹ De plus, cette molécule possède une toxicité élevée pour les cellules et son utilisation comme agent réticulant a été associée à l'induction de calcification au site d'implantation.^{68,73}

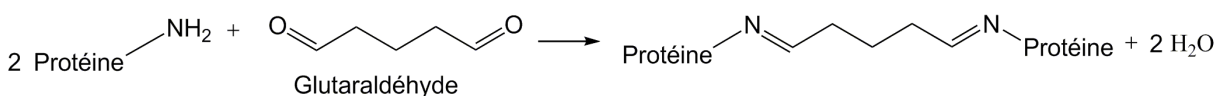


Figure 1.6. Schéma réactionnel de la réticulation covalente des groupements amines libres des protéines par le glutaraldéhyde.

La réticulation covalente des protéines à l'aide d'un carbodiimide est une autre technique largement répandue pour modifier les propriétés mécaniques des biomatériaux à base de protéines. En particulier, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) permet de réticuler des groupements fonctionnels carboxylates avec des amines libres. La réaction est généralement effectuée en présence de N-hydroxysuccinimide (NHS). Le schéma réactionnel entre les protéines en présence de EDC et de NHS est présenté à la figure 1.7. Le groupement carboxylate est d'abord activé par le carbodiimide pour former un intermédiaire réactif. Le NHS substitue ensuite l'EDC pour former le complexe acide carboxylique-NHS et libérer un dérivé urée. Cette étape empêche la réaction avec une molécule d'eau, qui aurait alors pour effet de régénérer à l'acide carboxylique de départ. Enfin, le complexe acide carboxylique-NHS réagit avec un groupement amine libre pour former un lien amide. Cette réticulation est qualifiée de longueur zéro (*zero length*) car elle n'introduit aucune chaîne supplémentaire dans la structure finale. Cette technique de réticulation a été employée par plusieurs groupes de recherche pour améliorer les propriétés mécaniques de biomatériaux à base de protéines,^{39,74-77} mais aussi pour les fonctionnaliser à l'aide de peptides tel que le

motif RGD responsable de la reconnaissance et de l'adhésion cellulaire.^{78,79} Les avantages de cette technique sont son plus faible potentiel de cytotoxicité suite au lavage des matériaux pour retirer les produits secondaires générés et l'absence d'induction de calcification au site d'implantation.^{52,75}

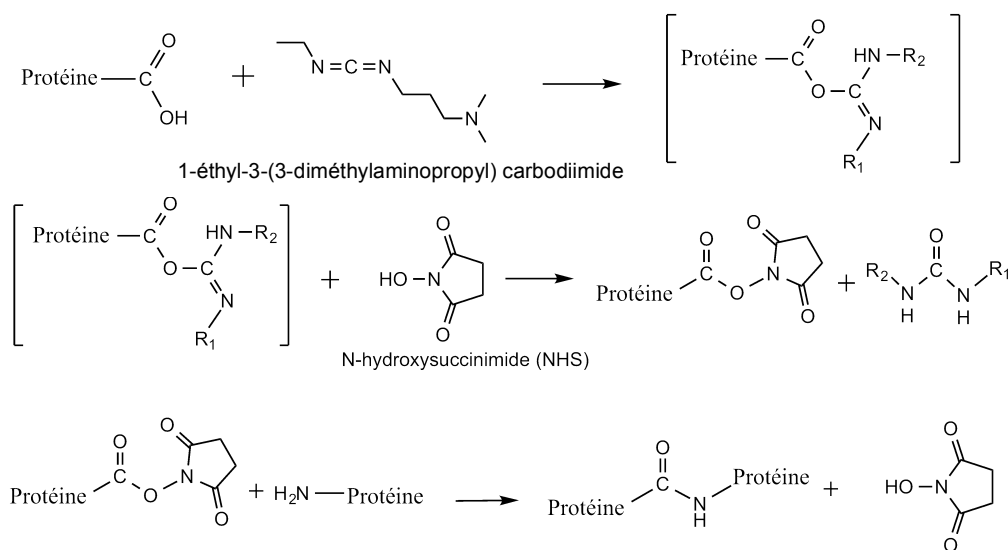


Figure 1.7. Schéma réactionnel de réticulation covalente des protéines en présence de EDC et NHS.

Les deux méthodes de réticulation décrites ci-dessus feront partie intégrante du chapitre 4. Toutefois, il existe plusieurs autres méthodes de réticulation covalente des matériaux à base de protéines. D'autres exemples de réticulation covalente à l'aide d'agents chimiques sont l'utilisation de composés polyépoxy⁸⁰⁻⁸² ou de la génipine, une molécule naturelle extraite du fruit du gardenia.^{52,83,84} Les méthodes biochimiques de réticulation impliquent plutôt des enzymes telle que la transglutaminase^{52,85,86} ou la tyrosinase.⁸⁷ La transglutaminase catalyse la réaction entre un groupement ϵ -amine libre d'une lysine et un groupement γ -carboxamide de la glutamine. La tyrosinase, quant à elle, catalyse la réaction d'oxydation de la tyrosine en présence d'oxygène pour générer un dérivé *o*-quinone qui peut ensuite réagir avec des groupements amines libres ou d'autres *o*-quinones. Finalement, des méthodes de réticulation physique peuvent aussi être exploitées, comme l'exposition aux

rayons UV et le traitement déshydrothermique.^{69,88-90} La réticulation à l'aide de rayons UV (254 nm) produit des radicaux libres sur les acides aminés aromatiques qui réagissent ensuite ensemble.⁸⁸ De son côté, le traitement déshydrothermique implique de chauffer sous vide les matériaux protéiques pour en retirer l'eau et générer de nouveaux liens covalents amide ou ester par condensation entre des acides carboxyliques et des groupements amine.⁸⁸

1.3.2 Méthodes de réticulation physique non-covalente : altération de la structure secondaire

Outre les réticulations covalentes des protéines, il est possible d'induire des changements dans la structure secondaire qui agiront alors comme points de réticulation physique. La soie est un exemple bien adapté à ce genre de processus. Tel que décrit à la section 1.2.2, la soie est composée de cristaux de feuillets- β antiparallèles empilés qui sont dispersés dans une matrice amorphe composée majoritairement d'hélices- α et de structures désordonnées. Lors de l'extraction de la fibroïne de soie du cocon du ver à soie, les feuillets- β sont rompus, ce qui permet à cette protéine d'être solubilisée en milieu aqueux. Il est ensuite possible de générer des matériaux sous différentes formes (films, éponges 3D, fibres électrofilées, etc.), mais ces derniers restent solubles si les feuillets- β ne sont pas régénérés. Cette forme soluble est un polymorphe métastable, nommé silk I, qui est majoritairement composé de structures en coude- β de type II hydratées, d'hélices- α et de pelotes statistiques (*random coil*).⁹¹⁻⁹³ Plusieurs stratégies ont été mises au point afin d'induire la transition du polymorphe silk I vers silk II, soit la cristallisation des chaînes peptidiques en feuillets- β antiparallèles empilés qui peuvent ensuite agir comme points de réticulation physique.^{18,31,54,94} Cette réticulation induit l'insolubilité des matériaux tout en modulant leurs performances mécaniques en fonction du taux de cristallinité en feuillets- β .⁹⁵

Le principe de base consiste à favoriser l'interaction entre les segments hydrophobes des chaînes peptidiques de la soie. Un facteur important dans la cristallisation de la soie est donc le contrôle des interactions entre les protéines et l'eau qui agit comme un plastifiant.^{95,96} Cette stratégie permet, d'une part, l'interaction des groupements amide du squelette peptidique entre eux par des liaisons hydrogène et, d'autre part, l'empilement des feuillets- β

ainsi formés et leur stabilisation grâce à des interactions hydrophobes. Ainsi, le traitement avec des alcools polaires comme le méthanol et l'éthanol permet de retirer l'eau liée à la structure de la protéine et d'induire la cristallisation de la soie.⁹⁷⁻⁹⁹ La cristallisation de la soie est aussi possible en utilisant du sel en solution concentrée ou sous forme de cristaux (e.g. NaCl ou KCl) qui agit alors comme séquestrant des molécules d'eau solubilisant la protéine et favorise les interactions interchaînes.¹⁰⁰

Chauffer les matériaux au-dessus de leur température de transition vitreuse (T_g) permet également de retirer l'eau liée aux protéines, réduisant ainsi le volume libre et la mobilité de la soie et générant une nouvelle T_g plus élevée et une cristallisation en refroidissant.^{95,101,102} Le recuit en vapeur de solvant est une autre technique permettant d'induire l'insolubilité des matériaux de soie par la formation de feuillets- β .^{95,103} Cette méthode consiste à appliquer un vide en présence d'une atmosphère de solvant, l'eau dans le cas précis de la soie. Un échange lent entre l'eau de l'environnement et l'eau dans le matériau de protéines se produit, pour enfin mener à la cristallisation des chaînes peptidiques. Cette technique plus douce mène à des matériaux généralement plus malléables puisque la protéine conserve une plus grande mobilité grâce à l'eau liée en dehors des cristaux de feuillets- β qui agit comme plastifiant dans la phase amorphe.^{95,103} La technique de recuit en vapeur de solvant peut être combinée à la variation de température afin de jouer à la fois sur la T_g de la protéine et sur l'échange des molécules d'eau. Il est alors possible d'obtenir différents degrés de cristallinité et donc de moduler les propriétés mécaniques du matériau.⁹⁵ Enfin, il est possible d'induire une cristallisation partielle des matériaux à base de soie en les traitant à un pH autour du point isoélectrique (pH 5 et moins pour la fibroïne de soie).⁹² Comme mentionné à la section 1.2.3, les protéines sont plus compactes à leur pI et le rapprochement des chaînes peptidiques favorise alors la formation de nouvelles structures secondaires grâce aux ponts hydrogène et de structures tertiaires grâce aux interactions hydrophobes entre les structures secondaires.^{92,99}

Bien que la soie ait été prise comme exemple pour décrire les techniques de réticulation physique, certaines de ces méthodes sont applicables à d'autres systèmes de protéines. C'est notamment le cas des extraits de collagène de type I, qui forment des triples hélices suivi d'un auto-assemblage en fibrilles lors de leur incubation au point isoélectrique (circa pH 7) à 37 °C, soit en condition similaire au milieu physiologique.¹⁰⁴

1.3.3 Liens sacrificiels et longueur de segments enfouis

Une stratégie importante adoptée afin de moduler et d'améliorer la performance mécanique de plusieurs matériaux d'origine biologique est l'utilisation de liens sacrificiels et de longueurs de segments enfouis (*hidden lengths*).^{13,105-107} Les liens sacrificiels sont constitués d'interactions physiques ou chimiques possédant une énergie plus faible que les liens covalents. Ils comprennent certaines des interactions énoncées dans les sections précédentes, soit les interactions ioniques et hydrophobes, les ponts hydrogène, les forces de van der Waals, de même que les liens organo-métalliques.^{13,105-107} Lorsqu'une contrainte est appliquée sur un matériau possédant de tels liens sacrificiels, ces derniers vont se rompre avant les liens covalents. Les matériaux contenant ce type de liaison sont donc d'une part plus rigides et forts, mais aussi plus extensibles, ce qui leur confère une ténacité accrue, tel que schématisé sur la figure 1.8.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ L'énergie mécanique emmagasinée dans le matériau durant l'application de la contrainte est généralement dissipée sous forme de chaleur lorsque les liens sacrificiels sont rompus, ce qui prévient les dommages irréversibles causés par la rupture des liens covalents.

Les liens sacrificiels sont reliés au concept de longueurs des segments enfouis. En effet, les constituants de ces matériaux et leur organisation hiérarchique agissent tels des éléments pouvant se disloquer, se déstructurer ou se dérouler lors de la rupture des liens sacrificiels les maintenant en place, permettant ainsi aux matériaux de se déformer tout en évitant une fracture irréversible.^{105,106} Un aspect intéressant avec les liens sacrificiels est leur capacité à se reformer après leur rupture suivant le retrait de la contrainte mécanique. Ainsi, la plupart des matériaux qui contiennent ce type de liens possèdent une capacité d'auto-guérison leur permettant de réparer partiellement les dommages infligés par la contrainte mécanique, ce qui leur permet de récupérer des performances mécaniques similaires à celles au stade initial.^{13,105,106,109,110}

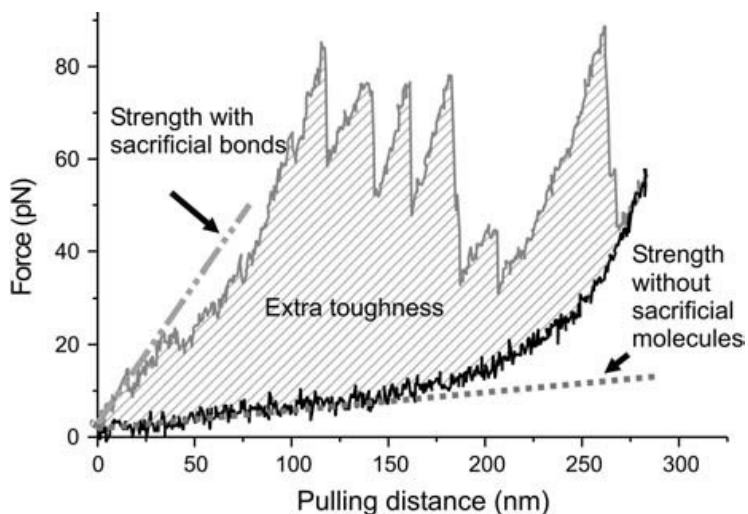


Figure 1.8. Comparaison des courbes de traction mesurées à l'aide d'une pointe de microscope à force atomique (AFM) sur une macromolécule avec (courbe du haut) et sans (courbe du bas) liens sacrificiels. En étirant la molécule possédant des liens sacrificiels, la contrainte nécessaire est d'abord élevée, démontrant une plus grande rigidité qu'en l'absence de liens sacrificiels. La contrainte chute ensuite abruptement suivant la rupture d'un lien sacrificiel. L'énergie à fournir au système pour atteindre l'extension complète ou l'élongation à la rupture est alors plus élevée, le matériau est donc plus tenace grâce aux liens sacrificiels (aire sous la courbe plus grande). Reproduite de la référence 105 © 2006 avec la permission de Elsevier.

Les liens sacrificiels et longueurs de segments enfouis sont fréquemment rencontrés dans des systèmes biologiques. C'est le cas, par exemple, des os, qui peuvent se déformer partiellement et reprendre leur forme même lorsqu'ils ont atteint le stade de déformation plastique suivant leur limite d'élasticité.^{13,105,106,110-112} Ceci est bien sûr possible seulement si la contrainte n'atteint pas la limite critique menant à la fracture totale. Le mécanisme de liens sacrificiels et de longueurs de segments enfouis est possible dans les os grâce à l'agencement hiérarchique des différents constituants et à la nature organo-métallique de ce composite biologique.^{13,105,106} En effet, les os sont majoritairement composés de fibres et de fibrilles de collagène minéralisées en présence de plaquettes de cristaux d'hydroxyapatite (phosphate de calcium) et les mécanismes de dissipation d'énergie lors de l'application d'une contrainte

mécanique se produisent de l'échelle nanoscopique à macroscopique tel qu'illustré à la figure 1.9.^{13,112}

Les os sont ductiles principalement grâce à des mécanismes de dissipation de l'énergie à l'échelle nano et microscopique, ce qui leur procure leur bonne ténacité.^{13,105,106,109-111} Ces mécanismes comprennent le déroulement des hélices de collagène, mais surtout le glissement des fibrilles de collagène les unes par rapport aux autres.^{13,105,112} Ce glissement est possible grâce à la rupture des liens sacrificiels retrouvés soit dans les plaquettes minérales d'hydroxyapatite, dans les interactions entre les protéines et le calcium ionique, et les interactions des molécules de collagène entre elles ou avec la matrice non-fibrillaire présente entre les fibrilles de collagène.^{105,106,110} Lors de la rupture des différents liens sacrificiels, l'énergie mécanique est dissipée et les longueurs de segments enfouis procurent de l'extensibilité, ce qui augmente considérablement l'énergie nécessaire à la fracture des os. Ces mécanismes de dissipation de l'énergie préviennent ainsi l'apparition des craques à la surface et leur propagation vers l'intérieur de l'os. À l'échelle macroscopique et microscopique, c'est plutôt l'organisation hiérarchique des composants qui prévient la fracture critique des os en minimisant le développement et la propagation de macrofractures par des mécanismes de déflexion et de pontage des microfractures.^{13,112} Enfin, l'ostéogénèse promue par les cellules présentes dans les os permet la guérison finale et totale des craques et fractures d'une manière naturelle.

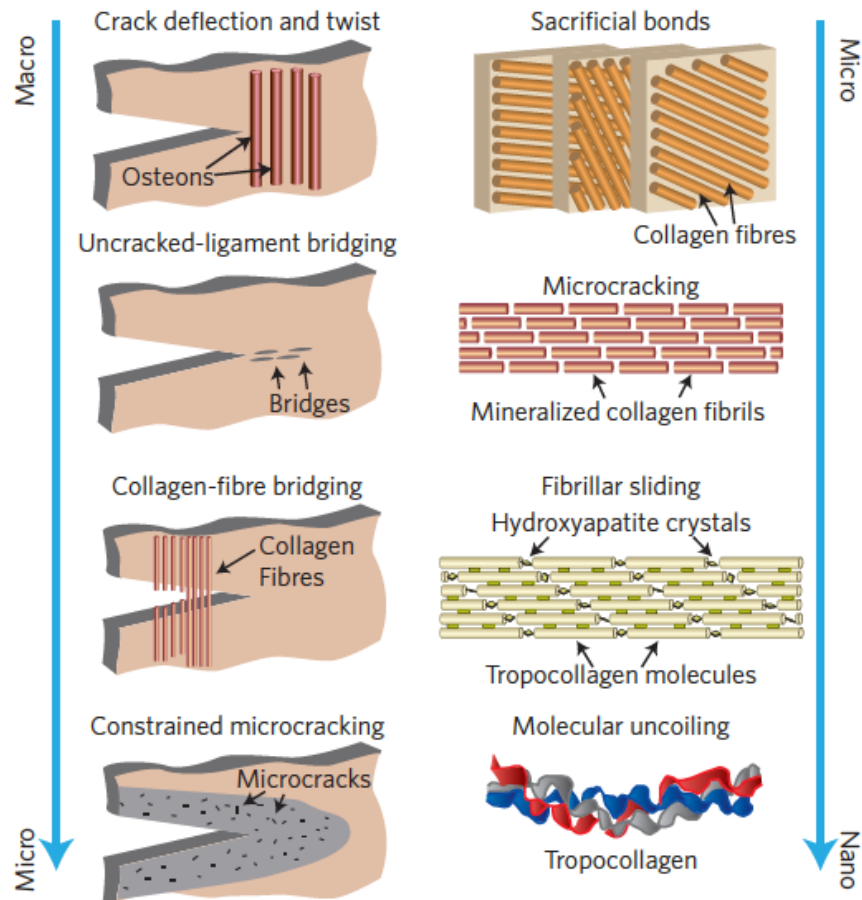


Figure 1.9. Schéma des mécanismes menant à la grande ténacité des os, de l'échelle macroscopique à l'échelle nanoscopique. Les liens sacrificiels font partie des mécanismes à l'échelle nanoscopique permettant la plasticité des os et sont des phénomènes qui se produisent avant l'apparition des fractures. Reproduite de la référence 13 © 2014 avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : [Nature Materials].

La soie d'araignée possède aussi un mécanisme de dissipation de la contrainte très performant grâce à des liens sacrificiels et des longueurs de segments enfouis à l'origine de l'extensibilité, de la ductilité, de la ténacité et de la résilience de cette fibre naturelle.^{113,114} Ce mécanisme serait cependant moins complexe que dans le cas des os. Les soies d'araignée, comme mentionné dans la section précédente, possèdent différents taux de cristallinité dû à la présence de feuillets- β anti-parallèles empilés. Ceux-ci sont dispersés dans une phase semi-amorphe contenant, entre autres, des structures de coude- β et/ou spirale- β avec des séquences

primaires similaires à celles retrouvées dans l'élastine (VPGVG/GPGXX). Plus le taux de cristallinité est élevé, plus la soie est forte et rigide.¹¹⁴ Toutefois, plus la quantité de coudes- β ou spirales- β est élevée, plus la soie possède une grande extensibilité puisque ces segments agissent comme liens sacrificiels et longueurs de segments enfouis, ce qui procure une ductilité et une ténacité élevée au matériau. De plus, ces structures agissent comme des ressorts qui procurent de l'élasticité à la fibre par un mécanisme entropique.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Liu *et al.* ont suggéré que l'élasticité de la soie serait reliée à la quantité de prolines présentes dans les séquences VPGVG/GPGXX formant ces structures en coude- β ou spirale- β et procurant une force de rappel entropique suite à l'extension.¹¹⁷ Aussi, lorsque le squelette peptidique de cette séquence est exposé à des molécules d'eau, les interactions hydrophobes au sein de ces structures induiraient une force de rappel menant à l'élasticité des fibres de soie.¹¹⁷ Ainsi, les coudes β agissent comme liens sacrificiels et longueurs de segments enfouis en plus de promouvoir le mécanisme d'élasticité à la soie.

Les méthodes utilisées pour détecter et/ou quantifier les liens sacrificiels et leur contribution aux performances mécaniques, tel que la rigidité et le comportement d'auto-guérison des matériaux, incluent l'AFM et les mesures de propriétés mécaniques en mode cyclique.^{8,13,105,106,115,118-122} L'AFM permet d'effectuer des mesures de traction sur une molécule individuelle, tel que rapporté à la figure 1.8. Cette technique permet donc de comprendre le phénomène à l'échelle nanoscopique mais ne renseigne pas directement sur le comportement macroscopique d'un matériau. Il est tout de même possible de détecter la présence des liens sacrificiels par l'allure en dents de scie de la courbe, ainsi que de tracer un parallèle avec le comportement macroscopique observé chez le matériau subissant une contrainte.^{13,105} Les propriétés mécaniques cycliques permettent plutôt de voir l'effet des liens sacrificiels sur les propriétés des matériaux à l'échelle macroscopique, et en particulier, leur comportement d'auto-guérison.^{118-120,123-127} Il est cependant difficile de discriminer les effets des différents constituants sur la rigidité, la ténacité, l'élasticité et le comportement d'auto-guérison. Les deux techniques sont donc complémentaires et, combinées à des techniques spectroscopiques, permettent de mieux comprendre le rôle des liens sacrificiels et de l'organisation hiérarchique des constituants des matériaux sur leurs performances mécaniques.^{105,110,112,118-121,127-130}

Enfin, bien que la compréhension du fonctionnement des liens sacrificiels dans des matériaux d'origine biologique se soit grandement améliorée, leur utilisation dans des matériaux créés par les humains ne permet toujours pas d'atteindre les performances mécaniques des matériaux naturels.^{8,9,121,131} La section suivante présente une fibre biologique, le byssus de la moule marine, dans laquelle l'organisation hiérarchique des différentes protéines et la présence de liens sacrificiels procurent des propriétés mécaniques impressionnantes.

1.4 Le byssus de la moule, un déchet à valoriser

Le byssus de la moule est une série de fibres protéiques servant à ancrer le mollusque à des surfaces solides submergées dans l'eau. Son rôle consiste à sécuriser le mollusque contre les forces de traction et de compression produites par les mouvements de va-et-vient des vagues et marées. Cette fibre riche en collagène possède d'impressionnantes propriétés mécaniques combinant force, élasticité et ténacité qui seront décrites plus en profondeur à la section 1.4.3. L'industrie mytilicole gère le byssus comme un déchet lors de la récolte et de la transformation des moules. Ainsi, il est évalué qu'environ 200 tonnes de byssus sont rejetées annuellement au Canada.¹³² La haute teneur en collagène et les propriétés mécaniques de cette fibre biologique sont à la base de ce projet de recherche visant à créer des biomatériaux à base des protéines extraites du byssus.

Les fibres de byssus sont produites par les moules par un processus similaire à un moulage par injection.¹³³ La moule sécrète d'abord un mélange de protéines à l'aide de glandes situées à l'intérieur d'une cavité localisée dans un organe rétractile nommée le pied de la moule, puis, par des gestes de contraction-dilatation, génère une fibre de byssus qui est collée à une surface solide submergée dans l'eau.^{133,134} Le processus est répété jusqu'à l'obtention d'un lot d'environ 20 à 60 fibres, avec une longueur approximative de 3 cm et un diamètre de 100 µm. La moule dispose les fibres en forme d'éventail, ce qui lui permet d'être maintenue bien en place peu importe la direction des courants marins.¹³⁵ Ainsi, un lot de byssus est composé de 3 parties, soit 1) une colonne par laquelle les fibres sont rattachées à la moule, 2) les fibres de byssus, et 3) des plaques adhésives servant à ancrer les fibres aux

surfaces solides.^{133,136} La figure 1.10 illustre une moule attachée à une surface solide à l'aide de byssus.¹³³

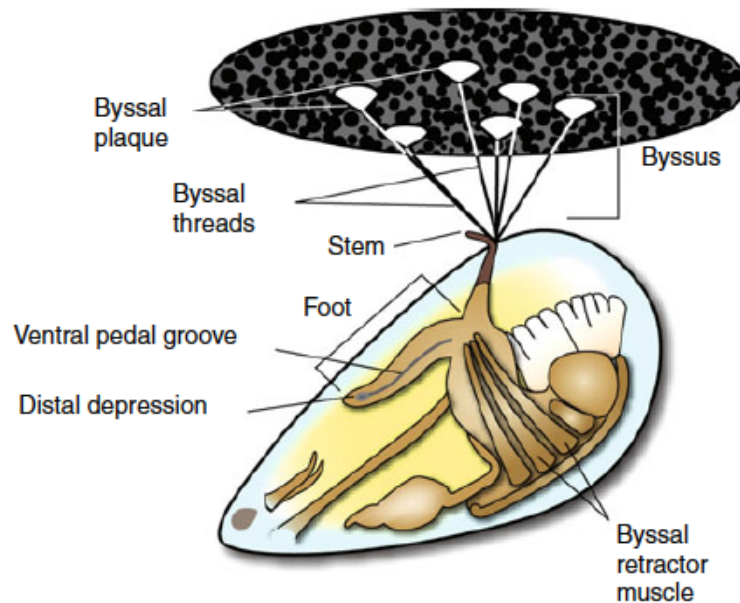


Figure 1.10. Moule accrochée à une surface solide à l'aide de byssus et les différentes parties impliquées dans les fibres et leur formation. Reproduite de la référence 133 © 2010 avec l'aimable permission de Springer Science and Business Media.

1.4.1 Structure hiérarchique du byssus et de son contenu en protéines

Une fibre de byssus seule est composée de trois parties macroscopiques. La partie proximale, soit la plus proche de l'animal, est rugueuse et extensible et représente environ le tiers de la longueur de la fibre. Cette section est suivie de la partie distale qui constitue les deux tiers restant de la fibre, et qui est plutôt lisse et rigide. La fibre se termine par la plaque qui adhère à une surface solide. De plus, un fil de byssus contient un cœur majoritairement constitué de fibrilles orientées dans l'axe longitudinal, le tout recouvert d'une cuticule d'environ 2 à 5 μm d'épaisseur, tel que schématisé sur la figure 1.11.¹³⁷

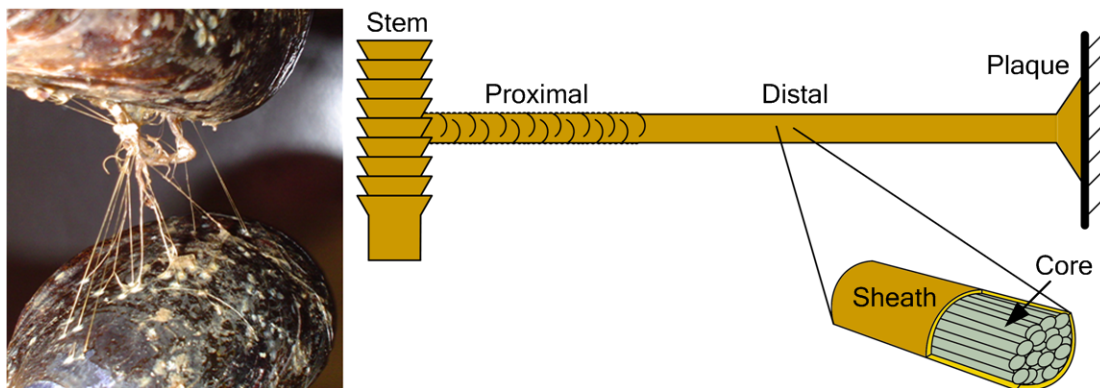


Figure 1.11. Photo d'une moule accrochée à une autre moule par son byssus et schéma des différentes parties composant une fibre.

Cette fibre naturelle est essentiellement constituée de protéines, *ca.* 95 % de la masse sèche, le reste étant des sucres, lipides et métaux.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Le cœur de la fibre est majoritairement composé de trois protéines de type copolymères bloc et nommés les preCol-P, preCol-D et preCol-NG.¹⁴¹⁻¹⁴⁴ Les preCol-P et preCol-D sont majoritairement retrouvés respectivement dans les parties proximales et distales.¹⁴²⁻¹⁴⁵ Les preCol-NG sont quant à eux présents sans gradient sur toute la longueur de la fibre.¹⁴⁴ La figure 1.12 schématise les différents domaines retrouvés dans un preCol ainsi que la disposition en paquet de 7 (6+1) de ces copolymères bloc protéiques.^{137,146,147}

Les trois types de copolymères blocs possèdent dans leur domaine central une séquence en acides aminés analogue au collagène, en plus de terminaisons riches en histidines à chaque extrémité.¹⁴⁴ Ces domaines riches en histidines ont la capacité de fixer des métaux et permettent aux paquets 6 + 1 des preCols de se joindre ensemble dans un arrangement tête-à-tête/queue-à-queue, formant ainsi des fibrilles à l'intérieur du cœur de la fibre de byssus. La forme de « banane » des preCols est due à la délétion d'une glycine dans la séquence de collagène, formant ainsi une triple hélice avec un pli.¹⁴⁶ La séquence d'acides aminés des différents preCols est cependant différente à l'intérieur des domaines flancs (*flanking domains*). Le preCol-D possède une séquence analogue à la fibroïne de soie, le preCol-P

analogue à l'élastine et le preCol-NG analogue aux protéines riches en glycines retrouvées à l'intérieur des membranes de cellules de végétaux.¹⁴⁴

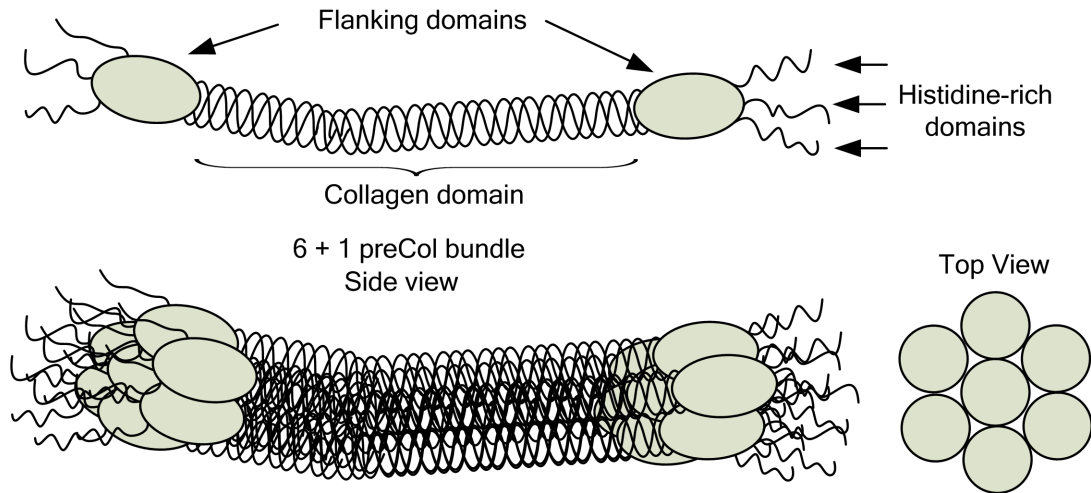


Figure 1.12. Schéma d'un preCol et de la disposition en paquet 6 + 1 à l'intérieur de la fibre de byssus. Une unité de preCol mesure approximativement 200 nm de long et 1.5 nm d'épaisseur et un paquet de 6 + 1 possède un diamètre de 7 à 9 nm. Reproduite et adaptée de la référence 147 © 2008 avec la permission de l'American Chemical Society.

La cuticule recouvrant la fibre est constituée d'une protéine nommée la « mussel foot protein 1 (mfp-1) ». D'autres variantes de cette mfp sont aussi retrouvées dans la plaque adhésive du byssus (mfp-1 à mfp-6) en quantité variable en fonction des espèces de moules de la famille des *Mytilus*.¹³³ Les mfp possèdent une séquence répétitive en acides aminés dont la majorité des constituants sont des prolines, hydroxyprolines, lysines et 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA).^{148,149} Les DOPA constituent environ 10-15 mol % de la séquence et se retrouvent en grand nombre dans des granules situés dans la cuticule. Les DOPA ont la capacité de se réticuler entre elles ou de se lier à des métaux, ce qui permet aux mfp de fonctionner à la fois comme un revêtement rigide et extensible en plus d'agir comme adhésif, même sous l'eau.^{128,133,148,149}

1.4.2 Mécanisme d'adhésion du byssus

L'adhésion sous-marine de la plaque est une des propriétés extrêmement intéressantes du byssus de la moule. Ce phénomène a ainsi mené plusieurs chercheurs à tenter de produire des matériaux biomimétiques modifiés à l'aide de DOPA.^{7,8,10,150,151} Bien que l'intérêt scientifique pour une telle propriété soit l'objet de recherches intensives,^{126,133,140,152-164} les mécanismes exacts ne sont toujours pas complètement élucidés, et cette section ne fait qu'effleurer le sujet. Ainsi, les métaux et oxides de métaux permettraient aux DOPA de se lier aux surfaces solides ou de se réticuler entre elles en formant des complexes organo-métalliques très stables.^{133,158} Des ponts hydrogène favoriseraient les interactions entre les DOPA et différentes surfaces.^{133,158} Aussi, des liens covalents se formeraient entre différentes DOPA ou entre une DOPA et d'autres acides aminés aromatiques ou dotés de fonctions amines provenant d'autres protéines.^{133,158} Enfin, la quantité de métaux présents et leur nature, le pH de l'environnement, la présence d'agents chimiques ou d'enzymes catalysant l'oxydo-réduction ou la formation de radicaux sur les DOPA sont tous des conditions et éléments permettant à ce phénomène d'adhésion sous-marine de prendre place dans la nature.

1.4.3 Propriétés mécaniques des fibres de byssus

Le byssus de moule est une des fibres biologiques avec les propriétés mécaniques les plus impressionnantes rencontrées dans la nature. Cette fibre est à la fois rigide, forte, extensible et tenace, en plus de posséder la qualité d'auto-guérison de ses performances mécaniques. Elle combine presque tous les éléments décrits dans les sections précédentes pour atteindre ses propriétés mécaniques remarquables.

La composition différente en acides aminés dans les domaines flancs des parties proximale et distale mène à des performances mécaniques bien distinctes. En effet, la partie proximale de la fibre, contenant une forte teneur en preCol-P avec des analogies à l'élastine, possède une extensibilité jusqu'à 200 % de sa longueur initiale. De son côté, la partie distale, contenant une forte teneur en preCol-D avec des analogies à la soie, est environ deux fois moins extensible que la partie proximale, avec une valeur à la rupture d'environ 100 % de sa

longueur initiale. Ensuite, la partie proximale est beaucoup moins rigide que la partie distale, avec des modules de Young respectifs variant entre 15 - 45 MPa et 400 - 900 MPa. De même, la contrainte à la rupture est plus faible pour la partie proximale que distale, avec des valeurs respectives variant entre 30 – 50 MPa et 75 – 200 MPa.^{23,120,144,147,165,166} La fibre de byssus est donc agencée de la partie proximale qui agit comme un ressort extensible peu rigide, et de la partie distale qui agit plutôt comme un ressort moins extensible mais très rigide. La cuticule qui recouvre la fibre entière peut aussi être étirée à environ 100 % de sa longueur initiale avant de se rompre entièrement.^{128,148,167} Durant l'extension, les granules riches en liens DOPA-Fer contenus dans la cuticule se déforment, évitant ainsi la formation de fissures, tel que schématisé sur la figure 1.13. Lorsque l'extension du byssus devient supérieure à 30 %, des microfissures apparaissent dans la cuticule. En relâchant la contrainte, les granules reprennent leur forme initiale quasi instantanément, mais les microfissures ne se reforment pas immédiatement. Ce mécanisme rend la fibre à la fois forte et extensible et lui procure une partie de son pouvoir d'auto-guérison des propriétés mécaniques.¹²⁸

Le cœur de la fibre de byssus exerce aussi un rôle important sur ses performances mécaniques. Lorsque la fibre est étirée au-delà de sa limite d'élasticité, elle récupère une partie de ses propriétés mécaniques initiales, mais il y a présence d'une grande hystérèse caractérisée par une perte de rigidité et de ténacité, tel que représenté sur la figure 1.14. Cependant, en laissant suffisamment de temps de relaxation à la fibre, elle récupère presque la totalité de ses performances mécaniques initiales. L'extensibilité et l'élasticité de la fibre sont possibles grâce à au moins trois phénomènes distincts permettant d'emmagasinier et de dissiper l'énergie mécanique d'une manière réversible. En premier lieu, lorsque soumis à une contrainte, les régions collagène des preCols-D et -NG de la partie distale perdraient leur forme de banane initiale pour devenir complètement droites et alignées dans l'axe de la fibre.¹⁶⁸ En second lieu, la triple hélice de collagène et les domaines flanc globulaires des preCols adopteraient une conformation étendue, avec une force de rappel hypothétiquement promue par des interactions hydrophobes et la reformation des liens hydrogène dans les structures secondaires.^{119,127,168} Enfin, les liens sacrificiels organo-métalliques des domaines riches en histidines dissiperaient l'énergie mécanique fournie au système en se rompant, tout en fournissant des longueurs de segments enfouis.^{127,168}

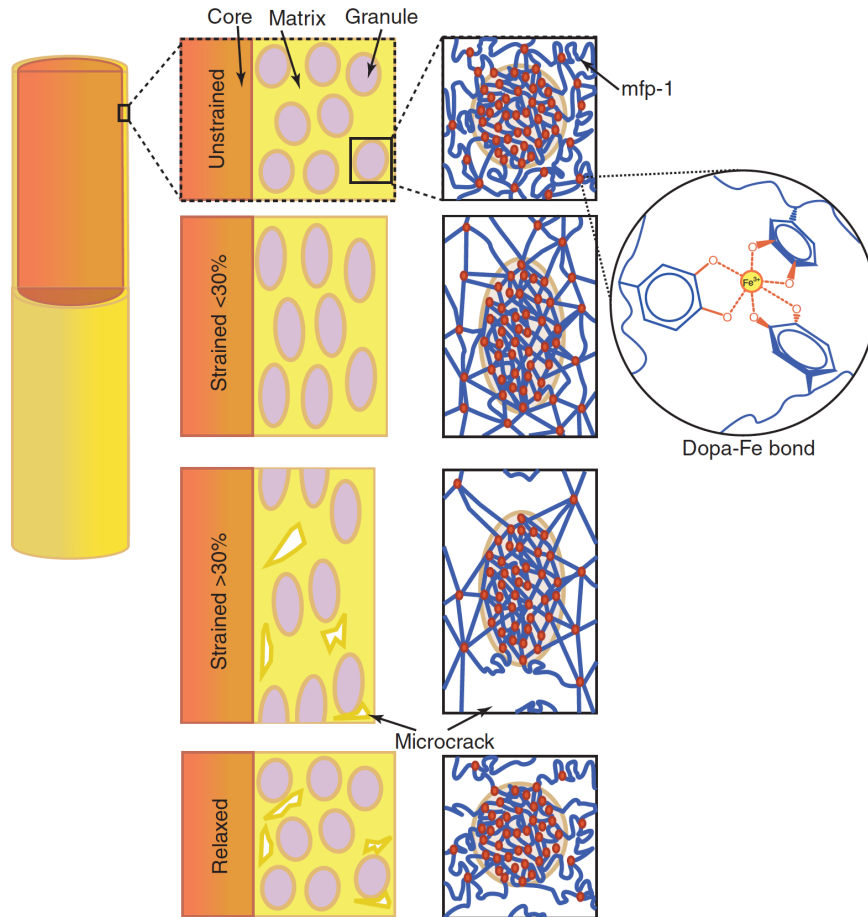


Figure 1.13. Schéma d'un byssus déformé à différents pourcentages de sa longueur initiale et montrant le comportement des granules dans la cuticule, avant, pendant et après la déformation. Reproduite de la référence 128 © 2010 avec la permission de The American Association for the Advancement of Science.

Les phénomènes décrits plus haut sont illustrés à la figure 1.15. En laissant le temps à la fibre de relaxer, les éléments de structures secondaires des domaines flanc et de la triple hélice de collagène reprennent leur conformation originale, puis les liens sacrificiels organo-métalliques se reforment.^{119,127,168} La fibre regagne alors sa rigidité en plus de sa longueur quasi initiale.¹²⁷ Ainsi, d'une façon similaire aux os, le processus d'auto-guérison des propriétés mécaniques des fibres de byssus est possible grâce à plusieurs mécanismes dissipatifs, en plus de l'assemblage hiérarchique des différents éléments la composant.

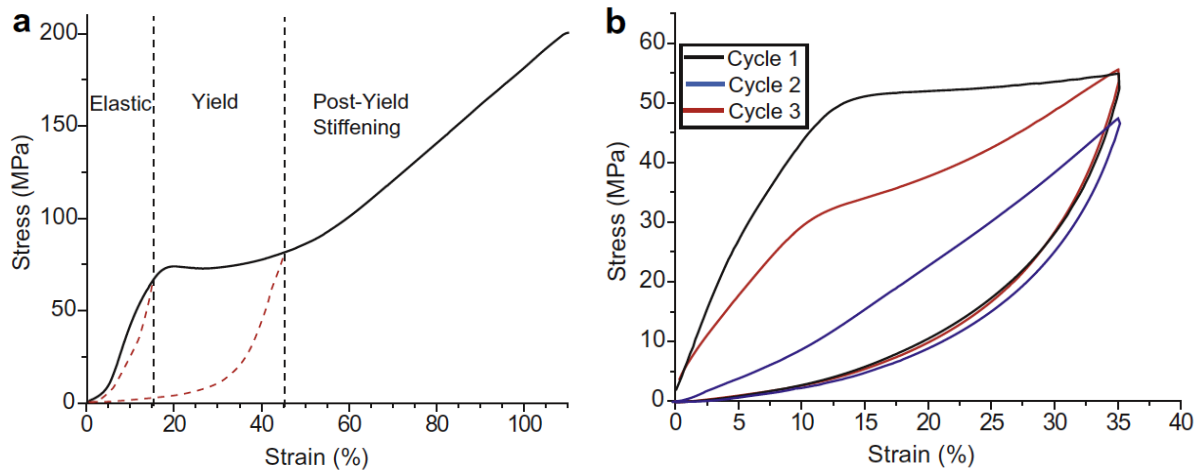


Figure 1.14. (a) Courbe de contrainte-déformation en traction de la partie distale d'une fibre de byssus jusqu'à sa rupture (noir) superposée à une courbe cyclique exercée au delà de la limite d'élasticité de la fibre. (b) Courbes cycliques entre 0 et 35 % de déformation sur une même fibre de byssus. Le cycle 1 (noir) est la courbe initiale, le cycle 2 (bleu) est produit sans temps d'attente suivant le cycle 1, et le cycle 3 (rouge) est produit après 1 h d'attente. Reproduite de la référence 127 © 2009 avec la permission de Elsevier.

Enfin, les moules et leurs fibres de byssus sont un modèle extrêmement élégant d'adaptation biologique permettant de gérer des assauts constants de contrainte mécanique. Ces fibres évitent ainsi à la moule de dépenser son énergie inutilement pour en produire de nouvelles grâce aux processus d'auto-guérison des propriétés mécaniques et des composantes protéiques et organo-métalliques disposées dans un agencement hiérarchique complexe.

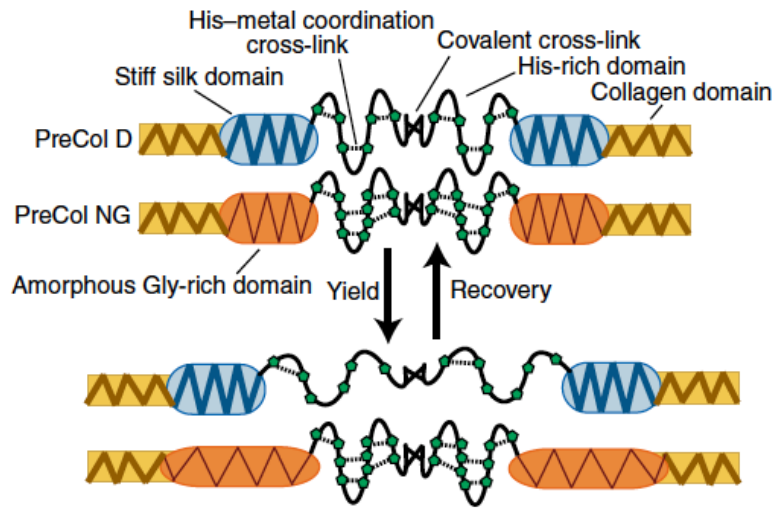


Figure 1.15. Schéma de la déformation et de la réparation des éléments du byssus soumis à une contrainte et menant au processus d'auto-guérison des propriétés mécaniques de la fibre. Les liens sacrificiels entre les métaux et les histidines dans les régions riches en histidines des preCols et la déformation des domaines flanc des preCols jouent un rôle majeur dans ce processus. Reproduite de la référence 118 © 2007 avec la permission de Company of Biologists Ltd : Journal of experimental Biology.

1.5 Objectifs de la thèse

Le byssus de la moule bleue (*Mytilus edulis*) étant traité comme un déchet par l'industrie mytilicole, nous voulions valoriser cette fibre riche en collagène, potentiellement biocompatible, et aux propriétés mécaniques étonnantes. L'objectif principal de cette thèse était d'extraire des protéines du byssus afin d'en préparer des matériaux pour utilisation potentielle comme biomatériaux dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Le premier objectif était donc de réussir à produire et caractériser un extrait de protéines de byssus. Cette étape représentait le plus grand défi du projet puisque cette fibre est hautement réticulée et que son contenu en protéine est hétérogène. Jusqu'ici, les seuls recours ayant permis d'extraire des protéines des fibres de byssus étaient de les traiter avec des bases ou acides concentrés à

chaud, à l'aide d'hypochlorite de sodium, ou grâce à de multiples traitements à l'aide de pepsine dans l'acide acétique.^{136,142} Ces méthodes causaient des problèmes tant en matière de reproductibilité que de rendement et de mise en œuvre des matériaux. Ainsi, les conditions recherchées devaient être suffisamment douces pour permettre de contrôler la qualité et la reproductibilité de l'extrait de protéines de byssus, et fournir un rendement assez élevé pour produire une quantité de matériaux adéquate pour les études subséquentes.

Le deuxième objectif principal était de préparer des films à base des protéines extraites du byssus et de moduler leurs propriétés mécaniques dans un large éventail. Les conditions de formation des films ont donc dû être établies en premier lieu, puis leur processus de formation étudié afin de bien comprendre le système. Ensuite, puisque le byssus est reconnu pour avoir des propriétés mécaniques modulables en fonction du pH¹⁶⁹ et que les protéines sont des polyampholites naturels, nous avons étudié l'effet du pH sur les propriétés mécaniques des films préparés à base de l'extrait de byssus.

Les protéines possédant plusieurs groupements fonctionnels réactifs, nous avons aussi étudié l'effet de la réticulation covalente avec l'EDC et le glutaraldéhyde sur les performances mécaniques des films. La résistance des films *in vitro* face à la collagénase, une enzyme reconnue pour dégrader le collagène, a aussi été étudiée pour évaluer la biodurabilité potentielle de ces films advenant une implantation *in vivo*. La digestion à l'aide de la collagénase avait aussi pour but de confirmer quelles étaient les composantes associées aux structures de collagène dans les spectres infrarouges, et ainsi de mieux comprendre l'organisation moléculaire dans les films à base de protéines byssus.

Enfin, sachant que les performances mécaniques du byssus et le comportement d'auto-guérison sont modulés par les métaux présents dans les fibres de même que par le réseau de protéines élastiques¹¹⁹, nous avons étudié le comportement biomimétique des films lors de l'ajout de différents métaux. Nous voulions ainsi moduler les performances mécaniques des films et étudier le comportement d'auto-guérison créé par la présence de liens sacrificiels grâce à des tests mécaniques cycliques.

1.6 Contenu de la thèse

Le chapitre 2 qui suit le présent chapitre d'introduction porte sur l'extraction des protéines du byssus, leur caractérisation ainsi que leur mise en œuvre sous forme de films. Le mécanisme d'auto-assemblage et la structure moléculaire des films sont étudiés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et les propriétés mécaniques des films en fonction du pH et du gonflement en milieu aqueux sont décrites. Ce chapitre a été publié en tant qu'article dans la revue *Journal of Materials Chemistry B* (Frédéric Byette, Christian Pellerin, Isabelle Marcotte, *J. Mater. Chem. B*, **2014**, 37(2), 6378).

Le chapitre 3 porte sur la modulation des propriétés mécaniques des films de BPH suite à leur réticulation covalente à l'aide de différentes concentrations d'EDC ou de glutaraldéhyde. Ce chapitre présente la relation entre le nombre de groupements amine libres, les performances mécaniques, la résistance à la collagénase et la structure moléculaire suivant les réactions de réticulation. Il sera soumis dans une revue scientifique en 2016.

Le chapitre 4 expose le comportement biomimétique des films de BPH par rapport au byssus natif suite à l'incorporation de liens sacrificiels formés par des interactions électrostatiques entre les acides aminés ou entre les acides aminés et différents métaux (i.e. Na^+ , Ca^{2+} et Fe^{3+}). L'effet de ces liens sacrificiels sur les propriétés mécaniques statiques des films et sur leur comportement d'auto-guérison, tel que mesuré à l'aide de mesures cycliques, est présenté. Des études de spectroscopies Raman et FTIR sont réalisées afin d'établir la relation entre l'incorporation de liens sacrificiels et les propriétés mécaniques résultantes. Ce chapitre a été soumis en tant qu'article dans la revue scientifique *Biomacromolecules*.

Le chapitre 5 conclut la thèse en résumant et reliant les différents résultats des chapitres précédents dans un premier temps. Des perspectives pour des travaux futurs et des avenues alternatives pour produire des matériaux biomimétiques à base de protéines sont finalement présentées.

1.7 Références

1. L. J. Rothschild, *Nature*, 2009, **459**, 335-336.
2. T. A. Blackledge, *J. Arachnol.*, 2012, **40**, 1-12.
3. H. Lee, B. P. Lee, P. B. Messersmith, *Nature*, 2007, **448**, 338-341.
4. K. Jin, J. C. Cremaldi, J. S. Erickson, Y. Tian, J. N. Israelachvili, N. S. Pesika, *Adv. Funct. Mater.*, 2014, **24**, 574-579.
5. K. Jin, Y. Tian, J. S. Erickson, J. Puthoff, K. Autumn, N. S. Pesika, *Langmuir*, 2012, **28**, 5737-5742.
6. H. Lee, S. M. Dellatore, W. M. Miller, P. B. Messersmith, *Science*, 2007, **318**, 426-430.
7. C. R. Matos-Pérez, J. D. White, J. J. Wilker, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 9498-9505.
8. N. Holten-Andersen, M. J. Harrington, H. Birkedal, B. P. Lee, P. B. Messersmith, K. Y. Lee, J. H. Waite, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, **108**, 2651-2655.
9. D. E. Fullenkamp, L. He, D. G. Barrett, W. R. Burghardt, P. B. Messersmith, *Macromolecules*, 2013, **46**, 1167-1174.
10. L. Li, W. Smitthipong, H. Zeng, *Polym. Chem.*, 2014, **6**, 353-358.
11. P. Forbes, *Sci. Am.*, 2008, **299**, 88-95.
12. F. Bouville, E. Maire, S. Meille, B. Van de Moortele, A. J. Stevenson, S. Deville, *Nat. Mater.*, 2014, **13**, 508-514.
13. U. G. Wegst, H. Bai, E. Saiz, A. P. Tomsia, R. O. Ritchie, *Nat. Mater.*, 2015, **14**, 23-36.
14. U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials*, 2003, **24**, 4385-4415.
15. I. V. Yannas, in *Biomaterials Science 2nd Edition: An Introduction to Materials in Medicine*, eds. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, Elsevier Academic Press, San Diego, CA, 2004, ch. 2.8, pp. 127-137.
16. S. Zhang, *Biotechnol. Adv.*, 2002, **20**, 321-339.
17. D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 4th edn., 2013.

18. D. L. Kaplan, *Polym. Degrad. Stab.*, 1998, **59**, 25-32.
19. J. Brinckmann, in *Collagen*, eds. J. Brinckmann, H. Notbohm, P. K. Müller, Springer Berlin Heidelberg, 2005, vol. 247, ch. 1, pp. 1-6.
20. R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod, *Materials*, 2010, **3**, 1863-1887.
21. J. Engel, H. Bächinger, in *Collagen*, eds. J. Brinckmann, H. Notbohm, P. K. Müller, Springer Berlin Heidelberg, 2005, vol. 247, ch. 2, pp. 7-33.
22. A. A. Adzhubei, M. J. E. Sternberg, A. A. Makarov, *J. Mol. Biol.*, 2013, **425**, 2100-2132.
23. J. Gosline, M. Lillie, E. Carrington, P. Guerette, C. Ortlepp, K. Savage, *Phil. Trans. R. Soc. London B*, 2002, **357**, 121-132.
24. A. S. Tatham, P. R. Shewry, *Trends Biochem. Sci.*, 2000, **25**, 567-571.
25. T. Scheibel, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2005, **16**, 427-433.
26. R. A. Anwar, *Biochem. Educ.*, 1990, **18**, 162-166.
27. D. R. Eyre, M. A. Paz, P. M. Gallop, *Annu. Rev. Biochem.*, 1984, **53**, 717-748.
28. A. S. Tatham, P. R. Shewry, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2002, **357**, 229-234.
29. D. W. Urry, T. Hugel, M. Seitz, H. E. Gaub, L. Sheiba, J. Dea, J. Xu, T. Parker, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2002, **357**, 169-184.
30. F. Biette, F. Bouchard, C. Pellerin, J. Paquin, I. Marcotte, M. Mateescu, *Polym. Bull.*, 2011, **67**, 159-175.
31. G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D. L. Kaplan, *Biomaterials*, 2003, **24**, 401-416.
32. T. A. Blackledge, C. Y. Hayashi, *J. Exp. Biol.*, 2006, **209**, 2452-2461.
33. J. M. Gosline, M. E. DeMont, M. W. Denny, *Endeavour*, 1986, **10**, 37-43.
34. A. Nova, S. Keten, N. M. Pugno, A. Redaelli, M. J. Buehler, *Nano Lett.*, 2010, **10**, 2626-2634.
35. M. Betz, J. Hormansperger, T. Fuchs, U. Kulozik, *Soft Matter*, 2012, **8**, 2477-2485.

36. S. Gunasekaran, S. Ko, L. Xiao, *J. Food Eng.*, 2007, **83**, 31-40.
37. S. Gunasekaran, L. Xiao, M. M. Ould Eleya, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2006, **99**, 2470-2476.
38. D. Sağlam, P. Venema, R. de Vries, E. van der Linden, *Soft Matter*, 2013, **9**, 4598.
39. H. Saito, T. Taguchi, H. Aoki, S. Murabayashi, Y. Mitamura, J. Tanaka, T. Tateishi, *Acta Biomater.*, 2007, **3**, 89-94.
40. P. Gupta, K. Vermani, S. Garg, *Drug Discov. Today*, 2002, **7**, 569-579.
41. M. M. Welz, C. M. Ofner, *J. Pharm. Sci.*, 1992, **81**, 85-90.
42. C. Li, L. Xing, S. Che, *Dalton Trans*, 2012, **41**, 3714-3719.
43. H.-Y. Park, I.-H. Song, J.-H. Kim, W.-S. Kim, *Int. J. Pharm.*, 1998, **175**, 231-236.
44. A. Maltais, G. E. Remondetto, M. Subirade, *Food Hydrocolloids*, 2009, **23**, 1647-1653.
45. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, in *Biomaterials Science 2nd Edition: An Introduction to Materials in Medicine*, eds. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, Elsevier Academic Press, San Diego, CA, 2004, pp. 1-10.
46. S. P. Hoerstrup, L. Lu, M. J. Lysaght, A. G. Mikos, D. Rein, F. J. Schoen, J. S. Temenoff, J. K. Tessmar, J. P. Vacanti, in *Biomaterials Science 2nd Edition: An Introduction to Materials in Medicine*, eds. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, Elsevier Academic Press, San Diego, CA, 2004, ch. 8, pp. 709-749.
47. C. L. Batich, Patrick, in *Standard Handbook of Biomedical Engineering & Design*, ed. M. Kutz, McGraw-Hill, New-York, NY, 2003, ch. 11, pp. 11.13-11.30.
48. J. Curtis, A. Colas, in *Biomaterials Science 2nd Edition: An Introduction to Materials in Medicine*, eds. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, Elsevier Academic Press, San Diego, CA, 2004, ch. 7.19, pp. 697-707.
49. A. J. Coury, R. J. Levy, B. D. Ratner, F. J. Schoen, D. F. Williams, R. L. Williams, in *Biomaterials Science 2nd Edition: An Introduction to Materials in Medicine*, eds. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, Elsevier Academic Press, San Diego, CA, 2004, ch. 6, pp. 411-454.
50. C. Z. Liu, Z. D. Xia, Z. W. Han, P. A. Hulley, J. T. Triffitt, J. T. Czernuszka, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2008, **85**, 519-528.

51. X. Wang, H. J. Kim, C. Wong, C. Vepari, A. Matsumoto, D. L. Kaplan, *Mater. Today*, 2006, **9**, 44-53.
52. S. Gorgieva, V. Kokol, Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives, in *Biomaterials Applications for Nanomedicine*, ed. R. Pignatello, InTech, 2011, pp. 17-52.
53. W. F. Daamen, J. H. Veerkamp, J. C. van Hest, T. H. van Kuppevelt, *Biomaterials*, 2007, **28**, 4378-4398.
54. C. Vepari, D. L. Kaplan, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, **32**, 991-1007.
55. E. Vatankhah, D. Semnani, M. P. Prabhakaran, M. Tadayon, S. Razavi, S. Ramakrishna, *Acta Biomater.*, 2014, **10**, 709-721.
56. S. Nemir, J. L. West, *Ann. Biomed. Eng.*, 2010, **38**, 2-20.
57. H. N. Kim, D. H. Kang, M. S. Kim, A. Jiao, D. H. Kim, K. Y. Suh, *Ann. Biomed. Eng.*, 2012, **40**, 1339-1355.
58. A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher, *Cell*, 2006, **126**, 677-689.
59. M. Levy-Mishali, J. Zoldan, S. Levenberg, *Tissue Eng. Part A*, 2009, **15**, 935-944.
60. S. K. Seidlits, Z. Z. Khaing, R. R. Petersen, J. D. Nickels, J. E. Vanscoy, J. B. Shear, C. E. Schmidt, *Biomaterials*, 2010, **31**, 3930-3940.
61. N. Özkaya, M. Nordin, D. Goldsheyder, D. Leger, in *Fundamentals of Biomechanics*, Springer New York, 2012, ch. 15, pp. 221-236.
62. N. Sasaki, Viscoelastic Properties of Biological Materials, in *Viscoelasticity - From Theory to Biological Applications*, ed. J. de Vicente, In Tech, 2012, ch. 5, pp. 99-122.
63. D. François, A. Pineau, A. Zaoui, *Mechanical Behaviour of Materials Volume 1: Micro- and Macroscopic constitutive Behaviour*, Springer Dordrecht Heidelberg, London New-York, 2012.
64. J. D. Ferry, *Viscoelastic Properties of Polymers, 3rd Edition*, John Wiley & Sons, Inc., 1980.
65. J. H. Rösler, H.; Bäker, M., *Mechanical Behaviour of Engineering Materials*, Springer Berlin Heidelberg New-York, 2006.
66. D. Roylance, personal communication. <http://ocw.mit.edu/courses/materials-science-and-engineering/3-11-mechanics-of-materials-fall-1999/modules/visco.pdf>. 2001.

67. M. G. Haugh, C. M. Murphy, R. C. McKiernan, C. Altenbuchner, F. J. O'Brien, *Tissue Eng. Part A*, 2011, **17**, 1201-1208.
68. R. M. Dunn, *Plast. Reconstr. Surg.*, 2012, **130**, 18S-26S.
69. K. S. Weadock, E. J. Miller, E. L. Keuffel, M. G. Dunn, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1996, **32**, 221-226.
70. A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, K. Rubini, N. Roveri, *Biomaterials*, 2001, **22**, 763-768.
71. L. H. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. A. Van Luyn, P. B. Van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1995, **6**, 460-472.
72. P. Hansen, T. Hassenkam, R. B. Svensson, P. Aagaard, T. Trappe, B. T. Haraldsson, M. Kjaer, P. Magnusson, *Connect. Tissue Res.*, 2009, **50**, 211-222.
73. R. J. Levy, F. J. Schoen, F. S. Sherman, J. Nichols, M. A. Hawley, S. A. Lund, *Am. J. Pathol.*, 1986, **122**, 71-82.
74. H. M. Powell, S. T. Boyce, *Biomaterials*, 2006, **27**, 5821-5827.
75. F. Everaerts, M. Torrianni, M. van Luyn, P. van Wachem, J. Feijen, M. Hendriks, *Biomaterials*, 2004, **25**, 5523-5530.
76. Y. Liu, L. Gan, D. J. Carlsson, P. Fagerholm, N. Lagali, M. A. Watsky, R. Munger, W. G. Hodge, D. Priest, M. Griffith, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2006, **47**, 1869-1875.
77. A. Sionkowska, J. Skopinska-Wisniewska, M. Gawron, J. Kozłowska, A. Planecka, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2010, **47**, 570-577.
78. M. Rafiuddin Ahmed, R. Jayakumar, *Brain Res.*, 2003, **993**, 208-216.
79. G. A. Monteiro, A. V. Fernandes, H. G. Sundararaghavan, D. I. Shreiber, *Tissue Eng. Part A*, 2011, **17**, 1663-1673.
80. L. B. Koh, M. M. Islam, D. Mitra, C. W. Noel, K. Merrett, S. Odorcic, P. Fagerholm, W. B. Jackson, B. Liedberg, J. Phopase, M. Griffith, *J. Funct. Biomater.*, 2013, **4**, 162-177.
81. R. Zeeman, P. J. Dijkstra, P. B. van Wachem, M. J. A. van Luyn, M. Hendriks, P. T. Cahalan, J. Feijen, *Biomaterials*, 1999, **20**, 921-931.
82. P. B. van Wachem, R. Zeeman, P. J. Dijkstra, J. Feijen, M. Hendriks, P. T. Cahalan, M. J. A. van Luyn, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, **47**, 270-277.

83. X. Zhang, X. Chen, T. Yang, N. Zhang, L. Dong, S. Ma, X. Liu, M. Zhou, B. Li, *Cell Tissue Bank.*, 2014, **15**, 531-541.
84. K. Zhang, Y. Qian, H. Wang, L. Fan, C. Huang, A. Yin, X. Mo, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2010, **95**, 870-881.
85. D. Y. Chau, R. J. Collighan, E. A. Verderio, V. L. Addy, M. Griffin, *Biomaterials*, 2005, **26**, 6518-6529.
86. M. K. McHale, L. A. Setton, A. Chilkoti, *Tissue Eng.*, 2005, **11**, 1768-1779.
87. P. Taddei, V. Chiono, A. Anghileri, G. Vozzi, G. Freddi, G. Ciardelli, *Macromol. Biosci.*, 2013, **13**, 1492-1510.
88. K. S. Weadock, E. J. Miller, L. D. Bellincampi, J. P. Zawadsky, M. G. Dunn, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1995, **29**, 1373-1379.
89. P. R. Stoessel, R. N. Grass, A. Sánchez-Ferrer, R. Fuhrer, T. Schweizer, R. Mezzenga, W. J. Stark, *Adv. Funct. Mater.*, 2014, **24**, 1831-1839.
90. W. Mingche, G. Pins, F. Silver, *Biomaterials*, 1994, **15**, 507-512.
91. Q. Lu, X. Hu, X. Wang, J. A. Kluge, S. Lu, P. Cebe, D. L. Kaplan, *Acta Biomater.*, 2010, **6**, 1380-1387.
92. S.-J. He, R. Valluzzi, S. P. Gido, *Int. J. Biol. Macromol.*, 1999, **24**, 187-195.
93. S. Sohn, H. H. Strey, S. P. Gido, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 751-757.
94. M. Ishida, T. Asakura, M. Yokoi, H. Saito, *Macromolecules*, 1990, **23**, 88-94.
95. X. Hu, K. Shmelev, L. Sun, E.-S. Gil, S.-H. Park, P. Cebe, D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 1686-1696.
96. X. Hu, D. Kaplan, P. Cebe, *Macromolecules*, 2008, **41**, 3939-3948.
97. X. Hu, D. Kaplan, P. Cebe, *Macromolecules*, 2006, **39**, 6161-6170.
98. R. Nazarov, H.-J. Jin, D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 718-726.
99. L. Uebersax, H. P. Merkle, L. Meinel, *J. Controlled Release*, 2008, **127**, 12-21.
100. U.-J. Kim, J. Park, H. Joo Kim, M. Wada, D. L. Kaplan, *Biomaterials*, 2005, **26**, 2775-2785.
101. Q. Lv, C. Cao, Y. Zhang, X. Ma, H. Zhu, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2005, **96**, 2168-2173.

102. X. Hu, D. Kaplan, P. Cebe, *Thermochim. Acta*, 2007, **461**, 137-144.
103. H. J. Jin, J. Park, V. Karageorgiou, U. J. Kim, R. Valluzzi, P. Cebe, D. L. Kaplan, *Adv. Funct. Mater.*, 2005, **15**, 1241-1247.
104. M. de Wild, W. Pomp, G. H. Koenderink, *Biophys. J.*, 2013, **105**, 200-210.
105. G. E. Fantner, E. Oroudjev, G. Schitter, L. S. Golde, P. Thurner, M. M. Finch, P. Turner, T. Gutsmann, D. E. Morse, H. Hansma, P. K. Hansma, *Biophys. J.*, 2006, **90**, 1411-1418.
106. G. E. Fantner, T. Hassenkam, J. H. Kindt, J. C. Weaver, H. Birkedal, L. Pechenik, J. A. Cutroni, G. A. Cidade, G. D. Stucky, D. E. Morse, P. K. Hansma, *Nat. Mater.*, 2005, **4**, 612-616.
107. C. K. C. Lieou, A. E. Elbanna, J. M. Carlson, *Phys. Rev. E*, 2013, **88**, 1-10.
108. Z. Chen, H. Lu, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 12479-12490.
109. P. Fratzl, *J. R. Soc. Interface*, 2007, **4**, 637-642.
110. P. Fratzl, R. Weinkamer, *Prog. Mater. Sci.*, 2007, **52**, 1263-1334.
111. P. Fratzl, in *Collagen*, ed. P. Fratzl, Springer US, 2008, ch. 1, pp. 1-13.
112. M. E. Launey, M. J. Buehler, R. O. Ritchie, *Annu. Rev. Mater. Res.*, 2010, **40**, 25-53.
113. S. Keten, M. J. Buehler, *J. R. Soc. Interface*, 2010, **7**, 1709-1721.
114. S. Keten, Z. Xu, B. Ihle, M. J. Buehler, *Nat. Mater.*, 2010, **9**, 359-367.
115. N. Becker, E. Oroudjev, S. Mutz, J. P. Cleveland, P. K. Hansma, C. Y. Hayashi, D. E. Makarov, H. G. Hansma, *Nat. Mater.*, 2003, **2**, 278-283.
116. A. S. Tatham, P. R. Shewry, *Trends Biochem. Sci.*, 2000, **25**, 567-571.
117. Y. Liu, Z. Shao, F. Vollrath, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 1782-1786.
118. M. J. Harrington, J. H. Waite, *J. Exp. Biol.*, 2007, **210**, 4307-4318.
119. S. Krauss, T. H. Metzger, P. Fratzl, M. J. Harrington, *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 1520-1528.
120. E. Vaccaro, J. H. Waite, *Biomacromolecules*, 2001, **2**, 906-911.

121. E. Degtyar, B. Mlynarczyk, P. Fratzl, M. J. Harrington, *Polymer*, 2015, **69**, 255-263.
122. J. B. Thompson, J. H. Kindt, B. Drake, H. G. Hansma, D. E. Morse, P. K. Hansma, *Nature*, 2001, **414**, 773-776.
123. K. Bertoldi, M. Boyce, *J. Mat. Sci.*, 2007, **42**, 8943-8956.
124. E. Carrington, J. M. Gosline, *Am. Malacol. Bull.*, 2004, **18**, 135-142.
125. D. De Tommasi, G. Puglisi, G. Saccomandi, *Biophys. J.*, 2010, **98**, 1941-1948.
126. E. Degtyar, M. J. Harrington, Y. Politi, P. Fratzl, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 12026-12044.
127. M. J. Harrington, H. S. Gupta, P. Fratzl, J. H. Waite, *J. Struct. Biol.*, 2009, **167**, 47-54.
128. M. J. Harrington, A. Masic, N. Holten-Andersen, J. H. Waite, P. Fratzl, *Science*, 2010, **328**, 216-220.
129. H. Zhao, J. H. Waite, *Biochemistry*, 2006, **45**, 14223-14231.
130. S. Schmidt, A. Reinecke, F. Wojcik, D. Pussak, L. Hartmann, M. J. Harrington, *Biomacromolecules*, 2014, **15**, 1644-1652.
131. D. G. Barrett, D. E. Fullenkamp, L. He, N. Holten-Andersen, K. Y. C. Lee, P. B. Messersmith, *Adv. Funct. Mater.*, 2013, **23**, 1111-1119.
132. Statistics Canada, Aquaculture Statistics 2010, <http://www.statcan.gc.ca/pub/23-222-x/23-222-x2011000-eng.htm>, (Accédé juillet 20, 2015).
133. H. Silverman, F. Roberto, in *Biological Adhesive Systems*, eds. J. Byern, I. Grunwald, Springer Vienna, 2010, ch. 18, pp. 273-283.
134. A. Tamarin, P. J. Keller, *J. Ultrastruct. Res.*, 1972, **40**, 401-416.
135. Z. Qin, M. J. Buehler, *Nat. Commun.*, 2013, **4**, 2187.
136. C. H. Brown, *Q. J. Microsc. Sci.*, 1952, **93**, 487-502.
137. T. Lefèvre, F. Byette, I. Marcotte, M. Auger, in *Functional Materials: For Energy, Sustainable Development and Biomedical Sciences*, eds. M. Leclerc, R. Gauvin, Walter de Gruyter GmbH & Co KG, Berlin/Boston, 2014, pp. 415-442.
138. R. Hennebicq, G. Fabra, C. Pellerin, I. Marcotte, B. Myrand, R. Tremblay, *Aquaculture*, 2013, **410-411**, 11-17.

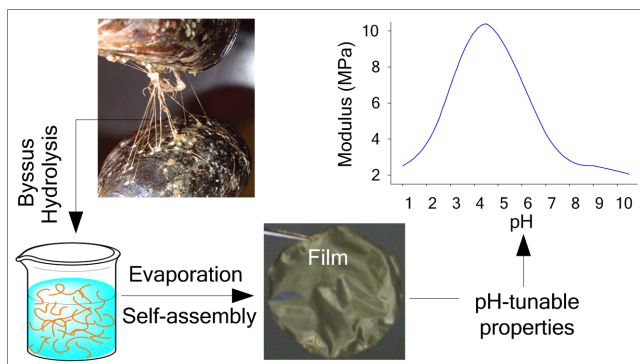
139. J. H. Waite, E. Vaccaro, C. Sun, J. M. Lucas, *Phil. Trans. R. Soc. London B*, 2002, **357**, 143-153.
140. N. Holten-Andersen, J. H. Waite, *J. Dent. Res.*, 2008, **87**, 701-709.
141. K. Coyne, J. Waite, *J. Exp. Biol.*, 2000, **203**, 1425-1431.
142. X. Qin, J. H. Waite, *J. Exp. Biol.*, 1995, **198**, 633-644.
143. X.-X. Qin, K. J. Coyne, J. H. Waite, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 32623-32627.
144. J. H. Waite, X.-X. Qin, K. J. Coyne, *Matrix Biol.*, 1998, **17**, 93-106.
145. J. H. Waite, H. C. Lichtenegger, G. D. Stucky, P. Hansma, *Biochemistry*, 2004, **43**, 7653-7662.
146. T. Hassenkam, T. Gutschmann, P. Hansma, J. Sagert, J. H. Waite, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 1351-1355.
147. M. J. Harrington, J. H. Waite, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 1480-1486.
148. N. Holten-Andersen, G. E. Fantner, S. Hohlbauch, J. H. Waite, F. W. Zok, *Nat. Mater.*, 2007, **6**, 669-672.
149. C. Sun, J. H. Waite, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 39332-39336.
150. B. P. Lee, P. B. Messersmith, J. N. Israelachvili, J. H. Waite, *Annu. Rev. Mater. Res.*, 2011, **41**, 99-132.
151. D. E. Fullenkamp, J. G. Rivera, Y.-k. Gong, K. H. A. Lau, L. He, R. Varshney, P. B. Messersmith, *Biomaterials*, 2012, **33**, 3783-3791.
152. L. A. Burzio, J. H. Waite, *Biochemistry*, 2000, **39**, 11147-11153.
153. T. J. Deming, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1999, **3**, 100-105.
154. C. Fant, H. Elwing, F. Hook, *Biomacromolecules*, 2002, **3**, 732-741.
155. C. Fant, J. Hedlund, F. Höök, M. Berglin, E. Fridell, H. Elwing, *J. Adhes.*, 2010, **86**, 25-38.
156. D. S. Hwang, H. Zeng, A. Masic, M. J. Harrington, J. N. Israelachvili, J. H. Waite, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 25850-25858.
157. Q. Lin, D. Gourdon, C. Sun, N. Holten-Andersen, T. H. Anderson, J. H. Waite, J. N. Israelachvili, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, **104**, 3782-3786.

158. H. Silverman, F. Roberto, *Mar. Technol.*, 2007, **9**, 661-681.
159. J. H. Waite, *Biological Reviews*, 1983, **58**, 209-231.
160. J. H. Waite, *Integr. Comp. Biol.*, 2002, **42**, 1172-1180.
161. J. Yu, W. Wei, E. Danner, R. K. Ashley, J. N. Israelachvili, J. H. Waite, *Nat. Chem. Biol.*, 2011, **7**, 588-590.
162. H. Zeng, D. S. Hwang, J. N. Israelachvili, J. H. Waite, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, **107**, 12850-12853.
163. H. Zhao, N. B. Robertson, S. A. Jewhurst, J. H. Waite, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 11090-11096.
164. H. Zhao, J. H. Waite, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 26150-26158.
165. E. C. Bell, J. M. Gosline, *J. Exp. Biol.*, 1996, **199**, 1005-1017.
166. J. M. Lucas, E. Vaccaro, J. H. Waite, *J. Exp. Biol.*, 2002, **205**, 1807-1817.
167. N. Holten-Andersen, T. E. Mates, M. S. Toprak, G. D. Stucky, F. W. Zok, J. H. Waite, *Langmuir*, 2009, **25**, 3323-3326.
168. A. Hagenau, P. Papadopoulos, F. Kremer, T. Scheibel, *J. Struct. Biol.*, 2011, **175**, 339-347.
169. J. Waite, J. Weaver, E. Vaccaro, in *Bionanotechnology - Proteins to Nanodevices*, eds. V. Renugopalakrishnan, R. V. Lewis, Springer, Netherland, 2006, pp. 25-38.

Chapitre 2 : Self-assembled pH-responsive Films Prepared from Mussel Anchoring Threads*

2.1 Abstract

The byssus is a series of collagen-rich fibers securing mussels to surfaces. The complex but elegant heterogeneous assembly of the various proteins in the threads is responsible for their remarkable mechanical properties combining strength and extensibility. Along with the well-



known biocompatibility and biodegradability attributed to collagen-based materials, these mechanical properties are highly desirable to produce biomaterials for soft tissue engineering and drug delivery applications. In order to replicate the byssus natural features and properties, we prepared a soluble byssus protein hydrolyzate (BPH) that can generate water-insoluble self-standing films. Atomic force and scanning electron microscopy revealed the presence of self-assembled collagen-like fibrils at the surface of the films. Infrared spectroscopy analysis of the film formation showed that insolubility is caused by the self-assembly of polypeptides from the hydrolyzate into antiparallel β -sheets, aggregated β -strands and collagen triple-helix structures. The mechanical properties and water swelling measurements on the films can be reversibly pH-modulated by modifying the electrostatic interactions between the ~30 mol % of charged amino acids. Optimal mechanical properties and minimum swelling are obtained at the isoelectric point (pH 4.5). Higher or lower pH treatment reversibly decreases their stiffness and strength and increases their swelling ratio. Altogether, our results show that byssus proteins are an interesting sustainable feedstock for preparing new solid-state pH-tunable biomaterials.

* Publié en tant qu'article dans Journal of Materials Chemistry B : Frédéric Byette; Christian Pellerin; Isabelle Marcotte, *J. Mater. Chem. B*, 2014, 2, 6378-6386.

2.2 Introduction

Collagen, silk, and keratin are among natural fibrous proteins that have greatly inspired materials scientists, especially in the field of biomaterials for tissue engineering.¹⁻⁵ These proteins are composed of repetitive amino acid sequences that enable their self-assembly into superstructures such as filaments, fibrils and fibers with outstanding mechanical properties. Moreover, their natural origin enhances their potential biocompatibility and biodegradability when compared to synthetic polymers, metal alloys and ceramics. Bio-inspired biomaterials are being widely explored in an attempt to mimic such natural fibers. In this work, we sought to generate films with proteins extracted from a naturally occurring collagen-rich fiber with exceptional properties - the mussel's byssus thread.

The byssus is the holdfast used by mussels to anchor to solid surfaces in the intertidal zone to resist the lift and drag forces of currents, waves and tides. Like spider silk, these fibers demonstrate a combination of strength and stiffness while remaining extensible. These mechanical properties, along with a low resilience, lead to the impressive toughness of the byssus.⁶ A single byssus thread produced by the blue mussel (*Mytilus edulis*) has a diameter around 100 μm and a length of 2-3 cm. Proteins account for about 95 % of its dry mass, the rest being attributable to carbohydrates and inorganic constituents.⁷ One third of the fiber is composed of a corrugated and elastic region named the proximal part (near the animal). It is followed by a smooth and stiff distal part (two thirds of the thread) and it ends with a plaque that adheres to the animal's substrate immersed in water. This underwater adhesion is made possible by the 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) moieties found in the proteins of the plaque as well as in the cuticle that covers the entire fiber. These DOPA-containing proteins, the so-called mussel foot proteins (mfp), have attracted the interest of many researchers trying to understand and to biomimic this particular adhesive behavior.⁸⁻¹⁰

The core of the byssus fiber, in contrast, has not been exploited so far for materials development. It is composed of three block copolymer-like proteins comprising collagen domains, as determined by amino acid and spectroscopic analyses.^{11,12} These proteins, first evidenced in glands of the mussel foot, are called preCols as they are precursors of the final collagenous fibrous core assembly. They are found in different forms as a gradient along the

fiber. PreCol-P is mostly found in the proximal region, preCol-D in the distal part, and preCol-NG is non-graded throughout the entire length of the fiber.^{13,14} It is noteworthy that the collagen portion of the preCols is potentially biocompatible and amounts for *ca.* 42 % of the total protein content.¹² The three preCol proteins have different flanking domains on both sides of their central collagen core. The amino acid sequence of these regions is analogous to elastin in the case of preCol-P, silk fibroin for preCol-D, and proteins from the plant cell wall for preCol-NG.¹⁴ The preCols are clustered in 6+1 banana-shaped bundles and assembled in a head-to-head tail-to-tail fashion via histidine-rich termini cross-linked by cations.¹⁵ Studies on the byssus molecular structure have highlighted the presence of parallel and anti-parallel β -sheets, aggregated strands, as well as collagen triple helices in the core of the fiber.^{12,16} The cuticle was found to be mostly unordered.^{12,17} Because of the highly cross-linked structure of the byssus, its proteins are water insoluble and resist to most chemical treatments including trypsin and pepsin digestion, dilute acids and bases, as well as denaturants.^{11,18} Until now, the only recourse for recovering collagen from byssus has been acid extraction coupled with an extensive pepsin treatment.¹³

Since the byssus fiber shows impressive mechanical properties arising from the complex assembly of its heterogeneous protein content, the objective of our work was to extract these proteins to produce biomimetic materials. Here, we describe a simple and effective method to generate a reproducible byssal proteins hydrolyzate (BPH) that has good film-forming ability. The morphology of the films was examined using atomic force and scanning electron microscopy. Infrared spectroscopy was used to study the structural changes involved in the formation of the films and to explain their inherent water insolubility by polypeptides self-assembly. Tensile mechanical properties, along with water swelling ratio, were measured on the films at different pH. Their reversible pH-tunable properties are explained by the high content (~30 %) of charged amino acids detected.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Materials

Byssi were kindly provided by Moules de Culture des Îles Inc. (Magdalen Islands QC, Canada) and MenuMer Ltée (Gaspé, QC, Canada). Byssal threads were thoroughly washed using soap under tap water before being rinsed several times with distilled water and frozen at -20°C until their use. All other chemicals were of reagent grade and were used without further purification.

2.3.2 Methods

2.3.2.1 Byssal proteins hydrolyzate (BPH) extract preparation

Thawed byssi were crushed in liquid nitrogen using a mortar and pestle to ease the stirring during extraction. The byssus fragments were stirred in ethanol (70 %) for 3 periods of at least 1 h with vacuum filtration between the washes, then finally rinsed with distilled water and freeze-dried. Extraction was performed at 4°C for 7 days under magnetic stirring by mixing 5 g of byssus in 150 mL of a 0.2 M potassium chloride (KCl), 0.1 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer solution with 1.5 M sodium hydroxide (NaOH), having a final pH around 13.5. The resulting slurry was then centrifuged at 5000 rpm for 60 min at 4°C to remove non-solubilized particles and the supernatant was vacuum-filtered on two layers of Whatman #1 membranes. Proteins in the supernatant were precipitated at 4°C by adjusting the pH to 4.5 using 4 M acetic acid, and sodium chloride was added to reach a final concentration of 0.5 M. The proteins were left to precipitate for 1 h before being pelleted by centrifugation at 5000 rpm at 4°C for 20 min. The supernatant was discarded and the precipitate dispersed in water before being dialyzed (MWCO 6-8 kDa) (SpectraPor 3, Spectrum Lab Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) for 3 days against distilled water with several changes of water. The precipitate was finally pelleted by centrifugation at 5000 rpm for 20 min at 4°C before being freeze-dried.

2.3.2.2 SDS-PAGE analysis

A small amount of the BPH extract was dispersed in distilled water before adjusting the pH to 10.5 using NaOH. The sample was incubated at 95°C in denaturing conditions for 5 min and loaded on an 8 % polyacrylamide gel. Proteins in the gel were stained using Coomassie blue R-250. The apparent molecular weight was compared to a Precision Plus Protein™ dual color standards (BioRad, Mississauga, ON, Canada) loaded on the same gel.

2.3.2.3 Amino acid analysis

The analyses were performed at the Advanced Protein Technology Center of the Hospital for Sick Children (SickKids®, Toronto, ON, Canada). Briefly, about 5 mg of each sample were mixed with 200 µL of 6.0 N HCl and 50 µL of internal standards and hydrolyzed for 24 h at 110°C. After hydrolysis, solutions were centrifuged and 10 µL of supernatant were used for the derivatization with phenylisothiocyanate. Derivatized amino acids were redissolved in 200 µL of phosphate buffer and 1 µL was injected in a Waters Pico-Tag system with a Waters Alliance 2690 HPLC and a Waters 2487 dual wavelength absorbance detector.

2.3.2.4 Films preparation and pH treatment

The lyophilized BPH was dispersed into water and its pH adjusted to 10.5 using NaOH, leading to a final slurry concentration of 10 mg/mL. Since the protein extract is difficult to solubilize, the solution was vortexed for 1 min and sonicated for another 1 min before being filtered on a 100 µm pore Nylon membrane to remove any clumps. The solution was finally degassed in a sonication bath under vacuum and 1 mL was poured into each well of a homemade Teflon mold (49 circular wells of 2.0 cm diameter). The solutions were left to evaporate under a fume hood until a dry film was obtained, usually for 72 to 96 h. Attempts to accelerate the drying procedure by heating, using a vacuum oven or flowing air at high debit, resulted in cracked and brittle films. The films were peeled off, washed with distilled water for 30 min before being immersed in various buffers at different pH for 2 h at room temperature. The films were finally stored in distilled water until characterization.

2.3.2.5 Attenuated total reflection (ATR) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy

Infrared spectra were obtained using a Bruker Tensor 27 spectrometer (Billerica, MA, USA) with a liquid nitrogen-cooled mercury-cadmium-telluride detector and a Golden Gate diamond ATR accessory. Each spectrum was acquired by averaging 256 scans with a 4 cm⁻¹ resolution. Spectra processing and analyses were carried out using GRAMS/AI v.7.00 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Briefly, spectra were baseline corrected as needed and smoothed using a Savitzky-Golay algorithm on 9-13 points. The second derivative traces of the spectra were obtained using Savitzky-Golay algorithm on 5-9 points. The resulting second derivative curves were then multiplied by -1, thus inverting the traces to ease comparison with the original spectra.

2.3.2.6 Scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM)

The films were gold sputtered then imaged using a Quanta 200 FEG environmental SEM (FEI, Hillsboro, OR, USA) under high vacuum mode, with an accelerating voltage of 20 kV and a working distance between 5 and 10 mm. AFM images were acquired in air at room temperature using tapping mode on a Digital Instruments MultiMode AFM (Bruker, Santa Barbara, CA, USA). Intermittent contact imaging was performed at a scan rate of 0.5-1 Hz using etched silicon cantilevers (ACTA from AppNano, Mountain View, CA, USA) with a resonance frequency around 300 kHz, a spring constant of ~ 42 N/m, and a tip radius <10 nm. All images were acquired with a medium tip oscillation damping (20-30 %).

2.3.2.7 Mechanical testing

Stress-strain curves of films sections (10 mm x 5 mm) were acquired using an Instron 5465 mechanical testing frame (Norwood, MA, USA) equipped with a 50 N load cell and a Biopuls bath filled with distilled water at 37°C. Films were pre-hydrated in distilled water and

mounted between the apparatus' jaws before applying a constant extension rate of 5 mm/min. The modulus was calculated using the initial linear portion of the curve, typically between 2 and 5 % strain.

2.3.2.8 Equilibrium swelling ratio and water uptake measurements

The films were immersed in distilled water until equilibrium was reached (1 h). The excess of water was removed using lint-free cloth and the weight of the wet samples (W_s) was measured. Samples were then dried overnight at 60°C before determining the dry weight (W_d). The equilibrium swelling ratio and water content were calculated as:

$$\text{Swelling ratio} = \frac{(W_s - W_d)}{W_d} \quad (2.1)$$

$$\text{Water uptake (\%)} = \left[\frac{(W_s - W_d)}{W_s} \right] \times 100 \quad (2.2)$$

2.4 Results and discussion

2.4.1 Byssal protein hydrolyzate (BPH) isolation and characterization

Byssal threads are a complex assembly of various proteins that are highly cross-linked and therefore very difficult to solubilize. Since our goal was to biomimic the byssal threads by producing biomaterials from regenerated proteins, we used a top down approach to extract the highest protein content possible. Indeed, to achieve extraction of proteins from the fibers, we used an alkaline (pH \approx 13.5) hydrolyzing route in the presence of EDTA. EDTA is known to remove metals involved in some of the protein cross-links^{14,19,20} and thus helped extraction by softening the byssal threads. Subsequent purification by salting out, precipitation at the isoelectric point (pI), and dialysis, homogenized the extracts and led to a reproducible BPH. The BPH has a foam texture and a beige color after lyophilization. It is poorly soluble at both

acidic and neutral pH, but can be dissolved to form brownish viscous solutions at alkaline pH (10.5 and higher).

As seen from the amino acid analysis in figure 2.1 (table 2.S1 in supporting information), the major difference between the byssus and the BPH resides in a lower glycine fraction in the extracts than in the whole byssus threads. Since the hydrolyzate is produced under alkaline conditions, it is possible that glycine-rich and silk-like domains were not extracted as efficiently as other protein regions due to their highly hydrophobic potential. These amino acid sequences may hinder the access to water molecules, thus preventing an effective hydrolysis of the amide bonds in the protein backbone.

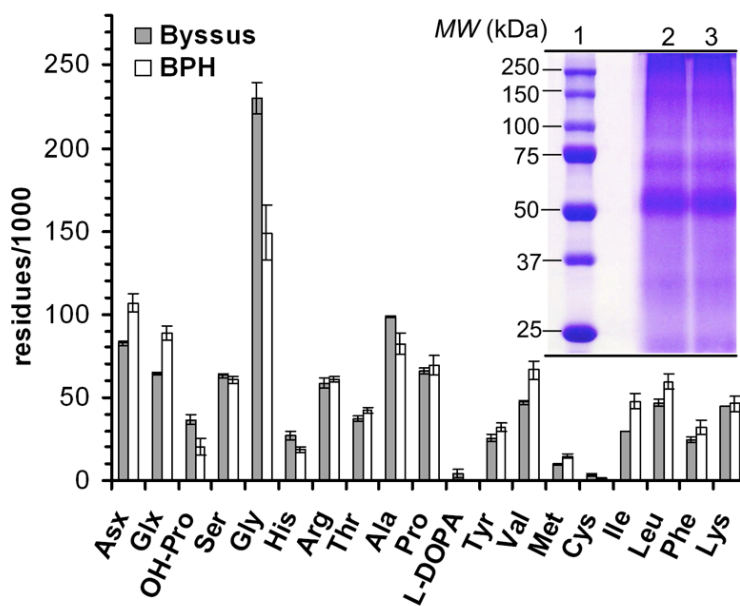


Figure 2.1. Amino acid analysis of the byssus and of the BPH and (inset) SDS-PAGE of the purified BPH (lanes 2 and 3). Lane 1 presents the protein standards.

The amino acid analysis profile also shows that the content of Asx and Glx is higher in the extracts than in the byssus. Even though it is not possible to discriminate aspartic acid from asparagine, nor glutamic acid from glutamine, we assume that the hydrolysis of these side chains is complete and, thus, that the BPH possesses more acidic moieties than the whole

byssus. Indeed, a potentiometric titration of the BPH revealed an isoelectric point (pI) around 4.5. We performed a theoretical calculation of the pI using ExPASy²¹ by assuming that all glutamines and asparagines were hydrolyzed to their respective acid form. Even if we did not know the primary amino acid sequence or the local charge distribution in the environment, the computed pI/Mw tool led to a value of 4.46, in excellent agreement with the experimental data. The total content in charged amino acids was estimated to be ~30 % by summing the contributions of histidine, lysine, arginine, aspartate and glutamate, strongly suggesting that the electrostatic interactions within the BPH can be modulated by the pH and ionic strength.

The SDS-PAGE of the BPH (lanes 2 and 3 of the inset of figure 2.1) shows a broad and intense band with an apparent mass ranging between 55 and 60 kDa, as well as a smear that indicates a polydispersed size of the polypeptides which is typical for a hydrolyzate. Other poorly resolved bands in the sample lanes of the gel could hardly be detected around 150, 100, 70, 33 and 24 kDa. The apparent mass of the most intense band is similar to those of the pepsin-resistant α -like chain fragments of Col-P (50 kDa), Col-D (60 kDa)¹³ and Col-NG (60-64 kDa).²² It also corresponds to the mass of the proximal thread matrix protein (PTMP1), a 50 kDa water-soluble protein which has an affinity for the byssal collagen.²³ However, since this protein is water-soluble, we presume that it was removed from our BPH during the purification procedure. Sagert and Waite also characterized the thread matrix proteins (TMP), a family of collagen-binding proteins which would act as a lubricant between the preCols assemblies.²⁴ The TMPs have an apparent mass of 55 kDa and are prone to deamidation when the pH is above 8 (seawater pH). Deamidation was hypothetically linked to a pH-triggered role in the byssal thread.²⁴ In our work, the extraction of the proteins in alkaline conditions could have enhanced this deamidation process and aided in the decomposition of the byssus into polypeptide fragments that contribute to the smear on the electrophoresis gel.

The hydrolyzing process used in this study is not selective toward the site of cleavage (as compared to enzymes), so that specific protein bands were not expected. Since the interesting properties of the byssal threads arise from their heterogeneous protein content and assembly, the main goal of this study was to extract most of its constituents in order to prepare a new set of biomimetic materials for soft tissue engineering and drug delivery applications. We thus used the hydrolyzate without further purification.

2.4.2 Film-forming ability of the BPH and structural characterization by FTIR

The BPH is soluble only at pH 10.5 and higher. The BPH solution goes through a hydrogel state during the slow evaporation process that leads to the formation of a water insoluble film (figure 2.2). The formation of this hydrogel provides information about this process and will be described in more details in a following section.

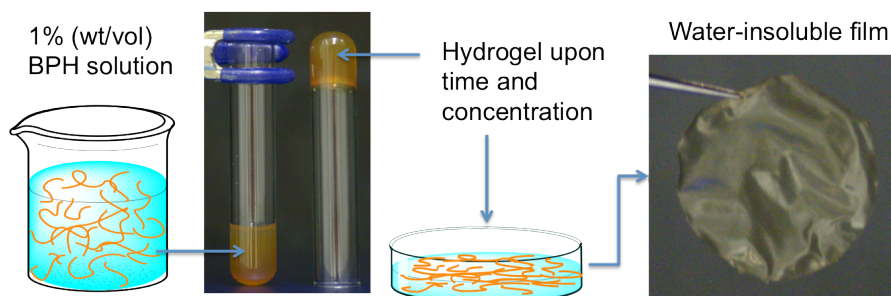


Figure 2.2. Processing of the BPH films. The BPH solution goes through a hydrogel phase during the film formation, and the resulting material is water-insoluble.

The morphology of the films was examined using SEM and AFM. Figure 2.3 reveals the presence of fibril-like structures at the surface of the films, suggesting the self-assembly of polypeptides during the film formation.

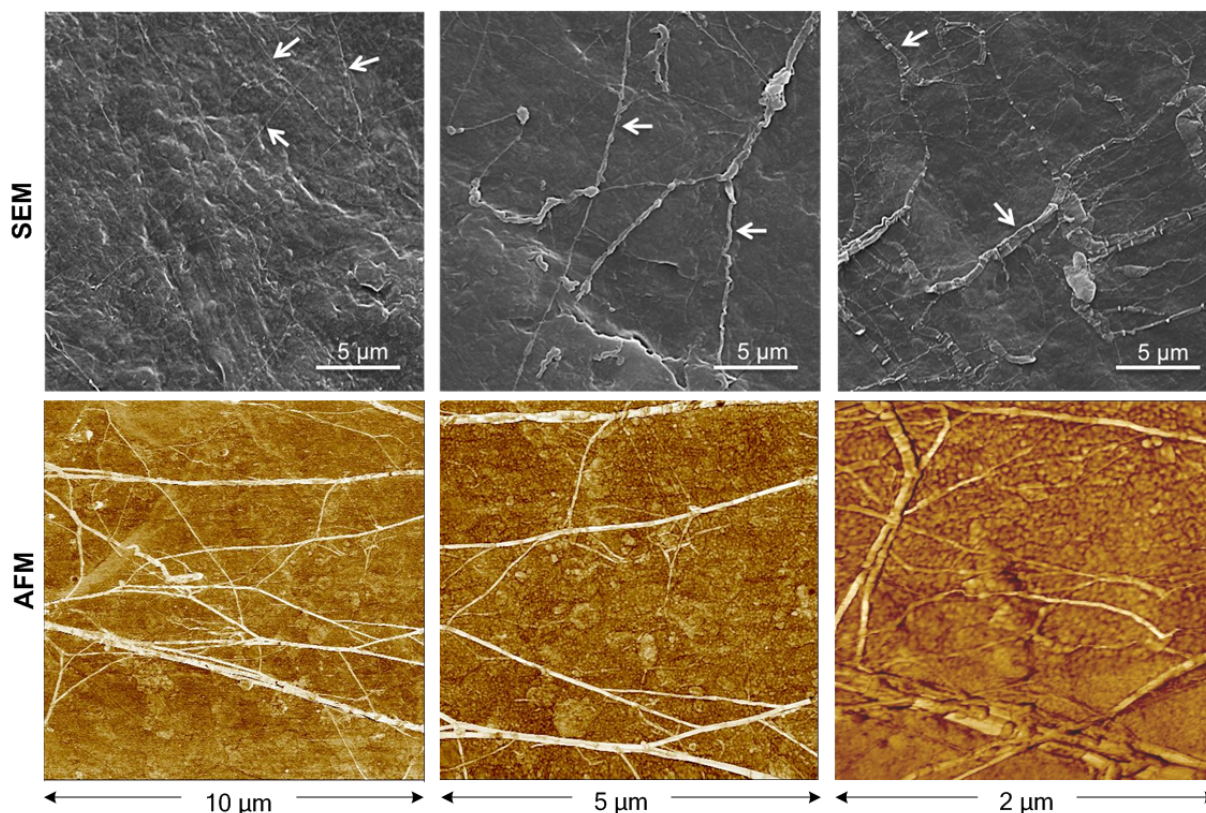


Figure 2.3. SEM and AFM images of the surface of the films at increasing magnification. The arrows point at fibril-like structure.

Interestingly, these structures seem to aggregate or organize into higher order fibrils similar those in the core of the native byssus. However, the latter were reported to be composed of an assembly of 6+1 banana-shaped bundles of preCols disposed in a head-to-head tail-to-tail arrangement.¹⁵ Since we are using a hydrolyzate of byssal proteins, perfectly organized preCols-based fibers are not likely to form in our materials. The byssus is known to contain both collagen and β -sheets-rich structural elements.^{12,16} Collagen- and amyloid-like fibrillogenesis are thus two possible ways by which fibrils could be generated. Collagen fibrils could be made by a super-assembly of triple helix subunits laterally stacked,¹ while amyloid-like fibrils could be made by the assembly of filament-forming oligomers that further aggregate into fibrils with a final cross- β helical structure.^{25,26} Since the main band detected by SDS-PAGE has an apparent mass similar to the α -like chain of the preCol's collagen domains, the most plausible origin for these fibers is the self-assembly of collagen-like polypeptides.

Similarly to the formation of gelatin from denatured collagen, the α -like chains could reassemble into supercoiled triple-helical structure and form an entangled polypeptide network. Even if the fibrils can only be detected at the surface, we expect a network to be embedded inside the film matrix. Because the relative proportion of matrix is high in comparison to the fibrils, only a small portion of the BPH is thus prone to collagen-like fibril formation. Infrared spectra were recorded to elucidate the molecular origin of the films' water-insolubility. Only the major components will be discussed in this section, the complete assignment being reported in table 2.1 and discussed in the context of the hydrogel formation. Figure 2.4 shows the infrared spectra and second derivative traces of the BPH and the film in the Amide I region, between 1600 and 1700 cm^{-1} , which informs on the protein backbone secondary structure.

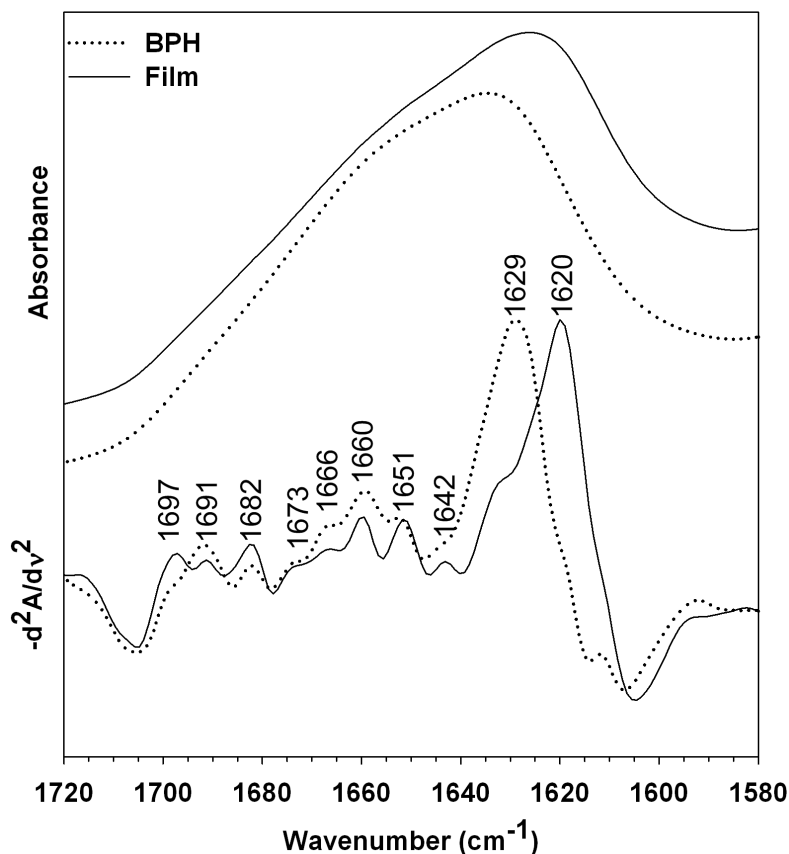


Figure 2.4. FTIR spectra (top) and the respective second derivative traces (bottom) of the BPH and of a BPH-made film in the amide I region.

Table 2.1. Assignment of the band components in the Amide I region²⁷⁻³³

Amide I components (cm ⁻¹)	Assignment
1691/1697	Anti-parallel β -sheets - Aggregated strands - Helices of aggregated denatured collagen
1681-1684/1673/1666	β -turns
1660	Native collagen triple helix (interchain H bond)
1655	α -helix
1648-1652	Unordered collagen/gelatin (solvent-Gly H bond) with contribution from α -helix and random coil
1642	Random coil/unordered structures, Unfolded collagen
1636-1639	Native parallel and anti-parallel β -sheets
1629	Anti-parallel β -sheets (intra-molecular) – Helices of aggregated denatured collagen
1624/1620	Aggregated strands - Intermolecular anti-parallel β -sheets

The main band component for the BPH is located at 1629 cm⁻¹ along with several additional weaker contributions, with the most intense one at 1660 cm⁻¹. Once in the form of an insoluble film, the 1629 cm⁻¹ band significantly shifts to 1620 cm⁻¹, although a shoulder at 1629 cm⁻¹ is still present. Bands between 1640 and 1620 cm⁻¹ are ascribed to β -pleated sheets and aggregated strands.²⁷⁻²⁹ The exact position of the components in this region depends on the strength of the hydrogen bonds involved in the secondary structure. Typically, water molecules surrounding these structures create dipole-dipole interactions with the C=O of the amide which delocalize the electrons in the bond.

Thus, dehydration of the peptide backbone leads to a more strongly hydrogen-bonded structure and to a shift of the amide I components toward lower wavenumbers. The band around 1620 cm⁻¹, combined with the presence of a high frequency component between 1700-1680 cm⁻¹ (1691 and 1697 cm⁻¹ for the BPH and film, respectively), is thus indicative of the formation of aggregated and/or intermolecular extended anti-parallel β -sheets structures. Such supramolecular arrangement has been reported for collagen (gelatin) and collagen-like peptides following dehydration and aggregation of the triple helix,³¹⁻³⁴ for silk fibers and other materials^{4,35} made of closely packed stacks of anti-parallel β -sheets, as well as for amyloid fibrils^{25,36,37} made of cross- β helical aggregated structures.

The band at 1660 cm^{-1} indicates the presence of collagen in its native triple helix conformation.^{30,31} Collagen is composed of three supercoiled left-handed polyproline II (PPII) helices that form a right-handed triple helix. The general repetitive motif of amino acids found in a PPII helix is $(\text{Gly-X-Y})_n$, where X is usually a proline and Y a hydroxyproline. The native triple helical structure is stabilized by inter-chain hydrogen bonds involving water molecules and the carbonyls from the peptides backbone.^{30,31} The collagen-related component at 1660 cm^{-1} is present in both spectra of figure 2.4 but is more intense for the BPH, suggesting the loss of native triple-helical structure upon film formation. The results obtained using FTIR are in excellent agreement with the presence of fibrils in the films' matrix observed in figure 2.3. Since we detected both intermolecular aggregated β -strands and collagen-related structures, we believe the fibrils are made of byssal collagen, while the matrix is made of a network of aggregated collagen triple helices and other random polypeptides in an extended anti-parallel β -sheets conformation. Our results therefore strongly suggest that collagen fragments and/or polypeptides from the BPH undergo a denaturation/aggregation process during the formation of the film. This process would induce an interconnected network of intermolecular hydrogen-bonded aggregates, which explain the water-insolubility of the proteins once in the film state. The collagen-like features detected are extremely interesting in the context of tissue engineering as they can greatly enhance the biocompatibility of the films by mimicking the extracellular matrix.^{38,39} Moreover, as reported for other protein materials such as silkworm and spider silks^{40,41}, the presence of β -strands could confer stiffness, strength and toughness to the films by creating physical cross-linking points between other structural domains such as random coil or triple helices. The mechanical properties are presented in the following section.

2.4.3 pH-responsive swelling and mechanical properties

The amino acid analysis in figure 2.1 revealed that the BPH holds *ca.* 30 % of charged amino acids, i.e. aspartic acid, glutamic acid, lysine, arginine and histidine. Amphoteric and polyelectrolyte polymers and polypeptides are known to form pH-responsive materials.^{42,43} We therefore treated our films with buffers at different pH, and studied the resulting mechanical properties and swelling behavior. The buffers used to treat the materials (table 2.2)

had a high ionic strength in order to quench any possible effect of this parameter on the electrostatic interactions of the charged moieties in the films. We were thus able to isolate the effect of the pH on the films' performance. Representative stress-strain curves of the materials are shown in figure 2.S1 of the supporting information.

Table 2.2. Tensile mechanical properties of hydrated BPH films treated in buffers at various pH. The bottom lines demonstrate the reversibility of the pH-responsive tensile mechanical properties. Results are expressed as average \pm standard deviation for $N \geq 5$

pH	Buffer	Modulus (MPa)	UTS [†] (MPa)	Toughness (MJ/m ³)	SB [‡] (mm/mm)
1.0	KCl 500 mM	2.5 \pm 0.5	1.1 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1
2.5	Glycine 200 mM	5.0 \pm 0.9	1.9 \pm 0.3	0.8 \pm 0.3	0.7 \pm 0.1
4.5	Citrate 100 mM	10 \pm 2	2.5 \pm 0.3	1.1 \pm 0.2	0.69 \pm 0.09
7.0	Phosphate 100 mM	4.3 \pm 0.5	1.5 \pm 0.3	0.6 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2
9.0	Glycine 200 mM	2.5 \pm 0.4	1.1 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2
10.5	(Untreated)	2.0 \pm 0.4	0.80 \pm 0.09	0.21 \pm 0.05	0.50 \pm 0.06
4.5 \rightarrow 9.0	Citrate 100 mM to Glycine 200 mM	2.9 \pm 0.6	1.3 \pm 0.1	0.48 \pm 0.03	0.66 \pm 0.04
4.5 \rightarrow 1.0	Citrate 100 mM to KCl 500 mM	3.0 \pm 0.2	1.4 \pm 0.3	0.7 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1
Hydrated <i>M.edulis</i> byssus (distal)		150 \pm 30	60 \pm 10	33 \pm 9	0.9 \pm 0.1

[†] UTS: Ultimate tensile strength [‡] SB: Strain at break

Figure 2.5a depicts the swelling ratio and water uptake of the films as a function of the pH. Both parameters are lower at the pI of 4.5 and become higher toward acidic or alkaline pH. In contrast, as seen in figure 2.5b and table 2.2, the modulus, ultimate tensile strength (UTS) and toughness of the films all reach their highest values at the pI. At this pH, Asp and Glu side-chains are negatively charged while the amino groups (chain ends and Lys, His, Arg side-chains) are positively charged. This leads to an electrostatic charge stabilization that creates effective cross-linking points.

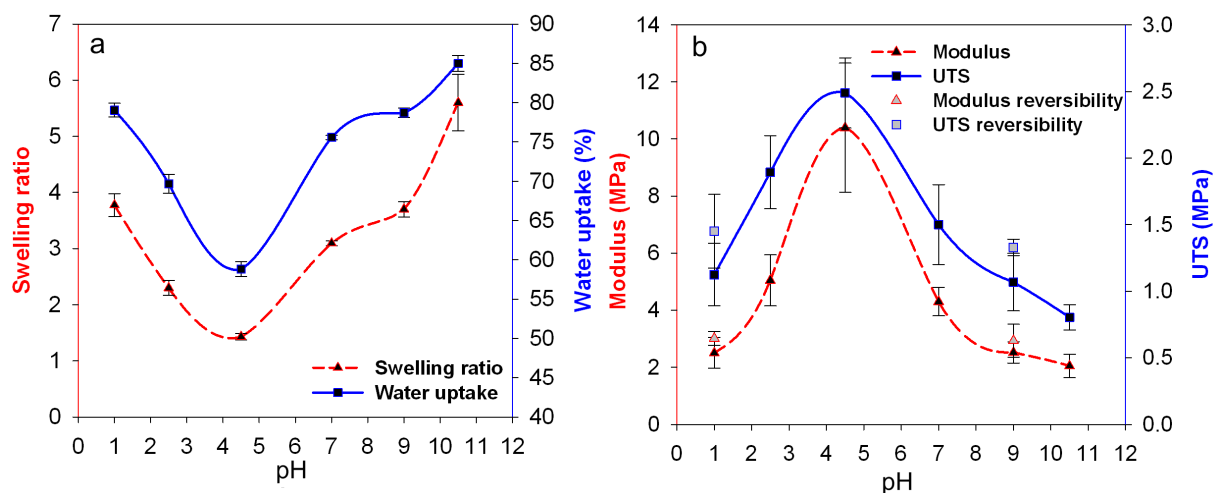


Figure 2.5. Swelling ratio and water uptake (a) and modulus and ultimate tensile strength (UTS) (b) of the BPH films after treatments at various pH. Open symbols correspond to reversibility tests. Smoothed lines are only to guide the eye.

Hence, the polypeptide network in the film is compact and rigid at its pI, leading to a low swelling ratio and water uptake as well as to a high modulus, UTS and toughness. At alkaline pH, deprotonation of amino and carboxylic acid groups occurs, leading to negative charges repulsion from carboxylates. On the contrary, at acidic pH, the protonation of free amino groups in the polypeptides leads to internal cationic repulsion forces that prevail over any possible interactions from aspartic and glutamic acid. Therefore, when the pH is moved away from the pI, there are more repulsive free electrostatic charges for which water molecules have a high affinity. The swelling ratio and water uptake are thus higher as the network is unrestrained by effective cross-links. Treating the films at low or high pH consequently induces a loose swollen network that decreases the modulus, UTS and toughness. As can be seen from table 2.2, the materials offer satisfactory mechanical properties as scaffolds for soft tissue engineering but they do not reach the values of the native byssus fibers. This was expected as well-oriented biological fibers were denatured to produce isotropic films from cleaved polypeptides. Nevertheless, the range of elastic moduli of our materials matches very well that of numerous biological tissues including nerves, arterial walls, heart, cornea and skin as reported elsewhere.^{44,45} Although the materials are produced

from a protein hydrolyzate, the high reproducibility between the mechanical property measurements suggests that the content of the BPH is stable from batch to batch.

We have verified the reversibility of the pH-tunable mechanical properties. This experiment was conducted by first treating the films at a pH of 4.5 corresponding to the pI, and then either at pH 9 or 1. As seen from the open symbols in figure 2.5b, the modulus and UTS were only slightly higher than for films processed directly in acidic (pH 1) or alkaline (pH 9) buffers, but still in the range of the standard deviation. The pH-response of the BPH films can thus be considered reversible. The strain at break (SB) values of the films treated at different pH is also reported in table 2.2. These values are almost constant, ranging between strains of 0.6 to 0.8 (60-80 % deformation). Disentanglement of the polypeptides chains and disruption of the electrostatic interactions both occur during extension and contribute to the maximum strain. Since the BPH has a high polydispersity index, according to the SDS-PAGE results, the presence of short chains with low entanglement could govern the maximum extensibility of the materials. The pH-sensitive materials that we have developed allow modulating the elastic modulus and strength by a factor of 3-4 without any detrimental effect on the strain at fracture. As a consequence, their toughness can also be optimized within a similar range and with the same reversibility by simply adjusting the pH of the buffer solution.

FTIR spectroscopy was used to determine whether the pH treatments affect the molecular structure or solely the electrostatic interactions of the polypeptides within the matrix. As can be seen from figure 2.6, the spectra are extremely similar at all pH, indicating that pH only affects the charge distribution in the matrix and not the protein secondary structure. The pH variation away from the pI only contributes to the inhomogeneous broadening of the spectral components without affecting the structural ratios. As expected, a shoulder around 1735 cm^{-1} (inset of figure 2.6) increases at lower pH and confirms the protonation of carboxylic acids (i.e. Asp, Glu and chain ends). These results are consistent with the reversibility of the pH effect on the mechanical properties and the water swelling behavior of the BPH films.

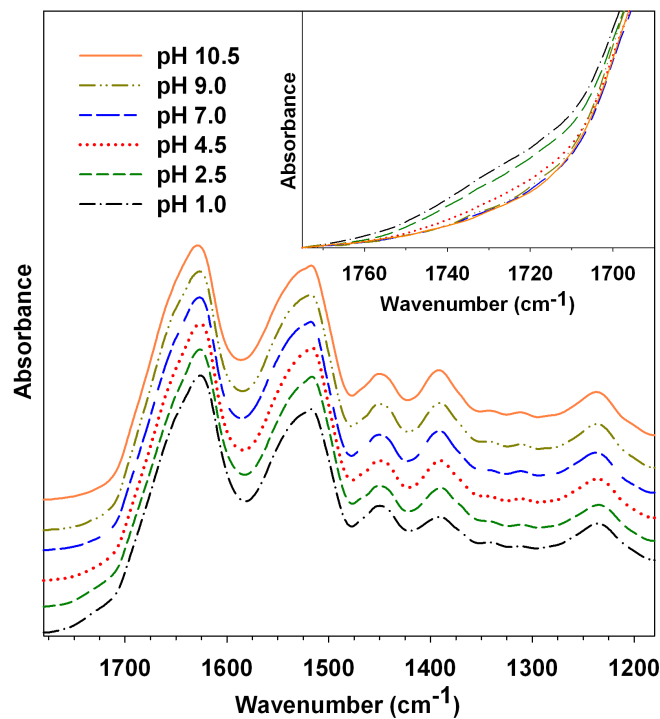


Figure 2.6. FTIR spectra of the BPH films treated at various pH. The inset highlights the protonation of carboxylic acids (Asp, Glu and chain ends) at acidic pH, resulting in a shoulder at 1735 cm^{-1} .

2.4.4 FTIR study of the BPH self-assembly and hydrogelation during film formation

We have shown above that both the freeze-dried BPH and the dried films contain intermolecular β -sheets and collagen related structural elements, but in different proportions. These differences revealed the conversion of native collagen into gelatin as well as aggregated triple-helix structures, but also the emergence of more compact hydrogen bonded β -sheets following the dehydration during films formation. Our experiments also showed that the films produced from the BPH solutions become insoluble only when the water evaporation is sufficiently slow, suggesting that their formation must involve a time-dependent self-assembly process driven by the concentration of polypeptides. To gain insight into this process, including the hydrogel stage, solutions with different BPH concentrations were prepared under the film forming conditions (pH 10.5), rapidly frozen in liquid nitrogen, and then freeze-dried.

Aliquots from these solutions were also placed in stoppered tubes to prevent water evaporation and then incubated at room temperature for one week to simulate the self-assembly process over the time scale of film formation. These aged solutions were then freeze-dried like their original counterparts. This procedure was used to reduce water contributions to the amide I band to enable a more accurate interpretation of the spectra. Infrared spectra of the different products were thus acquired in the absence of water (figure 2.S2) and their second derivative traces (figure 2.7) were compared to follow the structural evolution during the film formation process.

Figure 2.7 shows that the spectra of the fresh 10 and 20 mg/mL BPH (traces a and b) are quite similar. Interestingly, the intact collagen triple helix band located at 1660 cm^{-1} , which was clearly present in the BPH spectra of figure 2.4, is not detected in these spectra.

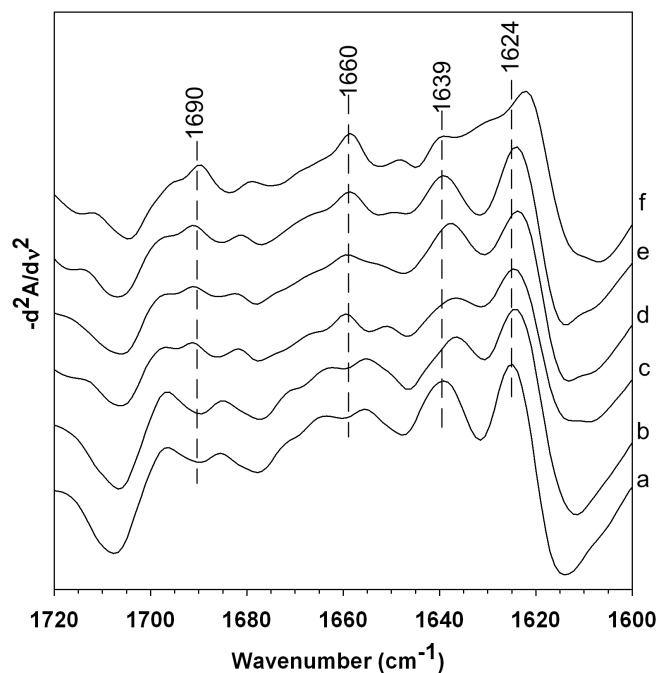


Figure 2.7. Second derivative FTIR spectra of freeze-dried BPH solutions with different concentrations (a, d: 10 mg/mL, b, e: 20 mg/mL, and c, f: 30 mg/mL). Solutions a-c were quickly frozen, while solutions d-f were aged at room temperature for one week before being freeze-dried.

Instead, two bands appear in this region around 1663 and 1655 cm^{-1} , still in the range of hydrogen-bonded helical structures. They may be attributed to either the formation of α -helices and/or uncoiled triple helices (free PPII helices) during the solubilization of the byssus threads. Indeed, intact α -helices are normally found between 1650 and 1655 cm^{-1} .^{27,28} A component around 1650 cm^{-1} was also detected in tuna and squid gelatin and in gelatin hydrolyzate, and was associated to an unordered collagen triple helix.⁴⁶ Bands around 1636-1639 and 1624 cm^{-1} are the most intense in the spectrum of these freeze-dried BPH samples. As discussed above, this region is ascribed to aggregated strands and parallel or anti-parallel β -sheets related structures. Consequently, the FTIR analysis suggests that the collagen of the BPH is first denatured when solubilized at pH 10.5 and partly forms aggregated strands. Additional non-collagen polypeptides found in the BPH can also form β -sheets and/or aggregates, thus contributing to an entangled self-assembled network rendering the films water insoluble.

When increasing the BPH concentration to 30 mg/mL, the solution becomes highly viscous and quickly forms a hydrogel. The second derivative trace (figure 2.7c) clearly displays bands at 1660 and 1650 cm^{-1} , revealing the formation of both intact and disordered collagen/gelatin triple helices.^{30,31,47} These two bands are observed for all BPH concentrations after one week, as seen in traces d-f of figure 2.7. A higher BPH concentration in solution clearly leads to a larger intensity of the 1660 cm^{-1} component after a week. This trend confirms the formation of the triple helical structures with time, thus highlighting the kinetic aspect of the self-assembly process. The 30 mg/mL BPH sample incubated for a week (figure 2.7f) also displays a band at 1620 cm^{-1} along with the transition dipole coupling component at 1690 cm^{-1} , typical of intermolecular anti-parallel β -sheets. This trace is similar to that of the dried films (figure 2.4), but the component at 1620 cm^{-1} is less intense, suggesting that the slower dehydration process during the films formation is critical to obtain stable compact extended β -sheet structures. This explains why films produced under fast evaporation conditions remain partly soluble, brittle and mechanically weak. It also highlights the necessity of the fibrillar features to create an entangled network through which the β -strands-rich matrix can slowly develop and thus lead to the final heterogeneous functional material.

Additional minor bands were also detected in these spectra, which is not surprising considering that the hydrolyzate was produced under alkaline conditions. The band around 1642 cm^{-1} in the film spectrum of figure 2.4 can be ascribed either to random coil/unordered structure²⁷ or to unfolded collagen, as reported for collagen model peptides.⁴⁷ The bands around 1665 , 1673 and 1682 cm^{-1} in all spectra of figures 2.4 and 2.7 are in the range assigned to β -turns.⁴⁸ This conformation is commonly encountered in all types of proteins and was already reported to be present in the native byssus fiber structure.¹²

2.5 Conclusion

We have shown the possibility to produce byssus protein hydrolyzate with good film-forming ability, and the pH-tunable properties of these biomimetic films. The self-assembly of the polypeptides into anti-parallel β -sheets, aggregated β -strands and collagen triple helix structures offer a stabilizing environment leading to self-standing water-insoluble films with interesting mechanical properties. Moreover, fibrillar structures are present on the films' surface, confirming a self-assembly process analogous to the production of collagen-like fibers. These heterogeneous proteins features are an excellent reminder of the natural complexity and elegant self-assembly of the various proteins forming the byssal threads. They also suggest that our films have good potential for collagen-related biocompatibility required for tissue engineering scaffolds applications. The high content of charged amino acids gives rise to pH-responsive mechanical properties and swelling behavior of the films through the modification of electrostatic interactions. Optimal mechanical properties are obtained at the isoelectric point of 4.5, while increased swelling is possible at higher or lower pH. We believe that the BPH-made films offer a promising avenue for the development of new flexible and adjustable materials that could find applications in the field of soft tissue engineering as well as for drug delivery.

2.6 Acknowledgements

This work was supported by a strategic research grant of the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC). F.B. is grateful to the Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Strategic Training Initiative in Chemical Biology and to the Comité sectoriel de main d'œuvre de l'industrie du caoutchouc du Québec (CSMO Caoutchouc) for the award of scholarships. The authors thank R. Tremblay (UQAR) and B. Myrand (Merinov) for technical support.

2.7 References

1. R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod, *Materials*, 2010, **3**, 1863-1887.
2. C. H. Lee, A. Singla, Y. Lee, *Int. J. Pharm.*, 2001, **221**, 1-22.
3. G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D. L. Kaplan, *Biomaterials*, 2003, **24**, 401-416.
4. C. Vepari, D. L. Kaplan, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, **32**, 991-1007.
5. J. G. Rouse, M. E. Van Dyke, *Materials*, 2010, **3**, 999-1014.
6. J. Gosline, M. Lillie, E. Carrington, P. Guerette, C. Ortlepp, K. Savage, *Phil. Trans. R. Soc. London B*, 2002, **357**, 121-132.
7. J. H. Waite, E. Vaccaro, C. Sun, J. M. Lucas, *Phil. Trans. R. Soc. London B*, 2002, **357**, 143-153.
8. N. Holten-Andersen, M. J. Harrington, H. Birkedal, B. P. Lee, P. B. Messersmith, K. Y. Lee, J. H. Waite, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, **108**, 2651-2655.
9. M. J. Sever, J. T. Weisser, J. Monahan, S. Srinivasan, J. J. Wilker, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 448-450.
10. Q. Lin, D. Gourdon, C. Sun, N. Holten-Andersen, T. H. Anderson, J. H. Waite, J. N. Israelachvili, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007, **104**, 3782-3786.
11. J. Pikkarainen, J. Rantanen, M. Vastamaki, K. Lampliaho, A. Kari, E. Kulonen, *Eur. J. Biochem.*, 1968, **4**, 555-560.

12. A. A. Arnold, F. Brette, M.-O. Séguin-Heine, A. LeBlanc, L. Sleno, R. Tremblay, C. Pellerin, I. Marcotte, *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 132-141.
13. X. Qin, J. H. Waite, *J. Exp. Biol.*, 1995, **198**, 633-644.
14. J. H. Waite, X.-X. Qin, K. J. Coyne, *Matrix Biol.*, 1998, **17**, 93-106.
15. T. Hassenkam, T. Gutschmann, P. Hansma, J. Sagert, J. H. Waite, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 1351-1355.
16. A. Hagenau, H. A. Scheidt, L. Serpell, D. Huster, T. Scheibel, *Macromol. Biosci.*, 2009, **9**, 162-168.
17. H. Silverman, F. Roberto, *Mar Biotechnol*, 2007, **9**, 661-681.
18. C. H. Brown, *Q. J. Microsc. Sci.*, 1952, **s3-93**, 487-502.
19. E. Vaccaro, J. H. Waite, *Biomacromolecules*, 2001, **2**, 906-911.
20. M. J. Harrington, A. Masic, N. Holten-Andersen, J. H. Waite, P. Fratzl, *Science*, 2010, **328**, 216-220.
21. E. Gasteiger, G. A., C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel, A. Bairoch, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, 3784-3788.
22. X.-X. Qin, J. H. Waite, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, **95**, 10517-10522.
23. C. Sun, J. M. Lucas, J. H. Waite, *Biomacromolecules*, 2002, **3**, 1240-1248.
24. J. Sagert, J. H. Waite, *J. Exp. Biol.*, 2009, **212**, 2224-2236.
25. B. Shivu, S. Seshadri, J. Li, K. A. Oberg, V. N. Uversky, A. L. Fink, *Biochemistry*, 2013, **52**, 5176-5183.
26. R. Nelson, M. R. Sawaya, M. Balbirnie, A. O. Madsen, C. Riek, R. Grothe, D. Eisenberg, *Nature*, 2005, **435**, 773-778.
27. M. Jackson, H. H. Mantsch, *Crit. Rev. Biochem. Mol.*, 1995, **30**, 95-120.
28. D. M. Byler, H. Susi, *Biopolymers*, 1986, **25**, 469-487.
29. A. Barth, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, 2007, **1767**, 1073-1101.
30. Y. A. Lazarev, B. A. Grishkovsky, T. B. Khromova, *Biopolymers*, 1985, **24**, 1449-1478.

31. K. J. Payne, A. Veis, *Biopolymers*, 1988, **27**, 1749-1760.
32. D. A. Prystupa, A. M. Donald, *Polym. Gels Networks*, 1996, **4**, 87-110.
33. O. S. Rabotyagova, P. Cebe, D. L. Kaplan, *Mater. Sci. Eng., C*, 2008, **28**, 1420-1429.
34. J. H. Muyonga, C. G. B. Cole, K. G. Duodu, *Food Chem.*, 2004, **86**, 325-332.
35. F. Biette, F. Bouchard, C. Pellerin, J. Paquin, I. Marcotte, M. Mateescu, *Polym. Bull.*, 2011, **67**, 159-175.
36. Y. Zou, Y. Li, W. Hao, X. Hu, G. Ma, *J. Phys. Chem. B*, 2013, **117**, 4003-4013.
37. G. Zandomenighi, M. R. H. Krebs, M. G. McCammon, v. Fändrich, *Protein Sci.*, 2004, **13**, 3314-3321.
38. C. Q. Lin, M. J. Bissell, *FASEB J.*, 1993, **7**, 737-743.
39. K. H. Bae, L.-S. Wang, M. Kurisawa, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 5371-5388.
40. S. Keten, Z. Xu, B. Ihle, M. J. Buehler, *Nat. Mater.*, 2010, **9**, 359-367.
41. A. Nova, S. Keten, N. M. Pugno, A. Redaelli, M. J. Buehler, *Nano Lett.*, 2010, **10**, 2626-2634.
42. R. J. Mart, R. D. Osborne, M. M. Stevens, R. V. Ulijn, *Soft Matter*, 2006, **2**, 822-835.
43. D. Schmaljohann, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, **58**, 1655-1670.
44. E. Vatankhah, D. Semnani, M. P. Prabhakaran, M. Tadayon, S. Razavi, S. Ramakrishna, *Acta Biomater.*, 2014, **10**, 709-721.
45. H. Kim, D.-H. Kang, M. Kim, A. Jiao, D.-H. Kim, K.-Y. Suh, *Ann. Biomed. Eng.*, 2012, **40**, 1339-1355.
46. M. C. Gómez-Guillén, M. E. López-Caballero, A. Alemán, A. López de Lacey, B. Giménez, P. Montero, in *Sea by-Products as Real Material: New Ways of Application*, ed. E. Le Bihan, Transworld Research Network, Kerala, India, 2010, pp. 89-115.
47. M. A. Bryan, J. W. Brauner, G. Anderle, C. R. Flach, B. Brodsky, R. Mendelsohn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 7877-7884.
48. J. Bandekar, S. Krimm, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1979, **76**, 774-777.

2.8 Supporting information

Table 2.S1. Amino acid composition of the byssus thread and of the BPH extract (residues/1000). Results are expressed as average \pm standard deviation for N=3.

	Byssus	BPH extract
Asx	83 \pm 1	107 \pm 5
Glx	64.0 \pm 0.8	89 \pm 4
OH-Pro	37 \pm 3	21 \pm 5
Ser	63 \pm 1	61 \pm 2
Gly	230 \pm 10	149 \pm 17
His	27 \pm 3	18 \pm 2
Arg	58 \pm 3	61 \pm 2
Thr	37 \pm 2	42 \pm 1
Ala	98.5 \pm 0.6	82 \pm 6
Pro	66 \pm 2	69 \pm 6
L-DOPA	4 \pm 2	0.05 \pm 0.02
Tyr	26 \pm 2	32 \pm 3
Val	47 \pm 1	66 \pm 6
Met	10.0 \pm 0.5	15 \pm 1
Cys	3.5 \pm 0.7	1.6 \pm 0.5
Ile	29.9 \pm 0.1	48 \pm 5
Leu	47 \pm 2	59 \pm 5
Phe	25 \pm 1	32 \pm 4
Lys	44.7 \pm 0.1	46 \pm 4

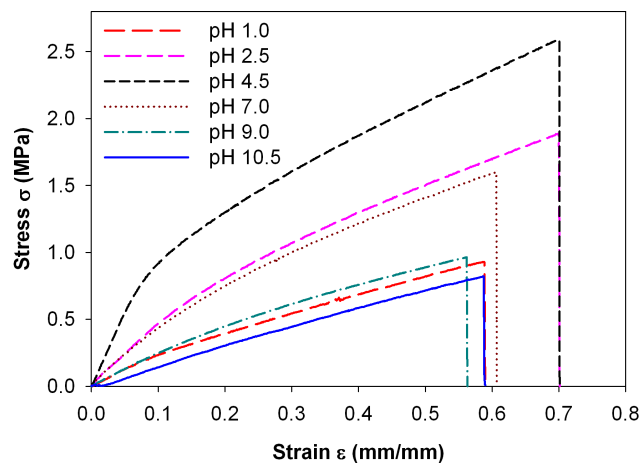


Figure 2.S1. Representative tensile mechanical testing curves of the BPH films treated at various pH.

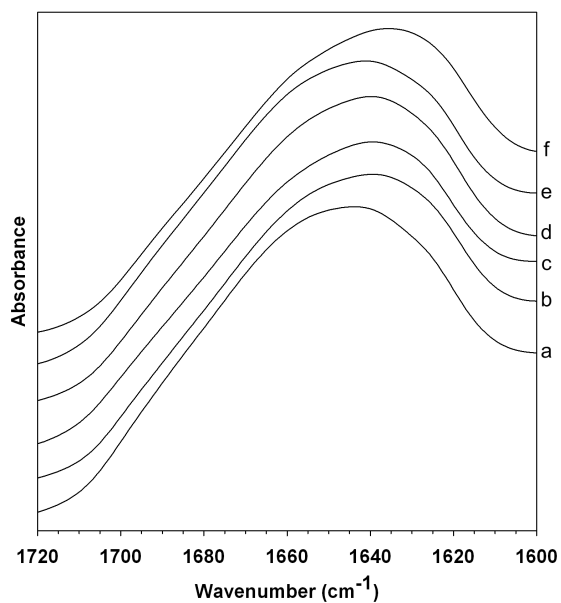


Figure 2.S2. FTIR spectra of freeze-dried BPH solutions with different concentrations (a, d: 10 mg/mL, b, e: 20 mg/mL, and c, e: 30 mg/mL). Solutions a-c were quickly frozen, while solutions d-f were aged at room temperature for one week before being freeze-dried.

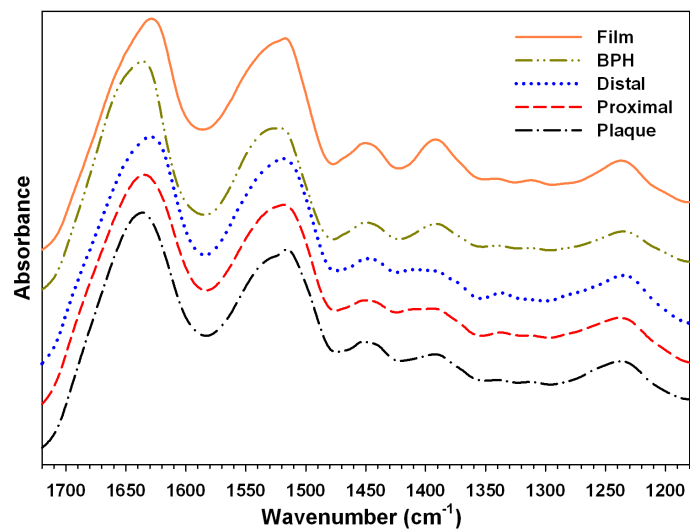
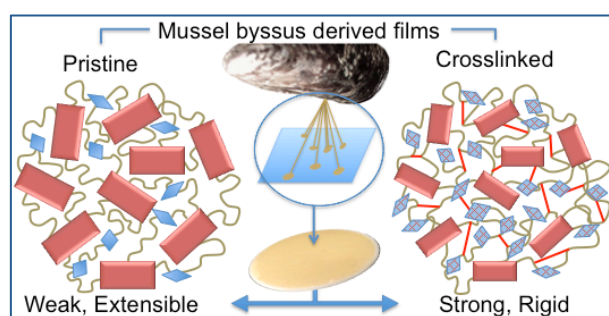


Figure 2.S3. FTIR spectra of the 3 macroscopic sections of a byssus single fiber (distal part, proximal part and plaque), the BPH, and a film as prepared.

Chapitre 3 : Covalently Crosslinked Mussel Byssus Protein-Based Materials with Tunable Mechanical Properties*

3.1 Abstract

Fibrous proteins, such as those found in silks, tendons and in the byssus of mussels, are interesting candidates for materials development because their self-assembly leads to structures with impressive mechanical properties. Nevertheless,



materials prepared from regenerated fibrous proteins often need further treatments to reach the mechanical performance required for targeted applications. Here, we studied the effect of covalent crosslinking, using a carbodiimide or glutaraldehyde, on the mechanical properties of byssus-based materials. The results show that a higher crosslinking degree leads to increases in modulus and strength by factors up to ~10 and 3, respectively, but to a loss of more than half of the extensibility. Infrared spectroscopy revealed that crosslinking induces an unexpected molecular transition from aggregated strands to hydrated collagen/PPII-related helical structures. The materials were nevertheless more resistant to collagenase degradation as a result of higher crosslinking density. This new set of materials prepared in aqueous environment could thus find a niche in tissue engineering where a match between the mechanical performance of the biomaterial and of the tissue at the implantation site is required.

* À soumettre en tant qu'article en 2016: Frédéric Byette; Isabelle Marcotte; Christian Pellerin.

3.2 Introduction

Fibrous protein-based materials are good candidates for soft tissue engineering since they offer potential biocompatibility, biodegradability, and low immunogenicity when they come in contact with a biological system. This is due to their biochemical nature similar or identical to that of macromolecules that the human biological environment can recognize and metabolize. Their potential for biomaterials development is reinforced by their self-assembly in aqueous solutions that leads to very interesting structure-function relationships. Indeed, their repetitive primary amino acid sequence often drives the self-assembly of stable secondary structures that result in the formation of fibrous materials with impressive mechanical properties.^{1,2} In particular, fibrous proteins such as silk, collagen and elastin have been successfully used for the production of biomaterials.²⁻⁶

Even though regenerated fibrous proteins usually lead to self-standing materials that can be formed into a desired shape (such as films or 3D porous scaffolds), their mechanical properties and their stability in a biological environment must often be tuned or improved in order to fulfill the application requirements. Chemical reagents like a carbodiimide or glutaraldehyde can be used to covalently crosslink the proteins through reactions with the carboxylic acid and amino groups of the side chains and termini. Such crosslinking methods have been successfully applied to adjust the mechanical properties and/or biological response of biomaterials made of collagen and elastin.⁷⁻¹²

The byssus is a complex fibrous protein-based set of anchoring threads whose role is to secure mussels from the cyclic motions of waves and tides in the intertidal zone. The entire byssus fiber is covered with a thin cuticle ending with a plaque, both made from the same family of mussel foot proteins (mfp's). The mfp's contain a large amount of dihydroxyphenylalanine (DOPA) that can form complexes with metals and lead to the strength and extensibility of the cuticle or to the strong adhesion of the plaque to water-immersed solid substrates.¹³⁻¹⁶ The core of each byssal thread is composed of three block copolymer-like proteins having a central collagenous domain flanked by either silk, elastin or glycine rich domains and histidine-rich termini on both sides.¹⁷ The graded distribution and particular head-to-head/tail-to-tail assembly of these block copolymers in the byssus lead to the

formation of oriented fibrils that provide strength and extensibility to the fibers.^{18,19} The proteins in the byssus are highly crosslinked by either covalent di-DOPA bridges, disulfide bridges, or organometallic coordination compounds, and are thus difficult to extract.²⁰

In our previous study, we showed the possibility of producing a byssus protein hydrolyzate (BPH) with good film-forming ability and pH-tunable mechanical properties.²¹ This behavior was attributed to the presence of charged amino acids, such as aspartic and glutamic acids, lysines, and arginines, which account for ~30 mol % of the total amino acid content. These moieties offer the advantage of being easily accessible for a wide range of chemical modifications including the above-mentioned covalent crosslinking reactions with a carbodiimide or glutaraldehyde.

The objective of this work was thus to enhance the mechanical strength and resistance to enzymatic degradation of the BPH films by using chemical crosslinking with carbodiimide or glutaraldehyde. We show that chemically crosslinked BPH films are up to 10 times stiffer and 3 times stronger than the pristine films but that they partially lose their extensibility. The BPH films become highly resistant to collagenase degradation after covalent crosslinking, retaining more than 95 % of their initial weight. Infrared spectroscopy shows that crosslinking leads to the formation of collagen/PPII related structure at the expense of intermolecular anti-parallel β -sheets. The capability of modulating the mechanical properties of the BPH-based materials is an asset for soft tissue engineering as it may enable matching the biomechanics of a wide range of biological tissues.

3.3 Material and Methods

3.3.1 Materials

Stocks of byssi were kindly provided by Moules de Culture des Îles Inc. (Magdalen Island, QC, Canada) and La Moule du Large (Magdalen Island, QC, Canada). Byssal threads were first sorted to remove most of the unwanted sea products (algae, shells and fish-related parts) then thoroughly washed with soap under tap water. The cleansed product was rinsed several times with distilled water and frozen at -20 °C. Except otherwise mentioned, all

chemicals of reagent grade were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA) and used without further purification.

3.3.2 Methods

3.3.2.1 Byssal proteins hydrolyzate (BPH) preparation

Extraction of proteins from the byssal threads was performed as previously reported.²¹ Briefly, 5 g of cleansed and crushed dry byssus was magnetically stirred in 150 mL of extraction buffer containing 0.1 M sodium ethylene diamine tetraacetate (EDTA) adjusted to pH 13.5. After 7 days at 4 °C, the resulting slurry was centrifuged (Eppendorf centrifuge 5804R, Mississauga, ON, Canada) at 5000 rpm during 60 min at 4 °C to separate the solution from non-solubilized particles and the supernatant was filtered to remove any remaining foreign materials. Proteins in the supernatant were precipitated by adjusting the pH to 4.5 using acetic acid and by adding sodium chloride to reach a 0.5 M final concentration. The proteins were left to precipitate for 1h before being pelleted by centrifugation at 5000 rpm for 20 min at 4 °C. The precipitate was dispersed in distilled water before being dialyzed (SpectraPor 1, MWCO 6-8 kDa) (Spectrum Lab, Rancho Dominguez, CA, USA) for 3 days against distilled water. The precipitate was finally pelleted by centrifugation at 5000 rpm for 20 min at 4 °C before being freeze-dried.

3.3.2.2 Films preparation

The foam-like lyophilized BPH was crushed and dispersed in water before adjusting the pH to 10.5 using sodium hydroxide (NaOH), reaching a final slurry concentration of 1 w/v %. The solution was pulse sonicated for 1 min using a Microson XL 2000 ultrasonic homogenizer (Qsonica, Newtown, CT, USA). The solution was finally degassed by centrifugation for 2 min at 5000 rpm and 1 mL of the solution was poured into each well of a homemade Teflon mold (49 circular wells of 20 mm diameter). The solutions were left to

evaporate under a fume hood until dry films were formed, usually for 96 h. The films were gently peeled off and washed with distilled water for 30 min before further treatments.

3.3.2.3 EDC-NHS (EN) crosslinking of proteins in films

BPH films were covalently crosslinked using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS). These films are labeled as EN throughout the study. The BPH films of about 10 mg dry weight were conditioned for 30 min in 5 mL of 50 mM 2-morpholinoethane sulphonic acid (MES) at pH 5.5. The films were subsequently crosslinked by immersion in 50 mM MES at pH 5.5 (4 mL/film) containing various concentration of EDC ranging from 0.1 to 10 mM and NHS, keeping the EDC:NHS molar ratio constant at 4:1. The reaction was left for 4 h then the films were washed once with 0.1 M Na₂HPO₄ (pH 9.1) for 1 h to stop the reaction and rinsed with distilled water four times during 30 min.

3.3.2.4 Glutaraldehyde crosslinking of proteins in films

BPH films were chemically crosslinked by immersion in 5 mL glutaraldehyde (GTA) 2.5 vol % aqueous solution for 5 min at room temperature. Films were then rinsed with distilled water for 5 min to remove unreacted GTA, immersed in a 50 mM TRIS solution (pH 8.1) for 5 h to block any unreacted aldehyde groups, and finally rinsed with distilled water during four periods of 30 min.

3.3.2.5 Free amino group content

The free primary amino group content in films was determined spectrophotometrically after reaction with 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) following the method of Bubnis *et al.* with slight modifications.²² Film samples weighing between 2 and 4 mg were incubated for 30 min in 0.5 mL of NaHCO₃ (4 wt %) solution. To this mixture, 0.5 mL of a freshly prepared TNBS solution (0.5 wt %) in NaHCO₃ (4 wt %) was added. After reaction for

2 h at 40 °C, 1.5 mL of 6 M HCl was added and the temperature was raised to 90 °C under magnetic stirring. Solubilization of films was achieved within 120 min. Then 2.5 mL of MilliQ water was added to the hydrolyzate and 10 mL of diethyl ether was used to remove excess TNBS and trinitrophenyl N-terminal amino acid. After three extractions, the aqueous layer was heated in a hot water bath (40 °C) for 15 min to evaporate residual ether and the absorbance was measured at 340 nm using a Biochrom Novaspec Plus (Cambridge, UK) spectrophotometer. A blank was prepared by the same procedure except that HCl was added prior to the addition of TNBS. The absorbance was correlated to the concentration of free amino groups, using a calibration curve generated with glycine, as:

$$[\text{NH}_2] = \frac{AV}{\varepsilon l m_{\text{film}}} \quad (3.1)$$

where $[\text{NH}_2]$ is the free amino group content (mmol mg^{-1}), A is the absorbance, V is the volume of the solution (mL), ε is the molar absorption coefficient of trinitrophenyl-glycine determined at 340 nm ($13,000 \text{ mL mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l is the path length (cm) and m_{film} is the dry weight of the sample (mg).

The percentage of blocked amino group in crosslinked films was calculated, assuming 100 % free amino groups in pristine films, according to the following equation:

$$\% \text{ blocked } \text{NH}_2 = \frac{[\text{NH}_2]_{\text{pristine}} - [\text{NH}_2]_{\text{crosslinked}}}{[\text{NH}_2]_{\text{pristine}}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.3.2.6 Mechanical testing

Single axial stress-strain measurements were conducted at 37 °C on sections (10 mm × 5 mm) of the various films using an Instron 5465 mechanical testing frame (Norwood, MA, USA) equipped with a 50 N load cell and a Biopuls bath filled with phosphate buffer saline (PBS) at pH 7.4. The films were mounted between the jaws and pre-conditioned in the PBS bath for ~2 min before applying a constant extension rate of 5 mm min⁻¹. The modulus was

calculated using the initial linear portion of the curve, typically between 2 and 5 % strain, and toughness determined from the area under the entire stress-strain curve.

3.3.2.7 Resistance to collagenase degradation

The resistance of the BPH films to enzymatic degradation was assayed by exposing materials to collagenase Type I from *Clostridium histolyticum* (125 U/mg). Films were first dried in an oven at 60 °C for 1 h and precisely weighed. Materials were then soaked for 1 h in TESCA buffer containing 50 mM TES, 2 mM CaCl₂ and 10 mM NaN₃ adjusted to pH 7.4. The films of ~3 mg were then transferred into 1 mL of collagenase solutions (1 mg/mL) prepared in the same buffer and incubated at 37 °C while agitating at 150 rpm in a Thermo Scientific MaxQ 4450 orbital shaker (Marietta, OH, USA). After 24 h, the samples were removed and soaked in 25 mM EDTA for 30 min at 60 °C to inactivate enzymes and remove calcium ions. Films were finally rinsed 3 times for 30 min with milliQ water and dried at 60 °C for 1 h before determining the remaining weight. A control was also performed by the same procedure in the absence of collagenase. Pictures of the films were acquired using a Nikon Eclipse Ti inverted optical microscope (Mississauga, ON, Canada) equipped with a Nikon Digital Sight DS-Qi1Mc camera.

3.3.2.8 Attenuated total reflection (ATR) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy

Infrared spectra of the films before and after crosslinking as well as before and after enzymatic digestion were obtained using a Bruker Optics Tensor 27 spectrometer (Billerica, MA, USA) with a liquid nitrogen-cooled mercury-cadmium-telluride detector and a Golden Gate diamond ATR accessory (Specac, Swedesboro, NJ, USA). Spectra of the films were acquired by averaging 256 scans at a 4 cm⁻¹ resolution. Each film was analyzed at three or four different locations and the resulting spectra were averaged to account for any possible inhomogeneity. Spectra were processed using LabSpec 6 spectroscopy suite v.6.2.69 (Horiba Scientific, Edison, NJ, USA) and GRAMS/AI v.7.00 (Thermo Fisher Scientific, Waltham,

MA, USA). A linear baseline was applied in the amide A, I or II region of the spectra, i.e. between 3700-2830 cm^{-1} , 1720-1580 cm^{-1} or 1580-1480 cm^{-1} respectively, before normalizing using the area under the curves. Second derivative curves of the spectra were obtained using a Savitzky-Golay algorithm on 5-9 points before multiplying by -1 to invert the resulting traces. The traces were finally vector-normalized for easier comparison.

3.4 Results and discussion

3.4.1 Free amino groups and degree of crosslinking

The BPH films are water insoluble as a result of the self-assembly of the polypeptides in stable molecular structures, i.e. intermolecular anti-parallel β -sheets and collagen triple helices.²¹ The chemical crosslinking performed on the self-standing pristine films was thus feasible in aqueous environment, which is an asset for biomaterial development. The number of free amino groups in the BPH films and the percentage of reacted amino groups were first determined in order to evaluate the efficacy and extent of the chemical crosslinking. Figure 1 shows the results obtained for the EDC-NHS (EN) and glutaraldehyde (GTA) crosslinked films compared to the pristine films. The results obtained by amino acid analysis (AAA) of the BPH used to produce the films are also provided as a reference and to validate the accuracy of the TNBS reaction.²¹

Figure 3.1a shows that the number of free amino groups in the pristine films detected using the TNBS method, around 0.3 mmol/g, agrees well with the value obtained by amino acid analysis. The number of free amino groups in the EN crosslinked films gradually decreases from 0.27 to 0.19 mmol/g as the concentration of EN increases from 0.1 to 5 mM, and is followed by a quasi-plateau for higher EN concentrations. The fraction of free amino groups that were crosslinked is reported in figure 3.1b as the percentage of blocked amino groups. These values increase from ~8 to ~35 % when the EN concentration used for the crosslinking reaction was raised from 0.1 to 5 mM and reach a plateau for higher concentrations. The GTA crosslinking reaction led to ~38 % blocked amino groups for the 5 min reaction at the 2.5 % concentration used. However, contrary to the carbodiimide reaction,

it was possible to reach a much higher crosslinking density (up to ~80 % of blocked amino groups) when using higher GTA concentration and longer reaction time, i.e. 10 % for 24 h.

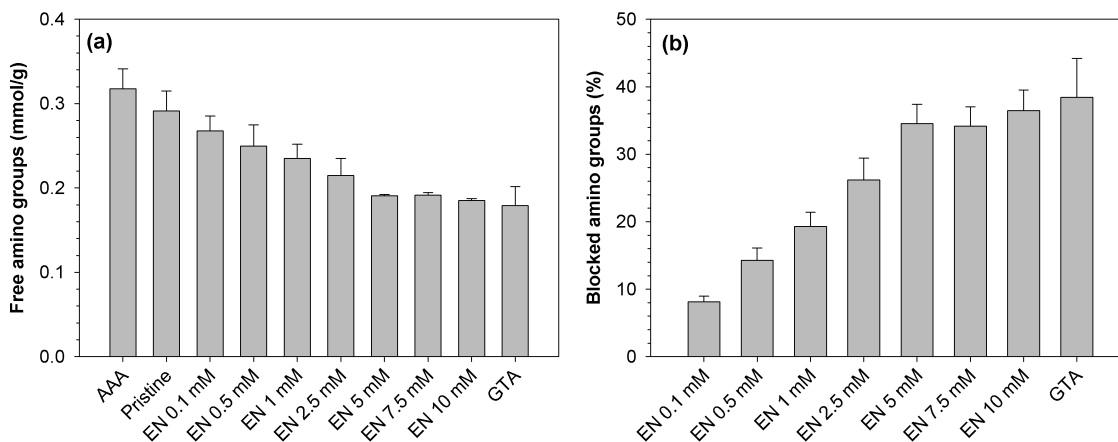


Figure 3.1. (a) Free amino group content in the pristine, EDC-NHS (EN) crosslinked and glutaraldehyde (GTA) crosslinked films as determined with the TNBS method and (b) percentage of blocked amino groups relative to the pristine films. Amino acid analysis (AAA) on crude BPH is shown for comparison with the TNBS method. Results are the average value \pm standard deviation for $N = 3$.

The difference in the crosslinking density reached with EN and GTA can be explained by their reaction mechanism. The EN reaction can take place in proteins only between adjacent carboxylic acids and free amino groups to create a new amide bond. It is called a “zero-length” crosslinker because no additional segments are introduced during this reaction. The EN coupling is thus only possible within a distance of 1 nm, therefore sufficient mobility of the protein network is necessary for the reaction to occur.^{23,24} On the other hand, GTA reacts with free amino groups, mainly from lysines side chains and N-termini of polypeptides chains, and incorporates a spacer of at least 5 carbons between crosslinked moieties. GTA is therefore a “long-range” crosslinking agent. Moreover, it can self-polymerize as well as irreversibly react with a single amino group, leaving a free aldehyde that must be quenched to stop its reactivity, for example with a small molecule having a reactive free amino group. Therefore, the lower percentage of amino groups blocked by the EN reaction may be

attributed to the tight packing of the physically crosslinked secondary structure elements composing the BPH films, such as intra and intermolecular β -sheets.²¹ The limited molecular mobility of the amino and carboxylate groups buried within such protein domains would hinder the reaction and lead to the plateau seen in figure 3.1.

3.4.2 Tensile mechanical properties

The effect of covalent crosslinking on the mechanical performances of the various BPH films was assessed in a simulated biological environment (PBS-filled bath at 37 °C and pH 7.4) under tension mode. As reported in figure 3.2 and table 3.1, both the modulus and the ultimate tensile strength (UTS) strongly increase, from 2 to 21 MPa and from 0.7 to 2.9 MPa, respectively, as the EN concentration increases from 0.1 to 10 mM. At the same time, the strain at fracture (SF), which was 0.6 for the pristine films, decreases from 0.4 to 0.23, thus resulting in a similar toughness ($\sim 0.4 \text{ MJ m}^{-3}$) for all the EN crosslinked films. It is well known that a higher crosslinking degree in hydrogels generally leads to increased stiffness and strength as it restricts the molecular motion of the network.²⁵ Simultaneously, the strain at fracture usually decreases when the crosslinking density increases. Our results suggest that the physical entanglements of the protein chains are trapped by the new covalent bonds introduced by crosslinking, thus leading to stiffer and stronger but less extensible materials with the increase in crosslinking density. In good agreement with the crosslinking density results of figure 3.1, a plateau in the mechanical performance of the EN crosslinked materials can be observed above 5 mM. At this EN concentration, the side-chain mobility would become too low for more crosslinking points to be formed and the crosslinked network probably confines most entanglements.

Figure 3.2 and table 3.1 show that, in contrast to the BPH films with a higher crosslinking density, the stiffness and UTS of the films crosslinked with the lowest EN concentration (0.1 mM) are slightly smaller than those of the pristine films. In general, protein networks are physically stabilized by loci of adherence made of both hydrogen bonds and hydrophobic interactions from the backbone and side chains, which contribute to their mechanical properties. Crosslinking the proteins at the lowest EN concentration may create

sufficient internal stress to disrupt some of these interactions without creating a sufficient density of covalent crosslinks to compensate for this effect, therefore leading to a loss of mechanical performance.

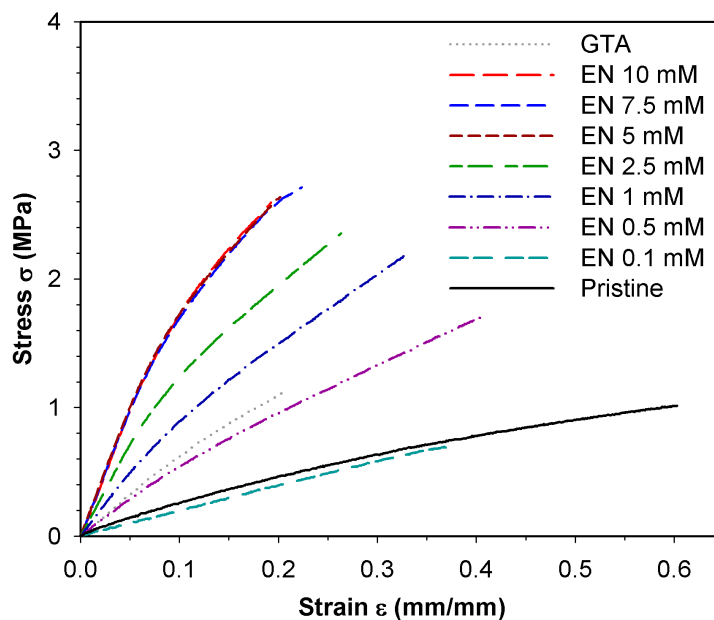


Figure 3.2. Representative tensile stress-strain curves for the pristine BPH films and the EN and GTA crosslinked BPH films.

Films crosslinked with GTA were much weaker than those treated with EN at 5 to 10 mM, with a lower modulus by a factor 3, even though they had a very similar fraction of blocked amino groups. The spacing introduced by the GTA long-range crosslinking seems to provide more flexibility to the network as compared to the EN coupling. In addition, the protein matrix of the GTA crosslinked films remains rich in free carboxylate groups at the experimental pH of 7.4, which leads to a higher water swelling of the hydrogel in PBS and to lower mechanical performance. Indeed, our previous work has shown that pristine films have pH-dependent mechanical properties: the electrostatic repulsion between charged amino acid side-chains in films treated at low or high pH leads to more swelling and lower strength and modulus than for films at their isoelectric point of 4.5.²¹ The higher mechanical properties obtained by EN crosslinking can also be explained by the nature of this coupling, i.e., between

carboxylic acids and amino groups. Since the number of ϵ -amino groups from lysine residues in the BPH is lower than the number of carboxylic acids from aspartic and glutamic acids (i.e. 5 vs 20 mol %),²¹ EN can create twice the number of crosslinking points as compared to GTA. Interestingly, figure 3.2 and table 3.1 show that the modulus of the GTA crosslinked films fall between those of the films treated with EN 0.5 and 1 mM, which have approximately half of the percentage of blocked amino groups when compared to the GTA crosslinked films (figure 3.1b). Thus, although electrostatic charges, type and size of crosslinker, chains entanglement, hydrogen bonding and hydrophobic interactions can contribute to the mechanical performance of the GTA crosslinked films, the number of covalent crosslinking points seems to be the most important factor.

Table 3.1. Uniaxial tensile mechanical properties of the pristine BPH films and the EN and GTA crosslinked BPH films.

	Modulus (MPa)		UTS* (MPa)		SF* (mm/mm)		Toughness (MJ m ⁻³)	
Pristine	2.5	± 0.2	1.0	± 0.2	0.60	± 0.03	0.36	± 0.08
EN 0.1 mM	2.0	± 0.2	0.7	± 0.1	0.4	± 0.1	0.17	± 0.05
EN 0.5 mM	5.8	± 0.7	1.8	± 0.4	0.4	± 0.1	0.4	± 0.2
EN 1 mM	9.3	± 0.9	2.1	± 0.4	0.3	± 0.1	0.4	± 0.2
EN 2.5 mM	14	± 2	2.3	± 0.3	0.29	± 0.06	0.4	± 0.1
EN 5 mM	18	± 2	2.5	± 0.7	0.23	± 0.08	0.4	± 0.2
EN 7.5 mM	21	± 2	2.9	± 0.3	0.23	± 0.05	0.4	± 0.1
EN 10 mM	21	± 2	2.9	± 0.5	0.24	± 0.06	0.5	± 0.2
GTA	6.5	± 0.5	1.1	± 0.3	0.22	± 0.06	0.14	± 0.08

*UTS: Ultimate tensile strength; SF: Strain at fracture. Average values ± standard deviation, N ≥ 6.

3.4.3 Resistance to enzymatic degradation

Because our previous studies^{21,26} showed that both the byssus and its derived BPH films are rich in collagen, we explored the *in vitro* resistance of the films toward collagenase

enzymatic degradation. Resistance to enzymatic degradation helps to maintain the integrity of biomaterials when implanted *in vivo* and thus to fulfill their mechanical function. A control made of type I collagen isolated from rat tail tendon was first incubated in the presence of the enzymes and was completely degraded after ~2 h. Pristine BPH films in the absence of collagenase were also used as a control and showed no weight loss. Figure 3.3a shows that the pristine BPH films and 0.1 mM EN crosslinked films have a very similar susceptibility to collagenase degradation after 24 h of incubation time, keeping about 70 % of their initial dry weight. This high resistance to enzymatic degradation could be explained by the fact that BPH is not exclusively composed of collagen but rather of a mixture of the many complex proteins forming the byssus threads. The resistance to enzymatic degradation is further enhanced with the increase in chemical crosslinking density, as observed previously for dermal sheep collagen, collagen/hyaluronic acid scaffolds and ventral pericardium tissue.²⁷⁻²⁹ A plateau where the collagenase has almost no degradation effect, i.e. with more than 95 % remaining weight, is reached at EN 2.5 mM, reminiscent of the plateau observed for the mechanical properties. Figure 3.3a also reveals that collagenase degrades the GTA crosslinked films to an extent very similar to the 1 mM EN treated ones, again bringing forward their similarity both in terms of degree of crosslinking and mechanical properties. The optical microscopy results from figure 3.3b corroborate that pristine, low EN concentration and GTA treated films were degraded by collagenase since they present a smoother eroded surface following the incubation period. In contrast, films on which collagenase had almost no effect show a rougher surface topography where threads associated to the casting mold used to prepare the films can be seen. These results highlight the excellent collagenase resistance of the BPH-based materials with higher crosslinking density.

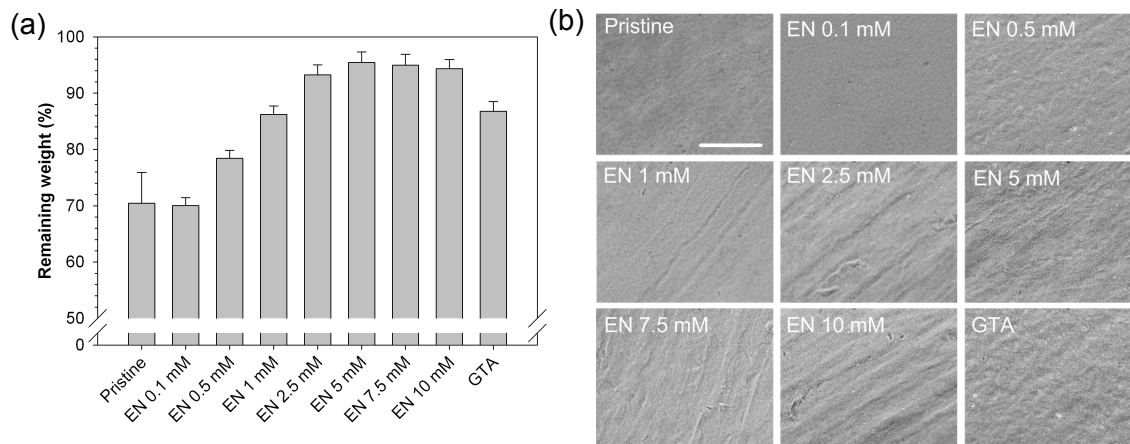


Figure 3.3. (a) Resistance to collagenase degradation of the pristine, EN and GTA crosslinked BPH films after 24 h of incubation *in vitro*. Average \pm standard deviation, $N \geq 3$. (b) Optical microscopy images of the BPH films after incubation in the presence of collagenase. The scale bar is 100 μm .

3.4.4 Infrared spectroscopy analysis of the pristine and crosslinked BPH films

FTIR spectroscopy was used to study the effect of chemical crosslinking as well as collagenase action on the molecular structure of the BPH films. Three spectral regions, the Amide A ($\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$), Amide I ($\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$) and Amide II ($\sim 1515 \text{ cm}^{-1}$) bands, were analyzed and interpreted in terms of the two most abundant structures previously identified in BPH films, i.e. intermolecular anti-parallel β sheets (aggregated strands) and collagen/gelatin/polyproline II (PPII) helices.²¹ These structures have also been identified in native byssal threads by infrared and NMR spectroscopy.^{26,30} Intermolecular anti-parallel β -sheets, or aggregated strands, are composed of extended chains stabilized by strong hydrogen bonds between the carbonyl and amino groups of the polypeptide backbones, while collagen has a complex supercoiled structure made of three left-handed PPII helices.³¹ The PPII helix is composed of a $(\text{Gly-X-Y})_n$ repetitive motif where, in general, X and Y are proline and hydroxyproline residues, respectively. The PPII helices in native collagen are stabilized by

intra and intermolecular hydrogen bonds involving backbone carbonyls and water molecules.^{32,33} The following discussion will focus on the effect of EN crosslinking on the BPH films. Results for the GTA crosslinked films in the three Amide regions are found in figure 3.S1 of the Supporting Information.

Figure 3.4 shows the spectra in the Amide I region of the pristine and EN-crosslinked films before (3.4a) and after (3.4b) incubation in the presence of collagenase. This band originates from carbonyl stretching with minor contributions from in-plane N-H bending and C-N stretching within the protein backbone.^{31,34} Its contour is greatly affected by the strength of hydrogen bonding and is therefore a good indicator of the protein secondary structure.^{31,34} The first noticeable change in figure 3.4a is a gradual shift of the band maximum from 1627 to 1632 cm^{-1} upon increasing crosslinking degree. The maximal shift is reached at an EN concentration of 2.5 mM, in good agreement with the results for both mechanical properties and resistance to collagenase degradation. In the second derivative spectra, a decrease of the 1620 and 1698 cm^{-1} components, associated to intermolecular anti-parallel β -sheets (aggregated strands), can be observed with increasing crosslinking density. This is accompanied by an increase of the components at 1660, 1644 and 1632 cm^{-1} previously ascribed in the literature to collagen triple helix and/or to related model peptides with different structural folding or hydration state.^{32,33,35,36} The simultaneous decrease of the 1620 cm^{-1} component and increase of the 1632 and 1644 cm^{-1} constituents result in the gradual blue shift of the Amide I band with EN concentration during crosslinking.

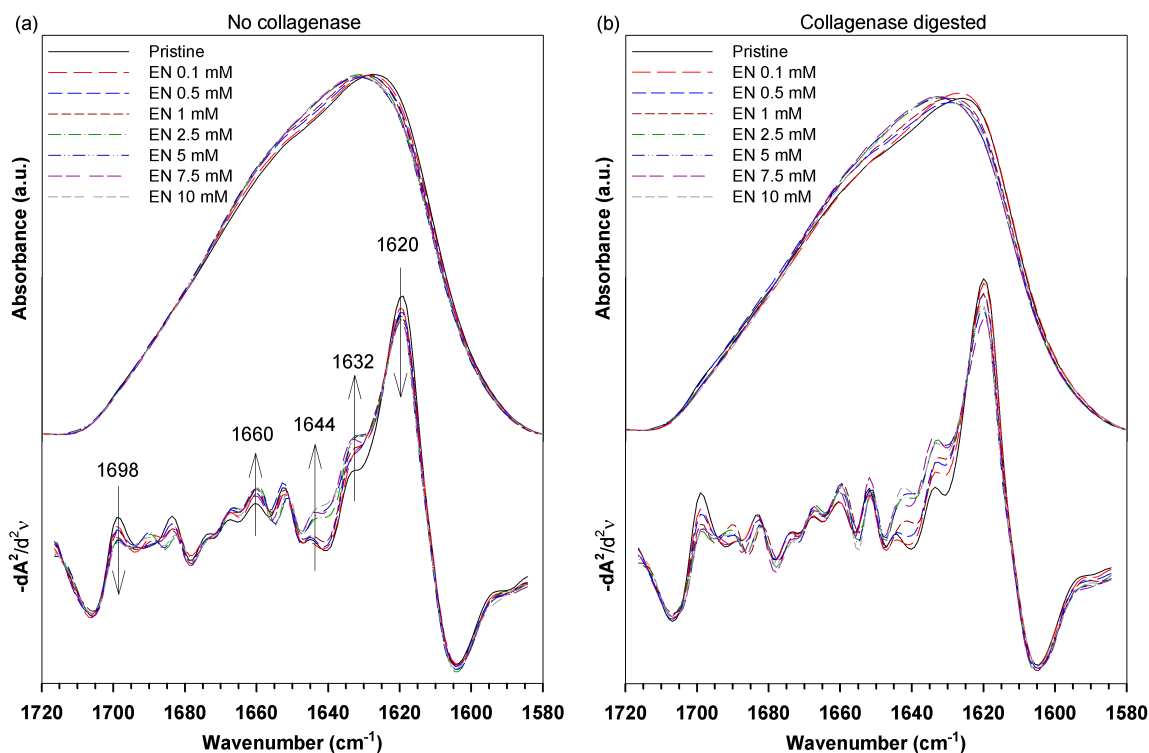


Figure 3.4. FTIR spectra in the Amide I region (top) and their corresponding second derivative (bottom) for pristine and crosslinked BPH films (a) before and (b) after incubation in the presence of collagenase.

The quantity of collagen-related structures relative to aggregated strands is monitored in figure 3.5 using the second derivative intensity ratios (the most intense component at 1620 cm^{-1} is used as a normalization factor). First, the $1698/1620\text{ cm}^{-1}$ band ratio of the BPH films is unaffected by chemical crosslinking and collagenase treatment. This result was expected since these two bands are related to the same structural element, i.e. aggregated strands. On the other hand, the ratios for the 1660, 1644 and 1632 components increased with crosslinking density up to an EN concentration of 2.5 mM, followed by nearly constant values for higher EN concentrations. These results highlight the structural conversion from aggregated strands to collagen/PPII related structures following crosslinking, which plateaus at high crosslinking densities as observed for both the mechanical performance and enzymatic degradation resistance in figure 3.2 and 3.3.

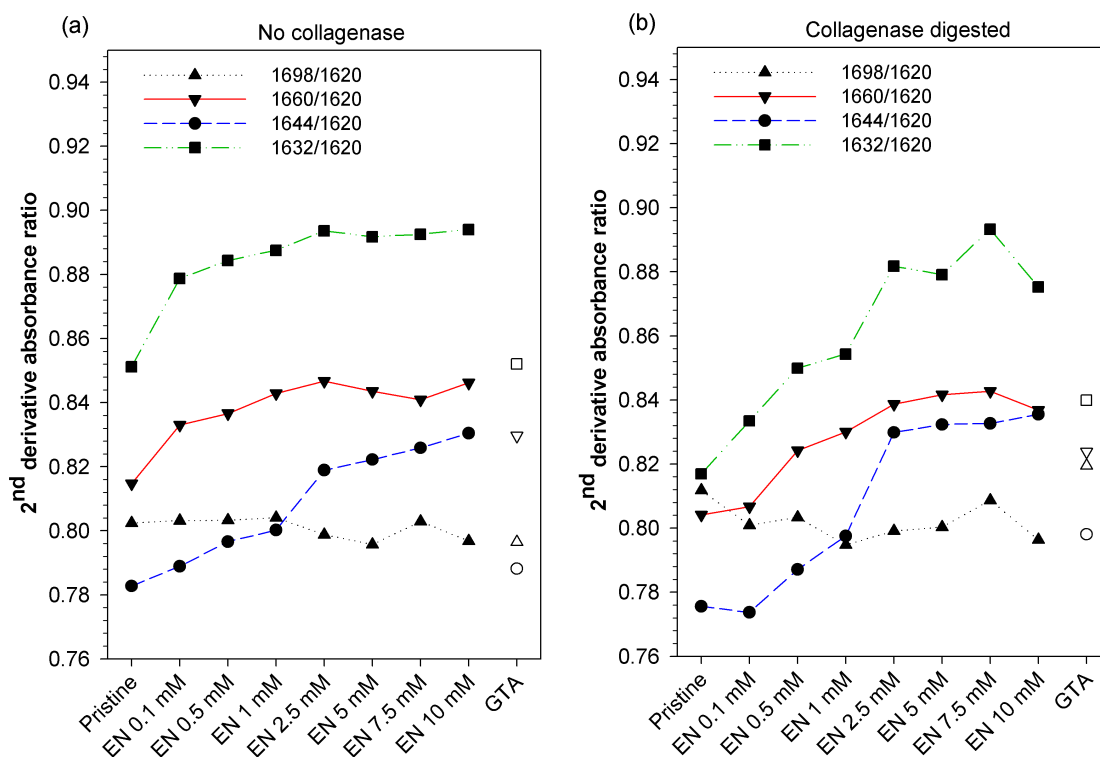


Figure 3.5. Intensity ratio of the second derivative components associated to aggregated strands (1620 and 1698 cm^{-1}) and collagen-like structures (1660 , 1644 and 1632 cm^{-1}) (a) before and (b) after collagenase digestion of the BPH films. Filled symbols stand for pristine and EN crosslinked films while open symbols are for GTA results.

Figure 3.4b shows the impact of exposing the pristine and crosslinked BPH films to collagenase. The relative intensity of the three collagen-related components decreases compared to those at $1620/1698\text{ cm}^{-1}$ in the spectra of the collagenase-digested samples. As expected from the collagenase digestion results in figure 3.3, the effect is more pronounced for the pristine films and for the samples with low crosslinking degrees, i.e. with EN concentration below 2.5 mM . These changes are monitored more quantitatively in figure 3.5b using the ratio of the intensity of second derivative bands. Comparison of figure 3.5a and 3.5b shows that treatment with collagenase leads to a decrease of the ratio values for the 1660 and 1632 cm^{-1} components for the pristine and lightly crosslinked (up to EN 2.5 mM) materials.

For instance, the 1632/1620 cm^{-1} ratio for the pristine film decreases from 0.85 to 0.81 after collagenase incubation, providing spectral evidence for a significant loss of collagen-related structures. In contrast, the intensity ratios for the most highly crosslinked BPH films are essentially the same before and after a 24 h enzymatic digestion. Again, these results correlate well with the plateau observed in the number of free amino groups (figure 3.1), mechanical properties (figure 3.2) and collagenase resistance (figure 3.3) at high carbodiimide concentration. Our results show that although EN treatment increases the proportion of collagen-related structural elements at the expense of aggregated strands (figure 3.5a), these collagen parts become less accessible to the enzyme due to the increased crosslinking in the films.

Similarly to the films with low EN crosslinking degree, the spectra of the GTA crosslinked films in the three Amide regions (figure 3.S1) also point to a conversion from aggregated strands to hydrated collagen-related structures. This can be seen in figure 3.5 where the intensity ratios of the second derivative bands for the GTA crosslinked films (open symbols) are similar to those recorded for a low EN crosslinking degree (0.5 mM). These results also help explain their weaker mechanical properties and lower enzymatic degradation resistance.

Hence, as depicted in figure 3.6, we propose that polypeptides in BPH films adopt different hydrated collagen and PPII-related structures during the crosslinking reaction at the expense of the initially present aggregated strands. This is reinforced by the results from the Amide A and Amide II regions of the various BPH films (figure 3.S2 and 3.S3 and associated discussion in SI), where the formation of more hydrated structures was detected following the crosslinking reaction. The hydrated collagen-related structures observed in these spectral ranges were also affected by the collagenase treatment for EN concentration below 2.5 mM, validating the structural attribution. Such disruption and structural conversion of aggregated strands was not expected since they are stabilized by strong hydrogen bonds. However, the crosslinking reaction takes place in a buffer at pH 5.5, conditions at which the films are in a highly swollen state (the pI of the BPH is 4.5).²¹ Increasing the crosslinking density may create internal stress and provoke the reorganization of some aggregated strands either during the reaction or the following washing and drying steps. Subsequently, hydrated PPII helices

could form unordered collagen aggregates or coil to form collagen/gelatin triple helices, leading to the observed increase of the collagen and PPII-related bands and to the decrease of the anti-parallel β -sheet components in the infrared spectra.

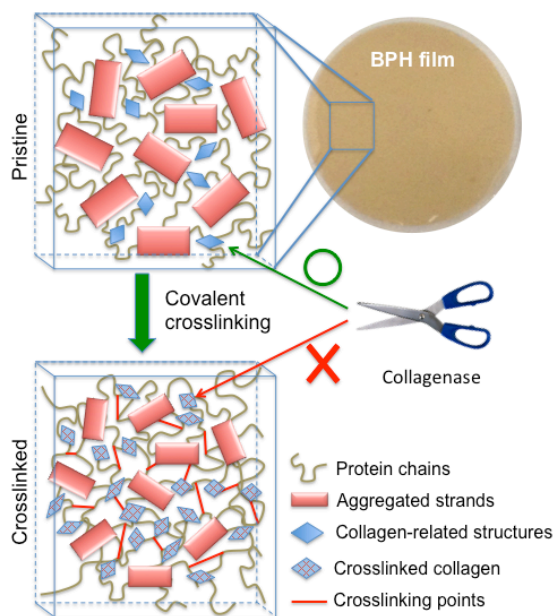


Figure 3.6. Representation of the protein network in the BPH films before and after the covalent crosslinking reaction. The aggregated strands (red) are partly converted into collagen-related structures (blue) and the crosslinked films become resistant to collagenase degradation.

3.5 Conclusion

In this study, we showed that chemical crosslinking using either glutaraldehyde or a carbodiimide (EDC-NHS) allows modulating the strength and stiffness of mussel-derived byssus protein hydrolyzate (BPH) films, at the expense of a loss in the maximum strain at fracture. As a result of increasing crosslinking density, the films become essentially resistant to collagenase degradation, which makes them good candidates for biomaterials development. Using FTIR spectroscopy, we confirmed that the BPH films contain a relatively high amount of collagen as well as aggregated strands in anti-parallel β -sheets conformation. An unexpected conversion of aggregated strands to collagen-related structure occurs when

increasing the crosslinking degree. The ability to tune the mechanical properties of biomaterials is an asset for soft tissue engineering as it may extend their field of application and lead to a better biological response from the host. Thus, BPH films are a promising new set of protein-based biomaterials.

3.6 Acknowledgments

This work was supported by a strategic research grant of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and funding from the Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologies (FRQNT). F.B. is grateful to the FRQNT and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Strategic Training Initiative in Chemical Biology for the award of scholarships. I.M. is a member of Ressources Aquatiques Québec (RAQ) and the Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels (CQMF). C.P. is a member of the Center for Self-Assembled Chemical Structures (CSACS).

3.7 References

1. D. N. Woolfson, M. G. Ryadnov, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, **10**, 559-567.
2. X. Wang, H. J. Kim, C. Wong, C. Vepari, A. Matsumoto, D. L. Kaplan, *Mater. Today*, 2006, **9**, 44-53.
3. J. F. Almine, D. V. Bax, S. M. Mithieux, L. Nivison-Smith, J. Rnjak, A. Waterhouse, S. G. Wise, A. S. Weiss, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 3371-3379.
4. C. Vepari, D. L. Kaplan, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, **32**, 991-1007.
5. C. H. Lee, A. Singla, Y. Lee, *Int. J. Pharm.*, 2001, **221**, 1-22.
6. R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod, *Materials*, 2010, **3**, 1863-1887.
7. C. N. Grover, J. H. Gwynne, N. Pugh, S. Hamaia, R. W. Farndale, S. M. Best, R. E. Cameron, *Acta Biomater.*, 2012, **8**, 3080-3090.
8. J. S. Pieper, T. Hafmans, J. H. Veerkamp, T. H. van Kuppevelt, *Biomaterials*, 2000, **21**, 581-593.

9. J. S. Pieper, P. M. van der Kraan, T. Hafmans, J. Kamp, P. Buma, J. L. C. van Susante, W. B. van den Berg, J. H. Veerkamp, T. H. van Kuppevelt, *Biomaterials*, 2002, **23**, 3183-3192.
10. S. Ber, G. Torun Kose, V. Hasirci, *Biomaterials*, 2005, **26**, 1977-1986.
11. F. Everaerts, M. Torrianni, M. van Luyn, P. van Wachem, J. Feijen, M. Hendriks, *Biomaterials*, 2004, **25**, 5523-5530.
12. Q. Lu, K. Ganesan, D. T. Simionescu, N. R. Vyavahare, *Biomaterials*, 2004, **25**, 5227-5237.
13. E. Degtyar, M. J. Harrington, Y. Politi, P. Fratzl, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 12026-12044.
14. M. J. Harrington, A. Masic, N. Holten-Andersen, J. H. Waite, P. Fratzl, *Science*, 2010, **328**, 216-220.
15. Q. Lin, D. Gourdon, C. Sun, N. Holten-Andersen, T. H. Anderson, J. H. Waite, J. N. Israelachvili, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, **104**, 3782-3786.
16. H. Zeng, D. S. Hwang, J. N. Israelachvili, J. H. Waite, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, **107**, 12850-12853.
17. J. H. Waite, X.-X. Qin, K. J. Coyne, *Matrix Biol.*, 1998, **17**, 93-106.
18. T. Hassenkam, T. Gutschmann, P. Hansma, J. Sagert, J. H. Waite, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 1351-1355.
19. M. J. Harrington, J. H. Waite, *J. Exp. Biol.*, 2007, **210**, 4307-4318.
20. E. Vaccaro, J. H. Waite, *Biomacromolecules*, 2001, **2**, 906-911.
21. F. Burette, C. Pellerin, I. Marcotte, *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 6378-6386.
22. W. A. Bubnis, C. M. Ofner Iii, *Anal. Biochem.*, 1992, **207**, 129-133.
23. R. Zeeman, P. J. Dijkstra, P. B. van Wachem, M. J. A. van Luyn, M. Hendriks, P. T. Cahalan, J. Feijen, *Biomaterials*, 1999, **20**, 921-931.
24. S. Gorgieva, V. Kokol, Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives, in *Biomaterials Applications for Nanomedicine*, ed. R. Pignatello, InTech, 2011, pp. 17-52.
25. K. S. Anseth, C. N. Bowman, L. Brannon-Peppas, *Biomaterials*, 1996, **17**, 1647-1657.

26. A. A. Arnold, F. Biette, M.-O. Séguin-Heine, A. LeBlanc, L. Sleno, R. Tremblay, C. Pellerin, I. Marcotte, *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 132-141.
27. L. L. H. D. Olde Damink, P. J.; van Luyn, M. J. A.; van Wachem, P. B.; Nieuwenhuis, P.; Feijen, J., *Biomaterials*, 1996, **17**, 679-684.
28. S.-N. Park, J.-C. Park, H. O. Kim, M. J. Song, H. Suh, *Biomaterials*, 2002, **23**, 1205-1212.
29. J. M. Lee, H. H. L. Edwards, C. A. Pereira, S. I. Samii, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1996, **7**, 531-541.
30. A. Hagenau, P. Papadopoulos, F. Kremer, T. Scheibel, *J. Struct. Biol.*, 2011, **175**, 339-347.
31. M. Jackson, H. H. Mantsch, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1995, **30**, 95-120.
32. Y. A. Lazarev, B. A. Grishkovsky, T. B. Khromova, *Biopolymers*, 1985, **24**, 1449-1478.
33. K. J. Payne, A. Veis, *Biopolymers*, 1988, **27**, 1749-1760.
34. H. Fabian, W. Mäntele, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, eds. J. M. Chalmers, P. R. Griffiths, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2002, vol. 5, p. 27.
35. M. A. Bryan, J. W. Brauner, G. Anderle, C. R. Flach, B. Brodsky, R. Mendelsohn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 7877-7884.
36. J. H. Muyonga, C. G. B. Cole, K. G. Duodu, *Food Chem.*, 2004, **86**, 325-332.

3.8 Supporting information

Effect of GTA crosslinking on pristine BPH films and collagenase action as seen by FTIR spectroscopy

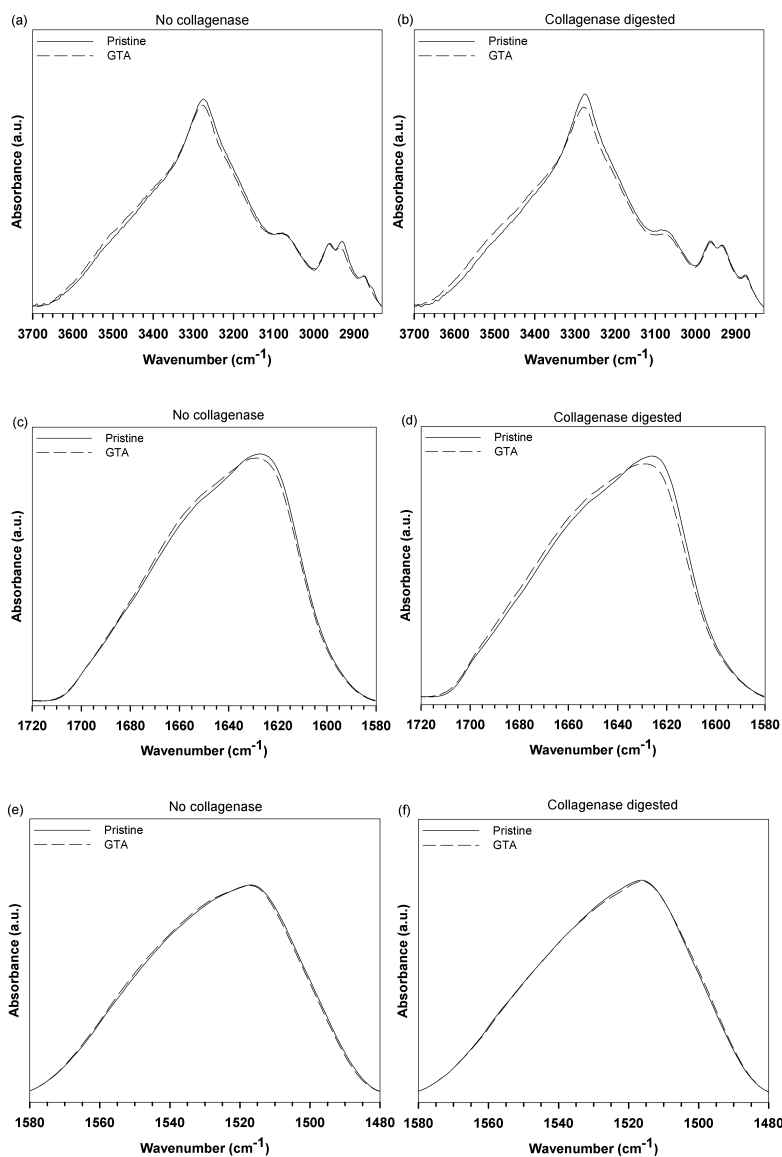


Figure 3.S1. Amide A (a,b), Amide I (c,d) and Amide II (e,f) regions of the FTIR spectra of the pristine and GTA-crosslinked films before (left) and after (right) incubation with collagenase.

Additional information on the effect of EN crosslinking on pristine BPH films and collagenase action

Figure 3.S2 shows the Amide A region of the FTIR spectra of the pristine and EN-crosslinked BPH films. The Amide A and Amide B regions around 3300 and 3080 cm^{-1} , respectively, are associated with the N-H stretching vibrational mode in Fermi resonance with Amide II's first overtone.¹ A slight decrease in absorbance of the Amide A band is detected upon crosslinking, while there is an increase of the absorbance in the 3600-3350 cm^{-1} region. The latter can be ascribed to water molecules hydrogen bonded with collagen.² The decrease of the absorbance of the Amide A maximum is related to a broadening of this component which has been associated to a loss of molecular order in collagen model peptides following hydration.³ Hence, the results from the Amide A region support those from the Amide I region in figure 3.4 (main text) where hydrated collagen-related structures are formed at the expense of aggregated strands following the chemical crosslinking of the BPH films.

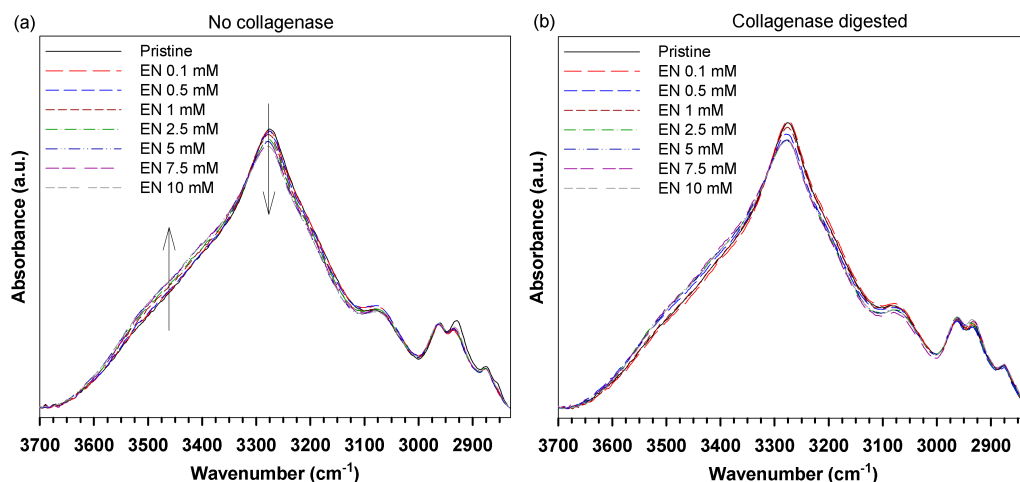


Figure 3.S2. FTIR spectra in the Amide A region for pristine and EN-crosslinked films (a) before and (b) after incubation with collagenase.

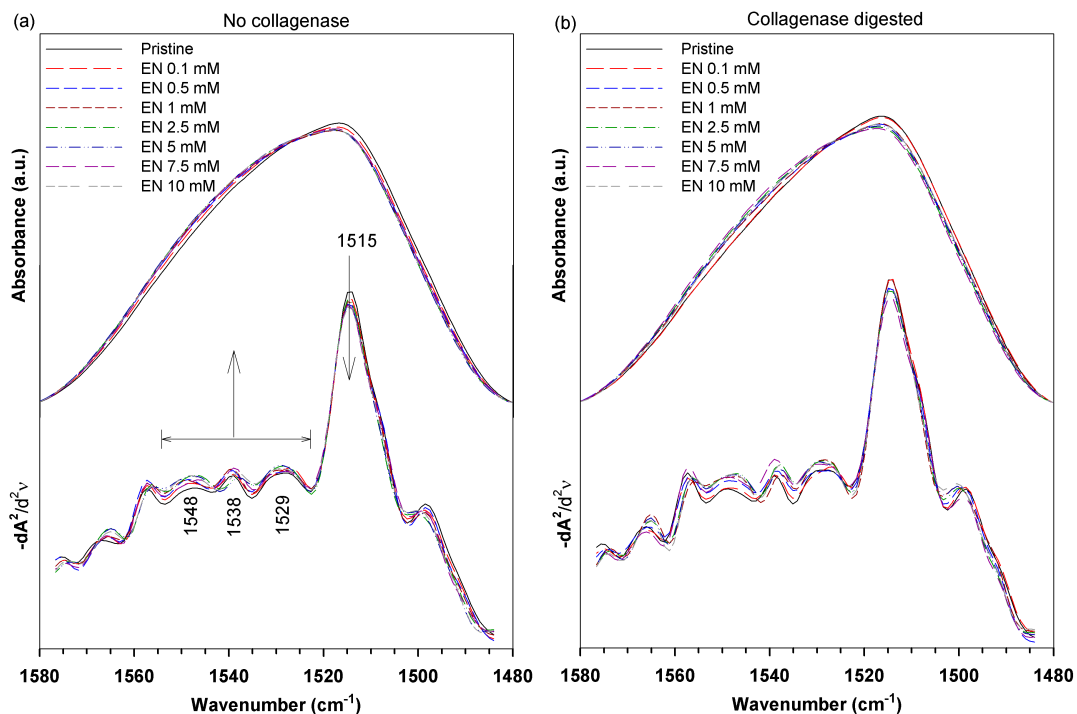


Figure 3.S3. FTIR spectra in the Amide II region (top) and their corresponding second derivative curves (bottom) for pristine and EN-crosslinked films (a) before and (b) after incubation in the presence of collagenase.

The Amide II band results from the coupling of the N-H bending (60 %) with the C-N stretching (40 %) modes, making this band less sensitive to conformational changes than the Amide I band.^{1,4} Nevertheless, information can be extracted when analyzing this band simultaneously with the other amide regions. Figure 3.S3 shows the FTIR spectra and the corresponding second derivative curves for the pristine and EN-crosslinked BPH films in the Amide II region before and after digestion with collagenase. Although the maximum of the band remains centered at $\sim 1515\text{ cm}^{-1}$ following reaction with EN, a broadening in the 1570 to 1515 cm^{-1} region can clearly be observed. As for the Amide I band in figure 3.4 (main text), the effect is more pronounced following incubation with collagenase (figure 3.S3b). The second derivative curves show that, after the crosslinking reaction, the relative intensity of the maximum at 1515 cm^{-1} decreases while the components at 1548, 1538 and 1529 cm^{-1} slightly

increase. A decrease in these three components is then induced by collagenase digestion of the pristine and of the lightly crosslinked BPH films. The component at 1548 cm^{-1} has been associated to native collagen triple helix while the one at 1529 cm^{-1} was ascribed to the unordered form of collagen.² However, we could not assign the 1538 cm^{-1} to collagen.

According to the literature, the component at 1515 cm^{-1} results from the aromatic ring stretching vibrational mode of the tyrosines side chain.⁵ DOPA being very similar to tyrosine, this moiety must also contribute to the signal at 1515 cm^{-1} in BPH films. The region around 1520 cm^{-1} has also been associated to the formation of anti-parallel β -sheets in silk fibroin materials.⁶ However, studies on thermally induced crystallization of the silk associated the increase of the Tyr 1515 cm^{-1} component to a loss of conformational freedom following dehydration of the proteins.⁷ This seems to be consistent with the changes seen in our system. Therefore, the decrease of Tyr band intensity in the Amide II region following crosslinking could be caused by the disruption of the hydrophobic cores in which Tyr residues are buried and to the formation of a more hydrated environment. This is also consistent with the results of the Amide A band in figure 3.S2 showing an increase of water hydrogen bonding with collagen. Since the difference between the infrared spectra of collagen/gelatin triple helices and free PPII helices results from changes in their hydration environment, we can conclude that the variations seen in figure 3.4, 3.5, 3.S2 and 3.S3 upon EN crosslinking are related to the disruption of dehydrated intermolecular aggregates at the benefit of hydrated collagen-related structures.

SI References

1. H. Fabian, W. Mäntele, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, eds. J. M. Chalmers, P. R. Griffiths, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2002, vol. 5, p. 27.
2. O. S. Rabotyagova, P. Cebe, D. L. Kaplan, *Mater. Sci. Eng. C*, 2008, **28**, 1420-1429.
3. Y. A. Lazarev, B. A. Grishkovsky, T. B. Khromova, *Biopolymers*, 1985, **24**, 1449-1478.
4. M. Jackson, H. H. Mantsch, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1995, **30**, 95-120.
5. A. Barth, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2000, **74**, 141-173.

6. H. J. Jin, J. Park, V. Karageorgiou, U. J. Kim, R. Valluzzi, P. Cebe, D. L. Kaplan, *Adv. Funct. Mater.*, 2005, **15**, 1241-1247.
7. X. Hu, D. Kaplan, P. Cebe, *Macromolecules*, 2008, **41**, 3939-3948.

Chapitre 4 : Metal-Ligand Interactions and Salt Bridges as Sacrificial Bonds in Mussel Byssus-Derived Materials *

4.1 Abstract

The byssus that anchors mussels to solid surfaces is a protein-based material combining strength and toughness as well as a self-healing ability. These exceptional mechanical properties are explained in part by the presence of metal ions forming sacrificial bonds with amino acids. In this study, we show that the properties of hydrogel films prepared from a byssus protein hydrolyzate (BPH) can also be improved following the biomimetic formation of sacrificial bonds. Strengthening and toughening of the materials are both observed when treating films with multivalent ions (Ca^{2+} or Fe^{3+}) or at the BPH isoelectric point (pI) as a result of the formation of metal-ligand bonds and salt bridges, respectively. These treatments also provide a self-healing behavior to the films during recovery time following a deformation. While pI and Ca^{2+} treatments have a similar but limited pH-dependent effect, the modulus, strength and toughness of films increase largely with Fe^{3+} concentration and reach much higher values. The affinity of Fe^{3+} with multiple amino acid ligands, as shown by vibrational spectroscopy, and the more covalent nature of this interaction can explain these observations. Thus, a judicious choice of treatments on polyampholyte protein-based materials enables to control their mechanical performance and self-healing behavior through the strategic exploitation of reversible sacrificial bonds.

* Soumis en tant qu'article dans *Biomacromolecules* : Frédéric Byette; Audrey Laventure; Isabelle Marcotte; Christian Pellerin, 2016.

4.2 Introduction

Biomimetic and bio-inspired materials are gaining increasing importance with the discovery and improved understanding of the remarkable structure and functions of biological materials. Recently, sacrificial bonds such as ionic bonds, hydrogen bonds, hydrophobic interactions, and metal-ligand coordination were revealed as structural elements that enhance the mechanical performances of some natural materials.¹⁻⁴ For example, the presence of metal ions in a protein matrix was shown to reinforce and/or to provide a self-healing capability to biological materials.^{5,6} These features were observed in particular with the byssus, a protein-based set of fibers tethering mussels to water-immersed solid surfaces.

The byssus threads are designed to protect mussels from the hostile coastal reef environment, e.g. the lift and drag forces of waves and tides. The mechanical properties of these fibers are governed by multiple factors including their heterogeneous protein content hierarchically assembled,^{3,7} the specific conformation of the various proteins,^{8,9} the pH of the surrounding media and the presence of metallic ions binding to amino acid ligands such as histidines and 3,4-dihydroxyphenylalanines (DOPA).^{5,10} During tensile deformation of individual byssus fibers, the sacrificial bonds in the histidine-rich regions of the byssus core can rupture before covalent bonds, thus preventing their critical failure. Therefore, these metal-ligand interactions both stiffen and toughen the byssal threads, providing an energy-saving and protective evolutionary strategy to mussels.^{2,11,12}

The presence of metal-ligand sacrificial bonds in the byssus proteins, along with the elastic nature of the protein framework, was also shown to be responsible for the self-healing of the mechanical performance of the fibers, i.e., a partially recoverable hysteresis between the loading and unloading curves in cyclic uniaxial stretching experiments.^{3,4,10} Once the initially applied stress is removed, the sacrificial bonds that were broken during deformation can reform and lead to a time-dependent partial recovery of the initial mechanical properties.⁴ Some protein segments also contribute to an entropy-driven recovery by providing “hidden length” in the form of hydrogen bonded secondary structures that can deform or unfold reversibly under stress.^{3,10,13,14} The self-healing behavior procured by sacrificial bonds has

recently led to the development of bio-inspired metallopolymers and synthetic peptides with tunable mechanical properties.¹⁵⁻²⁰

In a previous study,²¹ we demonstrated the possibility of preparing a byssus protein hydrolyzate (BPH) with good film forming ability and with pH-tunable mechanical properties. The behavior of these bio-derived hydrogels was explained by the high content of charged amino acids (≈ 30 mol %) in the BPH that confers them polyampholyte-like properties. Films treated at their isoelectric point (pI) of 4.5 were stiffer and tougher because of attractive electrostatic interactions forming salt bridges acting like effective crosslinks. In contrast, acidic or alkaline pH generated electrostatic repulsion that led to a higher water swelling of the protein network and to mechanically weaker films.

In this study, we used a biomimetic approach to optimize the mechanical performance of the mussel-derived BPH films by inserting different metallic ions. We show that sacrificial bonds between amino acid ligands and the introduced cations allow tuning the stiffness and toughness of the BPH films as in the native byssus. We also observe the time-dependent self-healing behavior enabled by the salt bridges and metal-ligand sacrificial bonds in the BPH films.

4.3 Material and Methods

4.3.1 Materials

Stocks of byssi were kindly provided by Moules de Culture des Îles Inc. (Magdalen Islands, QC, Canada) and MenuMer Ltée (Gaspé, QC, Canada). Byssal threads were first sorted to remove most of the unwanted sea products (algae, shells and other mollusk related parts) then thoroughly washed with soap under tap water. The cleansed product was rinsed several times with distilled water and frozen at -20 °C. All other chemicals were of reagent grade and were used without further purification.

4.3.2 Methods

4.3.2.1 Byssus proteins hydrolyzate (BPH) preparation

The BPH was prepared as reported in our previous study.²¹ Briefly, 5 g of cleansed and crushed dry byssi were mixed in 150 mL of a 0.2 M KCl buffer system with 0.1 M sodium ethylene diamine tetra-acetate (EDTA) and adjusted to pH 13.5 with NaOH. The system was magnetically stirred at 4 °C for 7 days. The non-solubilized particles were removed by centrifugation and proteins from the supernatant were precipitated by adjusting the pH to 4.5 using acetic acid, and adding sodium chloride to reach a 0.5 M final concentration. The proteins were left to precipitate for 1h before being pelleted by centrifugation at 5000 rpm at 4 °C for 20 min. The precipitate was dispersed in distilled water before being dialyzed (SpectraPor 3, MWCO 6-8 kDa, Spectrum Lab) for 3 days against distilled water. The precipitate was finally pelleted by centrifugation at 5000 rpm for 20 min at 4 °C before being freeze-dried.

4.3.2.2 Films preparation

The foam-like lyophilized BPH was crushed and dispersed in water before adjusting the pH to 10.5 using NaOH, reaching a final slurry concentration of 1 % (m/v). The solution was pulse sonicated using a Microson XL-2000 ultrasonic homogenizer (Qsonica) for another 1 min. The solution was finally degassed by centrifugation for 2 min at 5000 rpm and 1 mL of the solution was poured into each well of a homemade Teflon mold (49 circular wells of 20 mm diameter). The solutions were left to evaporate in a fume hood until dry films were formed, usually for 96 h. The resulting water insoluble films were gently peeled off and washed with distilled water for 30 min before further treatments.

4.3.3.3 Metal treatment on BPH films

Hydrated pristine BPH films were immersed in 5 mL of 500 mM NaCl, CaCl₂ or FeCl₃ solutions for 2 h at room temperature. The films were then washed several times with distilled

water to remove any free ions. Other films were first pre-treated at their pI (pH 4.5) for 2 h using 0.1 M citrate buffer, washed with distilled water, and finally treated with the above-mentioned metal ions solutions. Solutions with other concentrations of FeCl₃ were also used (i.e. 50, 5, 0.5 and 0.05 mM) to study the effect of iron content on the mechanical properties of the films. Finally, other films were first adjusted to pH 1 using a 0.5 M KCl buffer and then treated for 2 h in a 500 mM CaCl₂ solution (pre-adjusted to pH 1) to isolate the effect of pH on mechanical properties.

4.3.3.4 Mechanical testing

Static uniaxial stress-strain measurements were conducted on sections (10 mm x 5 mm) of the various films using an Instron 5465 mechanical testing frame equipped with a 50 N load cell and a Biopuls bath filled with distilled water at 37 °C. The films were mounted between the jaws and pre-conditioned in the water bath for ~2 min before applying a constant extension rate of 5 mm min⁻¹. The modulus was calculated using the initial linear portion of the curve, typically between 2 and 5 % strain.

Cyclic uniaxial tensile testing was performed using the same instrument with the Biopuls bath either filled with distilled water, 500 mM NaCl, 10 mM NaHCO₃ (pH 10.5) or 10 mM KCl (pH 1) buffer at 37 °C. To study the self-healing behavior of the mechanical performance, selected films were cycled between 0 and 35 % extension at 5 mm min⁻¹ with different resting times between the cycles (0, 5, 20, 60 and 120 min). The modulus, stress at maximum strain and toughness values were extracted from the different experiments. To study the Mullins effect of the materials, films were stretched at a strain rate of 5 mm min⁻¹ until a selected strain was reached. The stress was then relieved by returning to the initial strain (0 mm/mm) at the same rate of 5 mm min⁻¹. The strain was increased by 0.1 mm/mm for each cycle and the process repeated until failure.

4.3.3.5 Optical microscopy

Fluorescence optical microscopy images were acquired with a MicroPublisher 3.3 RTV camera (Qimaging) mounted on an Axioscope 2 microscope (Carl Zeiss Microscopy LLC) equipped for epifluorescence. The DAPI filter was used for excitation and emission of the blue fluorescence. The images were recorded using the same exposure time to enable comparison of the fluorescence intensity of the different materials. Bright field images were recorded in transmission mode using the same microscope.

4.3.3.6 Raman spectromicroscopy

Raman confocal spectromicroscopy was conducted using a LabRam HR800 (Horiba Scientific) with a 600 g mm^{-1} holographic grating. The spectra were acquired with 10-30 mW of a 785 nm diode laser focused on the sample through a 60X water immersion objective (NA 1.0). The slit opening was fixed at $500 \text{ }\mu\text{m}$ while confocal hole was varied between 500 and $1000 \text{ }\mu\text{m}$ depending on the signal intensity. A polynomial baseline was applied to the spectra using LabSpec 6 spectroscopy suite (Horiba Scientific) in order to correct for the fluorescence signal.

4.3.3.7 Attenuated total reflection (ATR) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy

Infrared spectra of the films were obtained using a Bruker Tensor 27 spectrometer with a liquid nitrogen-cooled mercury-cadmium-telluride detector and a Golden Gate diamond ATR accessory (Specac). Spectra were acquired by averaging 256 scans with a 4 cm^{-1} resolution. The spectra were first baseline corrected using the concave rubberband method in Bruker OPUS 6.0, then normalized with the standard normal variate method over the amide II region ($1580 \text{ to } 1480 \text{ cm}^{-1}$) using LabSpec 6. Difference spectra in the amide II region were also calculated using LabSpec 6.

4.4 Results and discussion

4.4.1 Effect of metal addition on tensile mechanical properties

We first explored the effect of Na^+ , Ca^{2+} or Fe^{3+} addition on the tensile mechanical properties of the BPH films. These metal ions of different valence were chosen because of their natural abundance in the byssal threads.^{22,23} Figure 4.1a displays representative stress-strain curves for the pristine (i.e., without pH pre-treatment) BPH films with and without added metal ions. The results summarized in table 4.1 show that the elastic modulus and ultimate tensile strength (UTS) increase in the presence of metal ions and with the valence of the ions. The addition of Na^+ increased the modulus and UTS by a factor of two while Ca^{2+} led to a ~ 3.5 times increase compared to the untreated pristine films. The addition of Fe^{3+} had a much larger effect, leading to a modulus ~ 15 times higher and to a sevenfold increase of UTS compared to the pristine films.

The pristine films were formed at pH 10.5 where carboxylate functional groups are deprotonated and thus repulse one another, leading to a high water swelling ratio.²¹ The presence of metal ions can screen these free electrostatic charges and create crosslinking points between aspartate and glutamate carboxylate groups, as well as other less abundant amino acids such as histidine, DOPA, asparagine and glutamine. They thus suppress the anionic repulsion, decrease the water swelling, and enhance the mechanical properties. As expected, Na^+ has the smallest impact on the mechanical performance of the pristine films since it cannot act as a crosslinker and only moderately screens charges. Even though the calcium binding with ligands is ionic, like for sodium, it can interact with more than one ligand and thus form effective crosslinking points. Iron can also bind with several ligands but it forms stronger complexes because of the more covalent nature of the interaction, explaining the much larger impact of Fe^{3+} on the mechanical performance of the BPH films.

We then studied the effect of metal ions on the mechanical performance of BPH films pre-treated at their pI using a citrate buffer (pH 4.5). BPH films were previously shown to have better mechanical performance at their pI as a result of salt bridges (interaction between carboxylate and ammonium functional groups) acting as effective crosslinking points in the protein matrix.²¹ As seen from figure 4.1b and table 4.1, the addition of NaCl in pI-treated

films slightly decreases the modulus compared to pI-treated films. These results support that NaCl only affects the BPH films by screening the electrostatic charges within the protein matrix, thus enhancing the mechanical performances of the anionic pristine films but slightly diminishing those of the electrostatically crosslinked pI-treated films. Figure 4.1b also shows that CaCl₂ treatment has no significant effect on the mechanical properties of the pI-treated films. Therefore, the binding of Ca²⁺ with ligands only compensates for its screening effect over the favorable salt bridges interactions formed during pI treatment. This phenomenon will be further discussed below in the context of cyclic deformation experiments.

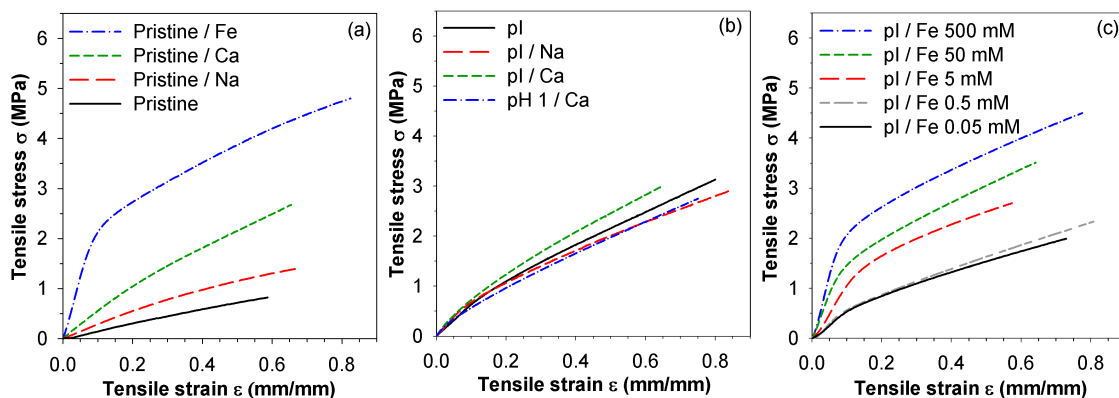


Figure 4.1. Representative uniaxial tensile stress-strain curves of (a) pristine (pH 10.5) films without and with treatment with 500 mM NaCl, CaCl₂ or FeCl₃, (b) pI (pH 4.5) treated films without and with further treatment in 500 mM NaCl or CaCl₂, and of KCl pH 1 pre-treated films immersed in a 500 mM CaCl₂ solution, and (c) pI-treated films soaked in FeCl₃ solutions of 500, 50, 5, 0.5 and 0.05 mM.

Figure 4.1c and table 4.1 show the effect of FeCl₃ concentration on the mechanical properties of pI-treated BPH films. Treatment at the lowest concentration (0.05 mM) slightly decreases the elastic modulus and UTS compared to the control pI-treated film while treatment with the 0.5 mM FeCl₃ solution has no significant effect. The elastic modulus then strongly increases when the concentration of FeCl₃ is raised from 5 to 500 mM, reaching a value as high as that obtained for the pristine films treated with the 500 mM FeCl₃ solution. FeCl₃ solutions are acidic (500, 50, 5, 0.5 and 0.05 mM solutions have a pH of ~1.2, 2.0, 2.7, 3.3 and

3.9, respectively) and therefore reduce the pH of the protein matrix to some extent during the incubation. Thus, the addition of ferric chloride leads to three concomitant phenomena: 1) screening of the electrostatic charges within the protein network due to increased ionic strength, 2) metal-ligand bridging between amino acid moieties and 3) decrease of pH. The decreased modulus and UTS values for films treated with low Fe^{3+} concentration (i.e. 0.05 mM) is thus explained by charge screening and acidification of the protein matrix which disrupt the effective crosslinking provided by salt bridges and generate electrostatic repulsion, respectively. The modulus and UTS increase for higher concentrations, in spite of the lower pH and higher ionic strength, due to the formation of effective iron-ligand crosslinking points, as will be demonstrated below.

Table 4.1. Modulus, ultimate tensile strength (UTS) and strain at fracture (SF) of the different BPH films investigated (average \pm standard deviation for $N \geq 5$).

Film pre-conditioning	Metal addition (mM)	Modulus (MPa)			UTS (MPa)			SF (mm/mm)		
Pristine (pH 10.5)	-	1.7	\pm	0.5	0.7	\pm	0.2	0.5	\pm	0.1
	Na^+ 500	3.3	\pm	0.5	1.6	\pm	0.4	0.7	\pm	0.1
	Ca^{2+} 500	5.8	\pm	0.5	2.7	\pm	0.4	0.63	\pm	0.07
	Fe^{3+} 500	28	\pm	6	4.9	\pm	0.6	0.8	\pm	0.1
pI (pH 4.5)	-	9	\pm	2	2.6	\pm	0.5	0.7	\pm	0.1
	Na^+ 500	7	\pm	2	3.0	\pm	0.8	0.7	\pm	0.2
	Ca^{2+} 500	8	\pm	2	2.8	\pm	0.6	0.7	\pm	0.1
	Fe^{3+} 0.05	6.0	\pm	0.9	2.1	\pm	0.2	0.75	\pm	0.09
	Fe^{3+} 0.5	8	\pm	2	2.5	\pm	0.5	0.7	\pm	0.1
	Fe^{3+} 5	13	\pm	2	2.4	\pm	0.3	0.61	\pm	0.09
	Fe^{3+} 50	18	\pm	3	3.0	\pm	0.7	0.6	\pm	0.1
Fe^{3+} 500	26	\pm	7	4.5	\pm	0.7	0.6	\pm	0.1	
KCl (pH 1.0)	Ca^{2+} 500	5.5	\pm	0.6	2.4	\pm	0.5	0.7	\pm	0.1

Interestingly, none of the above treatments has a detrimental effect on the strain at fracture (SF, table 4.1) of the BPH films and, as a consequence, their toughness increases.

Indeed, metal ions can form sacrificial bonds in the protein matrix that have a lower strength than covalent bonds. When subjected to mechanical stress, these metal-ligand complexes can yield and dissipate the mechanical energy, thus sparing the covalent bonds from critical failure. This strategy exploited by mussels in the native byssal threads can thus be applied to mussel-derived BPH films to produce materials that are simultaneously stronger, stiffer and tougher.²⁻⁴ However, since the preparation of the BPH films did not preserve the original protein integrity, the multi-level hierarchical assembly and the high orientation found in the native byssus, they remain mechanically weaker even following metal addition. Nevertheless, the elastic moduli of the BPH materials can be tuned over a range that corresponds well to that of soft biological tissues like skin, arterial walls, nerves and cartilage.²⁴

4.4.2 Investigation of the metal-ligand interactions at the molecular scale

Different techniques were used to better understand the effect of metallic ions on the properties of BPH films and to validate the formation of sacrificial bonds. The BPH films have an intrinsic fluorescence which is mostly due to the presence of aromatic moieties, in particular DOPA residues.²³ Figure 4.2 shows that the fluorescence intensity varies with the type of metal ion used to treat the films and especially with the concentration of Fe^{3+} . The fluorescence intensity is similar for the pristine and pI-treated films with or without addition of Na^+ . Similarly, Ca^{2+} only has a weak effect on the fluorescence (very low enhancement). In contrast, a gradual quenching of the fluorescence occurs after incubation in FeCl_3 solutions of increasing concentration, which is a clear visual consequence of the formation of Fe-DOPA chelates. Indeed, it is known that paramagnetic metals like Fe^{3+} can strongly quench the fluorescence of some ligands via intramolecular energy transfer.²⁵

Bright field optical microscopy images show no clear differences between most of the films. Only those treated with FeCl_3 concentration of 5 mM or more were darker as a consequence of Fe^{3+} ions sequestered in the protein matrix and/or of the formation of covalent di-DOPA crosslinks. In fact, the same phenomenon is observed in native byssal threads: fibers treated with citrate, a reducing and chelating agent, become golden-beige while those treated with iron are dark-brown (data not shown). Two concomitant phenomena can lead to the

observed darkening of the films. First, it can be ascribed to the formation of DOPA-Fe³⁺ complexes, which were reported to form within granules in the cuticle covering the fibrous core of the byssus and providing it with a hard but extensible protein-based coating.⁵ Second, Fe³⁺ ions can oxidize the DOPA to generate quinones and semiquinone radicals that can further lead to di-DOPA covalent crosslinks.^{26,27} The propensity of DOPA to be oxidized increases at higher Fe³⁺ concentrations, during long exposure time and in the presence of oxygen, as seen in mussel adhesive proteins.^{26,28} Importantly, both the formation of di-DOPA and Fe-DOPA crosslinks can contribute to the increase in the mechanical performance of the iron-treated films seen in figure 4.1 and table 4.1.

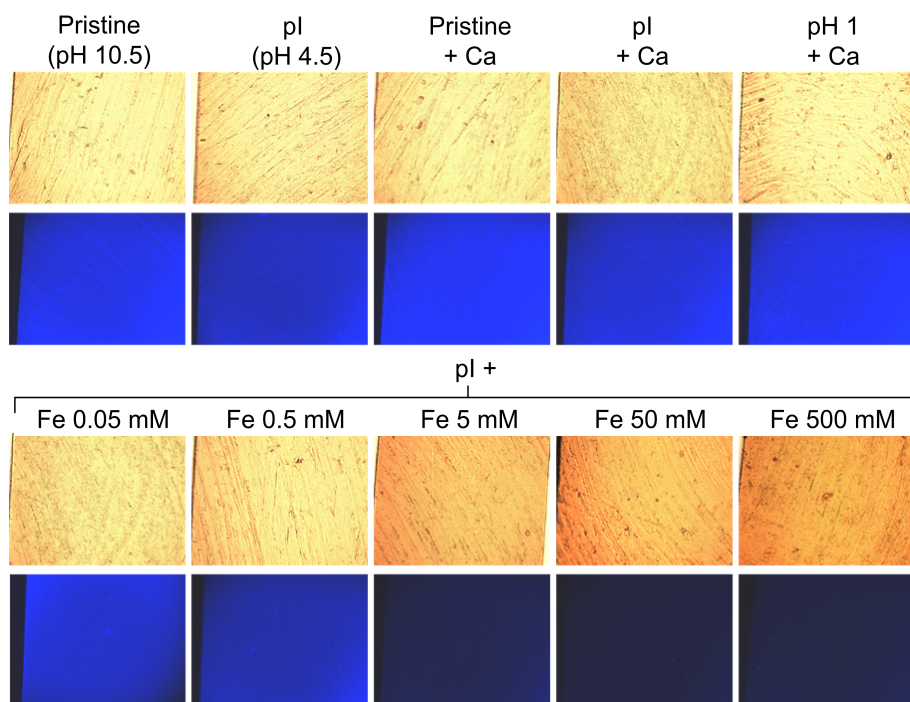


Figure 4.2. Optical and fluorescence microscopy images of BPH films treated in the conditions indicated.

Raman spectromicroscopy was used to investigate the presence of metal-ligand bonding sites within the BPH films. The Raman spectra of pI, sodium- and calcium-treated BPH films are practically identical and therefore do not provide much information on the

interactions of these metal ions (data not shown). However, the spectra displayed in figure 4.3a for films treated with FeCl₃ solutions show resonance-enhanced bands related to Fe-DOPA, DOPA and Fe-Histidine complexes. A broad band centered at 576 cm⁻¹ with shoulders around 631 and 534 cm⁻¹ indicates the formation of DOPA-Fe³⁺ complexes in the BPH films,^{5,17} with a similar overall spectral signature as previously reported for a Fe-DOPA-gelatin biopolymer.²⁹ These bands are absent for films treated at the lowest FeCl₃ concentration of 0.05 mM, small but clear for the 0.5 mM treatment, and prominent at higher concentrations. Bands characteristic of the catechol ring of DOPA also appear around 1266, 1320, 1427 and 1473 cm⁻¹ in the spectra of films treated with Fe³⁺ at concentrations higher than 0.5 mM. These bands were also detected in the resonance Raman spectra of the cuticle of mytilids byssus fibers, in which tris-DOPA-Fe³⁺ complexes are formed as a strategy to enhance the mechanical properties of the threads.⁵ Finally, bands around 1565 and 1602 cm⁻¹ are present for films treated with FeCl₃ solutions of 5 to 500 mM. These bands were reported in the Raman spectra of synthesized histidine-rich mussel peptides and other proteins.^{15,30} Along with the loss of intensity of the band at 1094 cm⁻¹, which is attributable to the protonated form of free histidines and is present only at low iron concentration (0.05 and 0.5 mM),^{30,31} these results are consistent with the formation of Fe-histidine interactions in the BPH films at high Fe³⁺ concentrations. Interestingly, the effect of iron bonding is only detectable in the Raman spectra for BPH films treated with a FeCl₃ concentration ≥0.5 mM, the lowest concentration leading to a strengthening effect (table 4.1). This supports the conclusion that metal-ligand sacrificial bonds play a major role in the improvement of their mechanical properties..

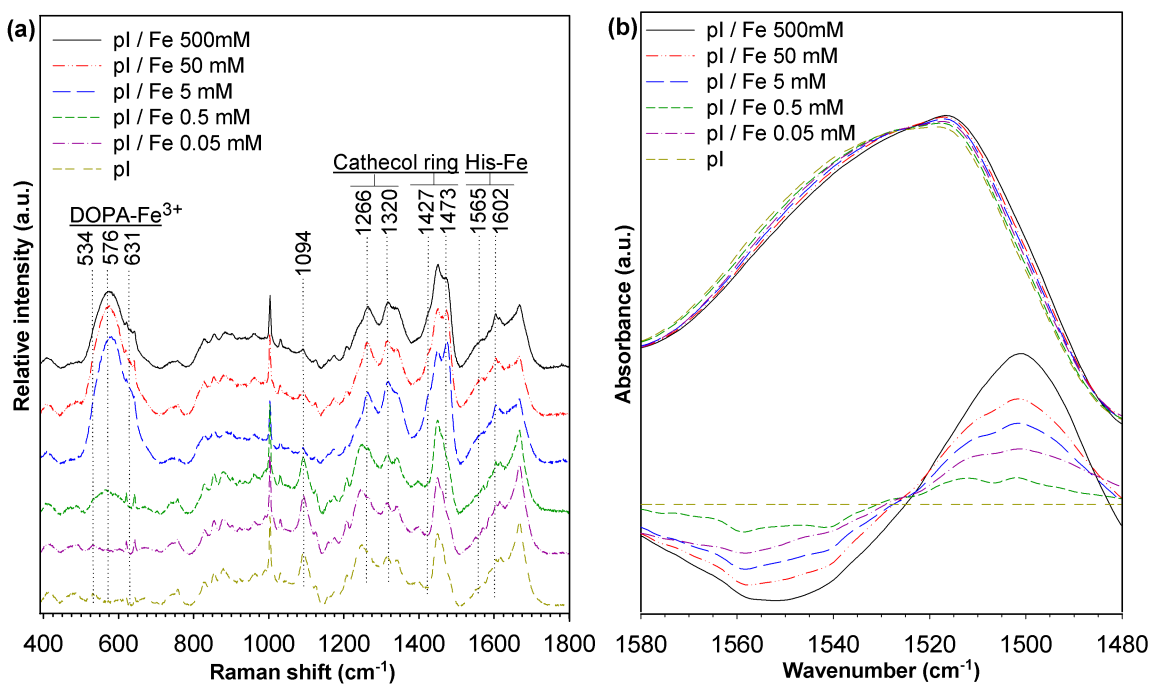


Figure 4.3. (a) Raman spectra of pI-treated BPH films incubated with FeCl₃ solutions of different concentrations and (b) FTIR spectra of the same films in the Amide II region (top) and their difference spectra relative to pI-treated films (bottom).

FTIR spectra of proteins are dominated by the amide-related vibrations from the backbone and provide useful information on their secondary structure.^{32,33} Hence, infrared analysis was performed to monitor the effect of metal addition on the secondary structure within the BPH films. The FTIR spectra in the region from 1750 to 900 cm⁻¹ were very similar for all the materials (figure 4.S1 in the Supporting Information), indicating that metal treatments did not affect the secondary structure. This negative result is significant since it indicates that the variation of the mechanical performance of the films is mostly related to the interactions of amino acids ligands with the incorporated metals, not to structural changes of the proteins. Nevertheless, the formation of metal ligand interactions can be detected as slight changes in band shape. Figure 4.3b shows the FTIR spectra and the difference spectra in the Amide II band range for pI-treated films incubated in solutions of various iron concentrations. An increased intensity of components around 1515 and 1500 cm⁻¹ and a loss of intensity

between 1580 and 1525 cm^{-1} is recorded with increasing FeCl_3 concentration. A component around 1515 cm^{-1} was previously reported for the protonated tyrosine side chain (Tyr-OH) while a component around 1500 cm^{-1} was assigned to its deprotonated state (Tyr-O⁻).³⁴ Tyrosine being similar to DOPA (two hydroxyls for the DOPA instead of one for the Tyr), the enhancement of these bands in the spectra of the FeCl_3 treated BPH films may be due to Fe-DOPA interactions, as observed by Raman spectroscopy. Free carboxylate groups from aspartate and glutamate have infrared absorption bands around 1575 and 1560 cm^{-1} , respectively.³³ These bands may shift +60/-40 cm^{-1} upon cation chelation.³³ The loss of absorbance in this region seen in figure 4.3b could thus be linked to the Fe-carboxylate interactions at higher iron concentration. Calcium treatment had much less effect on the FTIR spectra (figure 4.S2).

Even though these spectroscopy measurements do not provide quantitative information about the number and geometry of metal-ligand bonding sites, they clearly corroborate the propensity of Fe^{+3} to interact with DOPAs, histidines and carboxylate groups in the BPH films. These results are in line with the improved mechanical performance (table 4.1) provided by Fe^{3+} compared to Ca^{2+} and Na^+ , for which no spectroscopic evidence of interaction was detected.

4.4.3 Mechanical performance and self-healing behavior under cyclic loads

Since functional biomaterials often undergo repetitive stress-induced deformation during their practical use, their ability to maintain or recover their mechanical properties must be investigated and optimized. As a biomimetic approach to byssus and to better understand the impact of metal ions, we investigated the mechanical properties of the BPH films under uniaxial tension cycles. Cycling the materials with strain increments and without recovery time between the cycles was first performed as shown in figure 4.S3 and described in the Supporting Information. Similar to the native byssal threads,¹⁰ the BPH materials exhibited a viscoelastic behavior with a rubber-like Mullins softening effect.³⁵ However, since sacrificial bonds in the byssus are known to procure time-dependent self-healing of the mechanical properties, we investigated in detail the effect of recovery time on the materials properties.

4.4.3.1 Salt bridges as sacrificial bonds for the self-healing of BPH films

The pI-treated films were first cycled in a water bath or in a bath filled with a 500 mM NaCl solution to elucidate if salt bridges between charged amino acids can act as sacrificial bonds that procure a self-healing behavior to the byssus-derived materials. Representative curves in figure 4.4 show the initial deformation cycle, a second cycle without recovery ($t = 0$ min) and a cycle after a 120 min recovery time. In both distilled water and 500 mM NaCl baths, the samples stretched without recovery only possess ~60 % of their initial modulus and initial toughness, corresponding to the instantly recoverable elastic component. This 40 % loss can be explained in part by the presence of kinetically trapped domains formed during the protein self-assembly leading to the self-standing BPH films. These domains increase the stiffness of the initial films so that their stress-induced disruption and/or reorganization soften the materials. At the same time, the effective crosslinking points formed by salt bridges in the pI-treated films can also rupture under deformation and contribute to the softening observed when stretching the films without recovery ($t = 0$ min).

Figures 4.4 and 4.5 show that the initial loss of modulus and toughness can be partially recovered through a self-healing process when the pI-treated films are cycled in water. Their modulus and toughness gradually recover with resting time, reaching ~80 and 70 % of the initial values, respectively, after 120 min (figures 4.S8b and 4.S9b in SI present the data expressed as percentages of the initial values). In contrast, the films cycled in the NaCl bath show essentially no recovery for the modulus (figure 4.5a) and their toughness only recovers by ~5 % (figure 4.5b) after 120 min of resting time. The main difference between these samples is the capability of the salt bridges to reform (in water) or not (in the NaCl bath) during recovery. When the salt bridges – acting as sacrificial bonds in the pI-treated films – collapse during stretching in the NaCl bath, Na^+ and Cl^- ions can interact with the freed negatively and positively charged amino acids, respectively. This screening prevents their reassembly and explains the absence or very limited recovery of modulus, toughness and strength (stress at maximum extension, see table 4.S1). Figure 4.5c shows that the mechanical work hysteresis decreases rapidly and then stays constant for the films cycled in the NaCl bath because the softening effect is combined with a low permanent set (irrecoverable strain observed after retraction in figure 4.4). On the other hand, the films cycled in water show a

slower but gradual decrease of the work hysteresis because their increasing modulus is combined with a constant stress at maximum extension and a larger permanent set. The larger number of sacrificial bonds regenerated in the water bath provides a higher strength that opposes to the elastic restoring force of the protein network during retraction of the films, and thus leads to the larger permanent set observed in figure 4.4 for films cycled in water.

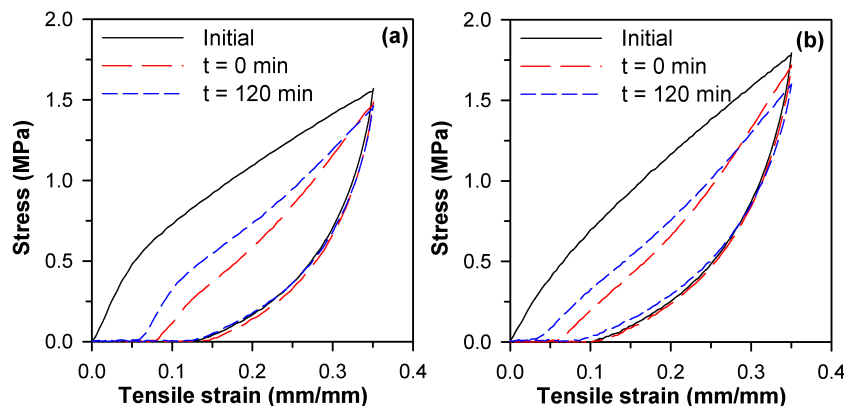


Figure 4.4. Representative cyclic tensile testing curves for the pI-treated films stretched in (a) a water bath and (b) a bath containing 500 mM NaCl.

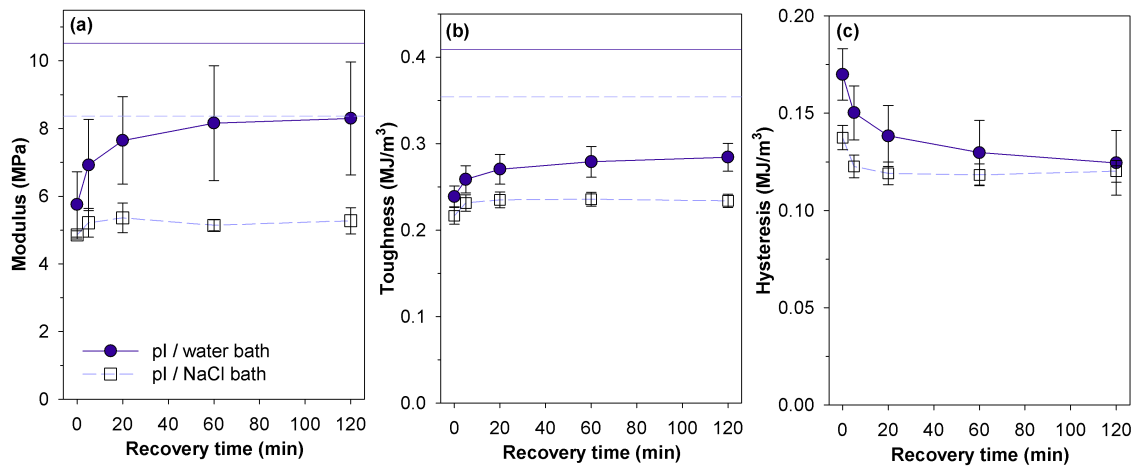


Figure 4.5. Modulus (a), toughness (b), and work hysteresis (c) of pI-treated BPH films measured during cyclic tensile deformation in distilled water or in a 500 mM NaCl solution. Values are reported for the initial stress-strain curves (reference horizontal lines) and for films allowed to recover (under no stress) for various times between the deformation cycles.

The results of figures 4.4 and 4.5 confirm that the BPH films treated at their pI contain salt bridges that reinforce the films and act as sacrificial bonds during deformation. Their reassembly, most likely at new positions, during recovery in the water bath, but not in the NaCl solution, thus enable self-healing of the mechanical performance. This interpretation also explains the results for pristine BPH films cycled in distilled water or in a pH 10.5 bath (see figures 4.S4 and 4.S5 in SI). These films should not contain a significant amount of salt bridges due to the dominance of negatively charged amino acids. Cycling in distilled water leads to a gradual recovery of modulus and toughness, with the modulus even becoming larger than that of the initial sample after 120 min of recovery thanks to the formation of more salt bridges due to gradual shift of pH from 10.5 in the pristine film to closer to the BPH pI (4.5) upon cycling. In contrast, no recovery is observed in the pH 10.5 bath since salt bridges cannot form. Hence, the regeneration of salt bridges or the creation of new ones is only possible in the absence of a high concentration of screening ions (water bath *vs.* NaCl bath) and if the pH of the surrounding solution is near the pI of the BPH. Interestingly, only films initially containing or forming new salt bridges as sacrificial bonds show a clear yield point in their representative stress-strain curves (see figures 4.4a and 4.S4a). A similar observation was reported for byssal threads treated with EDTA. Removal of ~50 % of the metal ions acting as sacrificial bonds in the native byssus led to the disappearance of the yield point and to the loss of its self-healing capability.¹²

4.4.3.2 Effect of Ca^{2+} at various pH

The addition of Ca^{2+} was found to have a negligible effect on the static mechanical properties of the pI-treated films (table 4.1), which was explained by a competition between its bridging effect and the screening of salt bridges between charged amino acids. In contrast, the addition of Ca^{2+} to pristine films (pH 10.5) led to a large increase in modulus and to mechanical properties similar to those of films treated with calcium at pH 1 since there were essentially no salt bridges to be screened. Therefore, the effect of Ca^{2+} on the self-healing behavior of BPH films was studied at various pH. Pristine films (pH 10.5), pI-treated films (pH 4.5) and films pre-incubated at pH 1 were treated with a 500 mM CaCl_2 solution and their

cyclic mechanical properties were studied at a pH equivalent to their pre-treatment. Figure 4.6 displays the modulus, toughness and cyclic work hysteresis after different recovery times (representative stress-strain curves are shown in figure 4.S6). The modulus and the toughness of the pI/calcium films highly recovered after 120 min of resting time (to ~90 and ~80 % of the initial values, respectively) and a yield point is clearly present in the representative stress-strain curves of figure 4.S6a. On the other hand, the pristine/calcium films had a much lower initial modulus which recovered less efficiently while their toughness remained almost fixed at ~70 % of the initial value (the instantly recoverable part). Finally, films pre-treated at pH 1 and cycled in a bath at pH 1 had the lowest initial modulus and toughness and showed no recovery. This behavior highlights the distinct yet complementary effects of Ca^{2+} and salt bridges interactions as recoverable sacrificial bonds on the self-healing of the mechanical performance.

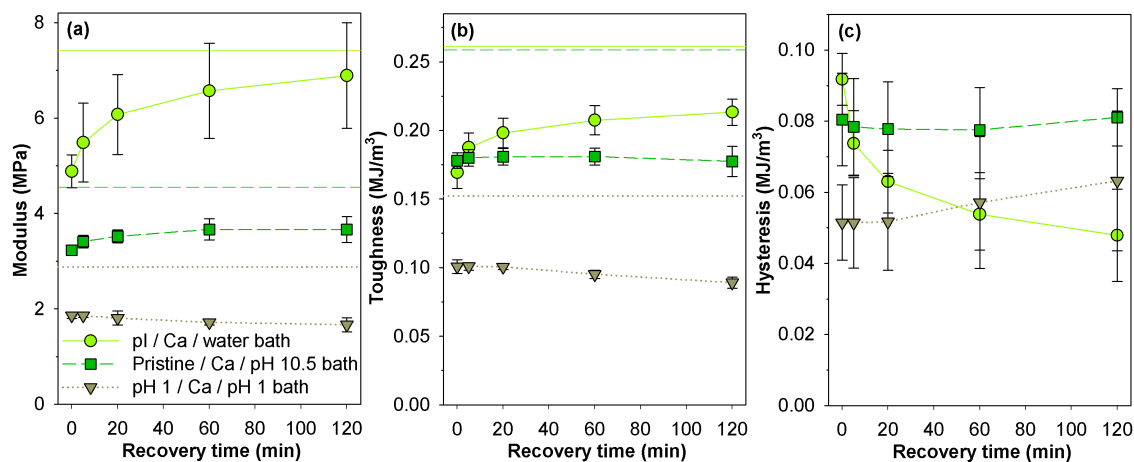


Figure 4.6. Modulus (a), toughness (b) and work hysteresis (c) values of BPH films pre-conditioned at three different pH (pI = 4.5, pristine = 10.5, and 1), further treated with 500 mM CaCl_2 and measured under cyclic tensile deformation in a bath at a pH similar to their pre-treatment. Values are reported for the initial stress-strain curves (reference horizontal lines) and for films allowed to recover (under no stress) for various times between the deformation cycles.

The self-healing behavior of the pI/calcium films cycled in water can further be observed in figure 4.6c by their decreasing work hysteresis with recovery time. In contrast, the pristine/calcium films cycled at pH 10.5 maintained constant hysteresis values and the pH 1/calcium films showed a gradual softening upon cycling (increasing work hysteresis). These results can be attributed to the gradual regeneration of sacrificial bonds in the pI/calcium films and to the release of calcium for the pH 1/calcium films, as reported at acidic pH ($\text{pH} \leq 3-5$) for calcium-induced gelification of carboxylate-rich biopolymeric systems such as alginate³⁶ and soy proteins³⁷. Similar results were observed on native byssal threads and histidine-rich mussel peptides treated at acidic pH,^{10,15} where the loss of mechanical performance and of the self-healing capability was associated to the protonation of histidines that hindered the metal-ligand interactions.

Calcium is able to bind to a large number of ligands with irregular and distorted geometries and the nature of the bonding is essentially ionic.^{38,39} It is thus assumed to form complexes that do not constrain the fluxional behavior of the protein network as much as a later transition metal would. The diffusion of calcium ions in the protein matrix might also contribute to a ligand exchange in order to attain the most favorable bonding configuration, as opposed to salt bridges that require reorganization of the protein network to form energetically optimized interactions. This can explain the propensity of calcium ions to increase the initial stiffness of the BPH films, but to only slightly affect the recovery. Forming sacrificial bonds using Ca^{2+} ions is an avenue to consider for controlling the mechanical properties of BPH films, but the pH of the environment must be carefully adjusted in order to reach the desired result.

4.4.3.3 Effect of Fe^{3+} concentration

Figure 4.7 shows the impact of Fe^{3+} ions on the self-healing behavior of pI-treated BPH films. As established in figure 4.1 and table 4.1, a greater concentration leads to much higher initial modulus and toughness in the representative cyclic curves of figure 4.S7. A yield point is clearly seen for all the conditions, in line with the strengthening effect of metal ions as sacrificial bonds reported for the native byssus.^{10,12,13} Results summarized in figure 4.7 show

that the nominal values of modulus, toughness and work hysteresis at $t = 0$ min, i.e. without recovery time after the first deformation cycle, increase with Fe^{3+} concentration, and that gradual recovery occurs with resting time for all concentrations. However, as highlighted in figures 4.S8d and 4.S9d, the percentage of modulus and toughness recovered decreases with an increasing FeCl_3 concentration. Figure 4.7c and 4.S9d also shows that a higher percentage of the work energy relative to the initial cycle can be retrieved between the cycles for the lower iron concentrations than for the higher concentrations. Nevertheless, it should be emphasized that all the Fe^{3+} -treated films retrieved 80 % or more of their initial modulus and 60 % or more of their initial toughness after 120 min of recovery (figures 4.S8d and 4.S9d) such that their mechanical properties after cycling remain higher than those of films treated in other conditions. For instance, after 120 min of recovery, the modulus of FeCl_3 -treated films ranges between 7 and 25 MPa, depending on the Fe^{3+} concentration, as compared to ~ 7 and ~ 8 MPa at best for pI/Ca and pI-treated films, respectively. This emphasizes the capability of Fe^{3+} to form sacrificial bonds that promote a concentration dependent self-healing capability and a high level of stiffening and toughening to the films.

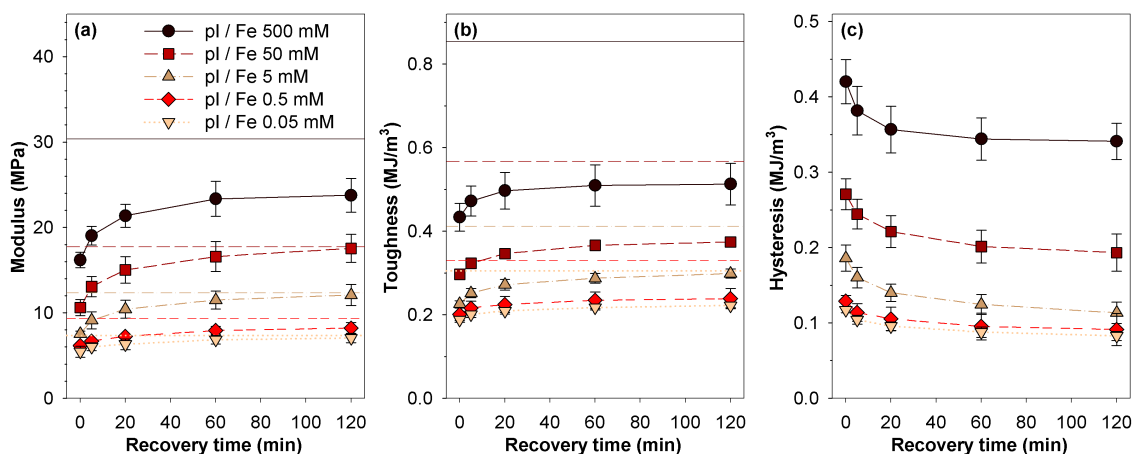


Figure 4.7. Modulus (a), toughness (b) and work hysteresis (c) values of pI pre-treated BPH films treated with various FeCl_3 concentrations and measured during the cyclic tensile deformation in a water bath. Values are reported for the initial stress-strain curves (reference horizontal lines) and for films allowed to recover (under no stress) for various times between the deformation cycles.

The decreasing recovery relative to the initial films observed with increasing FeCl_3 concentration can be explained by the elastic protein network restoring forces and by the effect of Fe^{3+} concentration on the balance of sacrificial bonds between salt bridges and Fe-ligand complexes. Fluorescence microscopy, Raman and FTIR spectroscopy (figures 4.2 and 4.3) showed no detectable Fe-ligand interactions at the lowest FeCl_3 concentration (0.05 mM) while Fe-DOPA and Fe-His bonds were observed at higher concentration (≥ 0.5 mM). Salt bridges therefore dominate at low FeCl_3 concentration, making these films weaker than those with a higher Fe^{3+} concentration but improving their modulus and toughness recovery because of the easier diffusion of the polypeptides chains that are not constrained by Fe-ligand crosslinks.

A recent study on the self-healing of the distal portion of native byssal threads suggested that the elastic protein framework would recover faster than the metal-ligand sacrificial bond could reform.³ Following this rapid protein refolding, a ligand exchange between the various metal mediated sacrificial bonds was associated to the final step of the time-dependent self-healing.⁴ This rearrangement of the Zn-histidines bonds would enable to reach a more stable state in the energy landscape of the byssus system.⁴ Therefore, in our system, the fast initial recovery ($t = 0$ min) of the elastic protein framework and of the salt bridges would first bring the displaced amino acid ligands close to their original register, and then allow the reformation of the metal-ligand sacrificial bonds. When increasing the FeCl_3 concentration, the initial rapid rearrangement of the protein network would become hindered by the higher probability of forming Fe-ligand crosslinking points at new positions in the deformed protein network. These regenerated sacrificial bonds would then act like kinetic traps and partially prevent the entropy-driven modulus recovery. This is in line with the observation of a greater permanent set for the films treated with a higher concentration of FeCl_3 . Ultimately, as a biomimetic approach to native byssus, the formation of sacrificial bonds using iron increases the initial mechanical performances and provides a self-healing behavior to the BPH materials.

4.5 Conclusion

The bio-derived materials presented in this study retain some of the interesting features of native mussel byssus when subjected to a mechanical stress following the addition of metallic ions. Treatment of the byssus protein hydrolysate (BPH) films at their pI to create salt bridges and/or using multivalent metals found in byssal threads, i.e. Ca^{2+} and Fe^{3+} , was shown to create sacrificial bonds that increase the stiffness and strength of the materials without any detrimental effect on their extensibility, thus also increasing their toughness. A time-dependent self-healing behavior of the mechanical performances was found under cyclic uniaxial tensile testing. A treatment at the pI or the addition of Ca^{2+} to the films slightly enhanced their mechanical performance and recovery, but the addition of Fe^{3+} provided a much stronger effect that allowed to tune both the nominal values of the mechanical properties and their recovery rate. Spectroscopy experiments showed the existence of numerous Fe-ligand bonding sites, in contrast with Na^+ and Ca^{2+} , which, along with their more covalent nature, help explain this higher strengthening effect. Overall, this study showed that BPH-based films have broadly tunable and self-healing mechanical properties following metallic ions addition in controlled conditions, a quality needed for applications involving repetitive stress or motions like in the field of biomechanics or prosthesis development.

4.6 References

1. G. E. Fantner, E. Oroudjev, G. Schitter, L. S. Golde, P. Thurner, M. M. Finch, P. Turner, T. Gutsman, D. E. Morse, H. Hansma, P. K. Hansma, *Biophys. J.*, 2006, **90**, 1411-1418.
2. E. Degtyar, M. J. Harrington, Y. Politi, P. Fratzl, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 12026-12044.
3. S. Krauss, T. H. Metzger, P. Fratzl, M. J. Harrington, *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 1520-1528.
4. C. N. Schmitt, Y. Politi, A. Reinecke, M. J. Harrington, *Biomacromolecules*, 2015, **16**, 2852-2861.

5. M. J. Harrington, A. Masic, N. Holten-Andersen, J. H. Waite, P. Fratzl, *Science*, 2010, **328**, 216-220.
6. J. H. Waite, H. C. Lichtenegger, G. D. Stucky, P. Hansma, *Biochemistry*, 2004, **43**, 7653-7662.
7. T. Hassenkam, T. Gutsman, P. Hansma, J. Sagert, J. H. Waite, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 1351-1355.
8. A. Hagenau, P. Papadopoulos, F. Kremer, T. Scheibel, *J. Struct. Biol.*, 2011, **175**, 339-347.
9. A. Hagenau, H. A. Scheidt, L. Serpell, D. Huster, T. Scheibel, *Macromol. Biosci.*, 2009, **9**, 162-168.
10. M. J. Harrington, J. H. Waite, *J. Exp. Biol.*, 2007, **210**, 4307-4318.
11. J. M. Lucas, E. Vaccaro, J. H. Waite, *J. Exp. Biol.*, 2002, **205**, 1807-1817.
12. E. Vaccaro, J. H. Waite, *Biomacromolecules*, 2001, **2**, 906-911.
13. M. J. Harrington, H. S. Gupta, P. Fratzl, J. H. Waite, *J. Struct. Biol.*, 2009, **167**, 47-54.
14. K. Bertoldi, M. Boyce, *J. Mat. Sci.*, 2007, **42**, 8943-8956.
15. S. Schmidt, A. Reinecke, F. Wojcik, D. Pussak, L. Hartmann, M. J. Harrington, *Biomacromolecules*, 2014, **15**, 1644-1652.
16. Z. Xu, *Sci. Rep.*, 2013, **3**, 2914-2920.
17. N. Holten-Andersen, M. J. Harrington, H. Birkedal, B. P. Lee, P. B. Messersmith, K. Y. Lee, J. H. Waite, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, **108**, 2651-2655.
18. D. G. Barrett, D. E. Fullenkamp, L. He, N. Holten-Andersen, K. Y. C. Lee, P. B. Messersmith, *Adv. Funct. Mater.*, 2013, **23**, 1111-1119.
19. D. E. Fullenkamp, L. He, D. G. Barrett, W. R. Burghardt, P. B. Messersmith, *Macromolecules*, 2013, **46**, 1167-1174.
20. E. Degtyar, B. Mlynarczyk, P. Fratzl, M. J. Harrington, *Polymer*, 2015, **69**, 255-263.
21. F. Biette, C. Pellerin, I. Marcotte, *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 6378-6386.
22. M.-O. Seguin-Heine, A.-A. Lachance, B. Genard, B. Myrand, C. Pellerin, I. Marcotte, R. Tremblay, *Aquaculture*, 2014, **426-427**, 189-196.

23. N. Holten-Andersen, T. E. Mates, M. S. Toprak, G. D. Stucky, F. W. Zok, J. H. Waite, *Langmuir*, 2009, **25**, 3323-3326.
24. E. Vatankhah, D. Semnani, M. P. Prabhakaran, M. Tadayon, S. Razavi, S. Ramakrishna, *Acta Biomater.*, 2014, **10**, 709-721.
25. T. D. Waite, F. M. M. Morel, *Anal. Chim. Acta*, 1984, **162**, 263-274.
26. M. J. Sever, J. T. Weisser, J. Monahan, S. Srinivasan, J. J. Wilker, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 448-450.
27. J. J. Wilker, *Nat. Chem. Biol.*, 2011, **7**, 579-580.
28. J. J. Wilker, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2010, **14**, 276-283.
29. Y. Chan Choi, J. S. Choi, Y. J. Jung, Y. W. Cho, *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 201-209.
30. H. Takeuchi, *Biopolymers*, 2003, **72**, 305-317.
31. K. Hasegawa, T.-a. Ono, T. Noguchi, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 4253-4265.
32. M. Jackson, H. H. Mantsch, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1995, **30**, 95-120.
33. A. Barth, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, **1767**, 1073-1101.
34. A. Barth, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2000, **74**, 141-173.
35. J. Diani, B. Fayolle, P. Gilormini, *Eur. Polym. J.*, 2009, **45**, 601-612.
36. K. I. Draget, O. Smidsrød, G. Skjåk-Bræk, in *Polysaccharides and polyamides in the food industry: properties, production, and patents*, eds. A. Steinbüchel, S. K. Rhee, Wiley-VCH Verlag GmbH & CO. KGaA, Weinheim, 2005, vol. 1, ch. 1, p. 30.
37. R. D. Kroll, *Cereal Chem.*, 1984, **61**, 490-495.
38. M. M. Harding, M. W. Nowicki, M. D. Walkinshaw, *Crystallogr. Rev.*, 2010, **16**, 247-302.
39. M. M. Harding, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2000, **56**, 857-867.

4.7 Supporting information

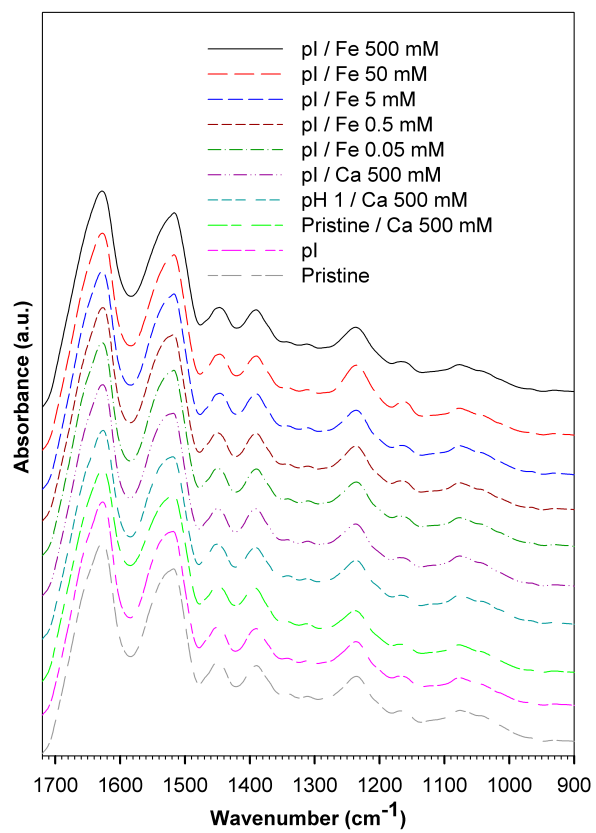


Figure 4.S1. FTIR spectra of BPH films treated in the various conditions presented in this study.

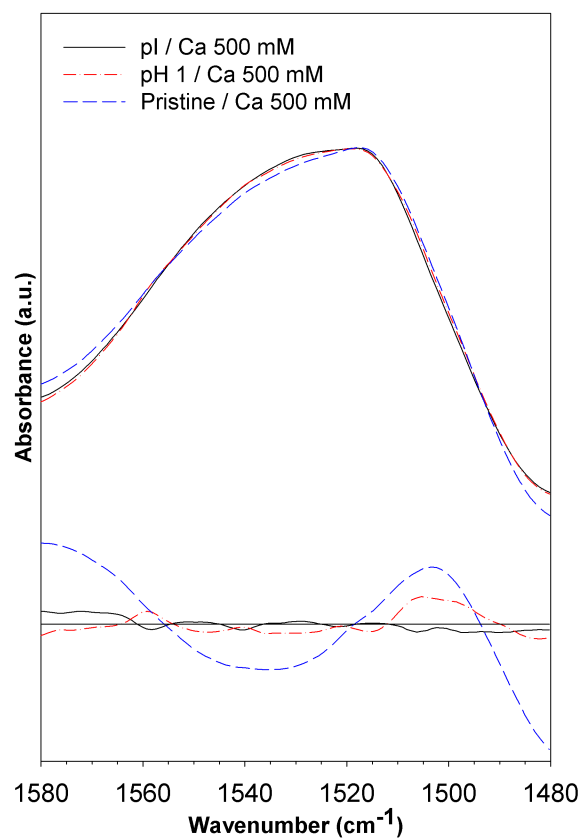


Figure 4.S2. FTIR spectra in the Amide II region of the pristine films, pI-treated films and pH 1 pre-treated films further incubated with 500 mM CaCl₂.

Mechanical performance and self-healing behavior under cyclic loads

Cyclic mechanical properties without recovery: Mullins effect

Cyclic uniaxial testing with strain increments was first performed on the BPH films to avoid as much as possible the contribution of the time-dependent recovery of the mechanical performance. Figure 4.S3 displays the results obtained for a pI-treated films and a 500 mM FeCl₃ treated film. Interestingly, the BPH films exhibit a Mullins softening effect similar to the one observed in native byssus¹ and elastomeric (viscoelastic) rubbers.²

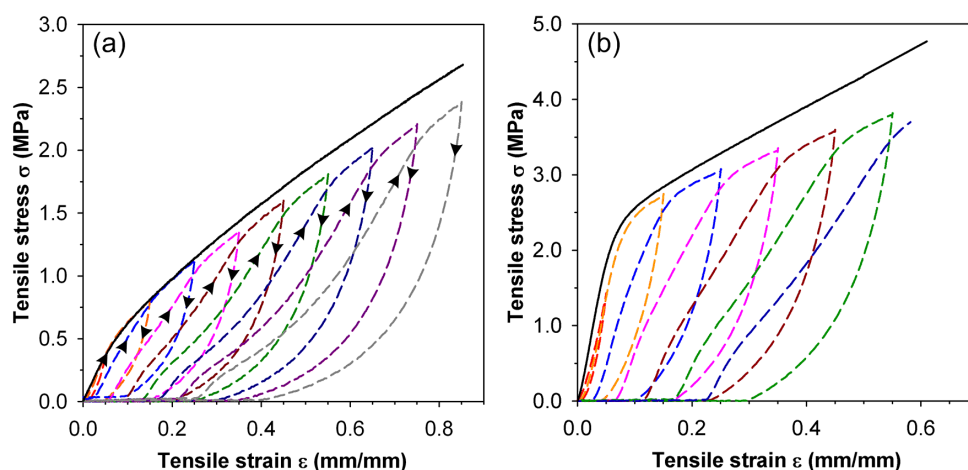


Figure 4.S3. Overlay of an uniaxial stress-strain experiment (black curve) and of a cyclic experiment with incrementing strain (colored dashed curves) performed on (a) a pI-treated BPH film and (b) a 500 mM FeCl₃ treated film in a water bath at 37 °C.

Softening clearly occurs for strains lower than the maximum strain previously applied and the material's response follows the monotonous uniaxial stress-strain curve when the subsequent strain exceeds it.² Each strain increment also generates a higher hysteresis of the maximum stress when compared to the previous cycle. The conformational entropy of the protein network gradually increases after every cycle as the kinetically trapped domains in the materials adopt a more favorable orientation with a lower free energy, but the main part of the process happens during the first cycle. Hard segments within the proteins can also reorganize to prevent catastrophic failure by distributing the stress over an optimum number of covalent

bonds.³ These processes are eased by the presence of a large fraction of water in the swollen samples that acts as a plasticizer and provides mobility to the chains. All these phenomena can contribute to softening of the materials.

Salt bridges as sacrificial bonds for the self-healing of BPH films

Figure 4.S4 displays three deformation cycles (initial, without recovery and with a 120 min recovery time) performed on the pristine films in two different conditions, i.e. in distilled water (pH \sim 5.5) or in a buffer at pH 10.5. The initial curves and those without recovery ($t = 0$ min) are similar for both conditions and show a large hysteresis between these cycles. However, after 120 min of recovery, the pristine films in the water bath (figure 4.S4a) exhibit a significant self-healing while those in the pH 10.5 bath only show an even larger hysteresis relative to the initial cycle.

The pristine films, which were formed at pH 10.5, have low initial modulus and toughness as a consequence of charge repulsion inside the anionic protein matrix (table 4.1 of the main text). Figures 4.S5a and 4.S8a show that only \sim 60 % of the initial modulus is recovered after the first cycle, a behavior mostly attributable to the instantly recoverable part of the elastic components within the pristine BPH films.

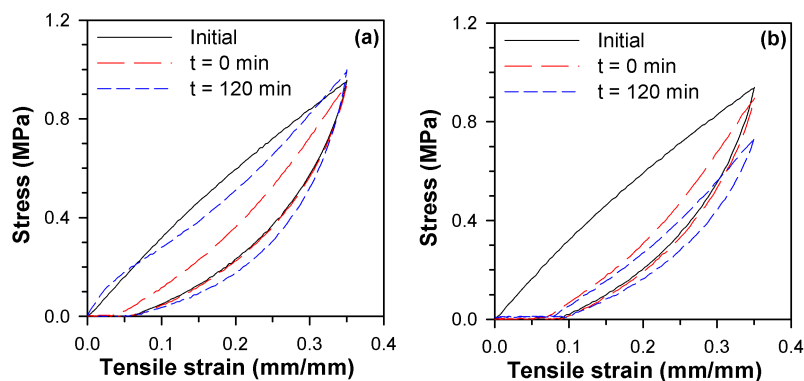


Figure 4.S4. Cyclic tension testing of pristine BPH films in (a) a distilled water bath and (b) a pH 10.5 buffer bath.

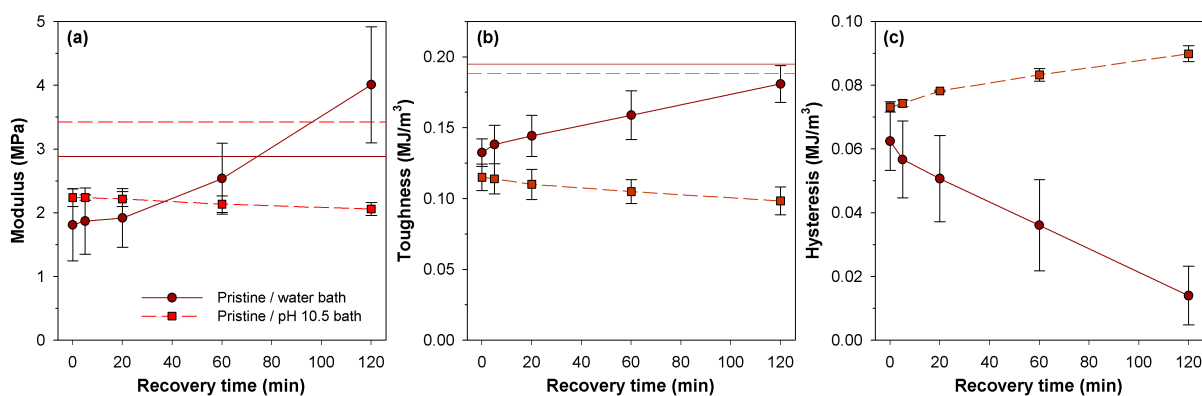


Figure 4.S5. Modulus (a), toughness (b) and work hysteresis (c) values measured during the cyclic tensile deformation of pristine BPH films in distilled water or in a pH 10.5 bath. Values are reported for the initial stress-strain curve and for films allowed to recover (under no stress) for various times between the deformation cycles.

Effect of calcium addition at various pH

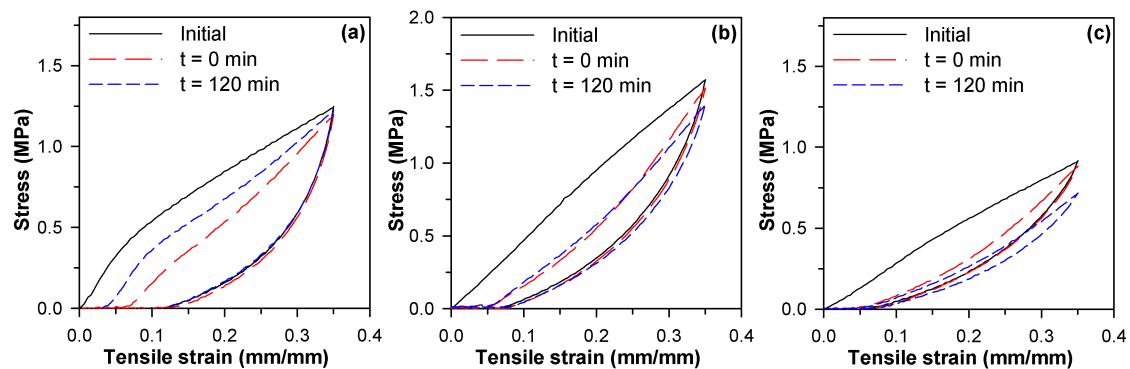


Figure 4.S6. Representative cyclic tensile testing curves for BPH films treated in a 500 mM CaCl₂ solution, for (a) pI-treated films stretched in a distilled water bath, (b) pristine films stretched in a pH 10.5 bath, and (c) pH 1 pre-treated films stretched in a pH 1 bath.

Effect of FeCl₃ concentration

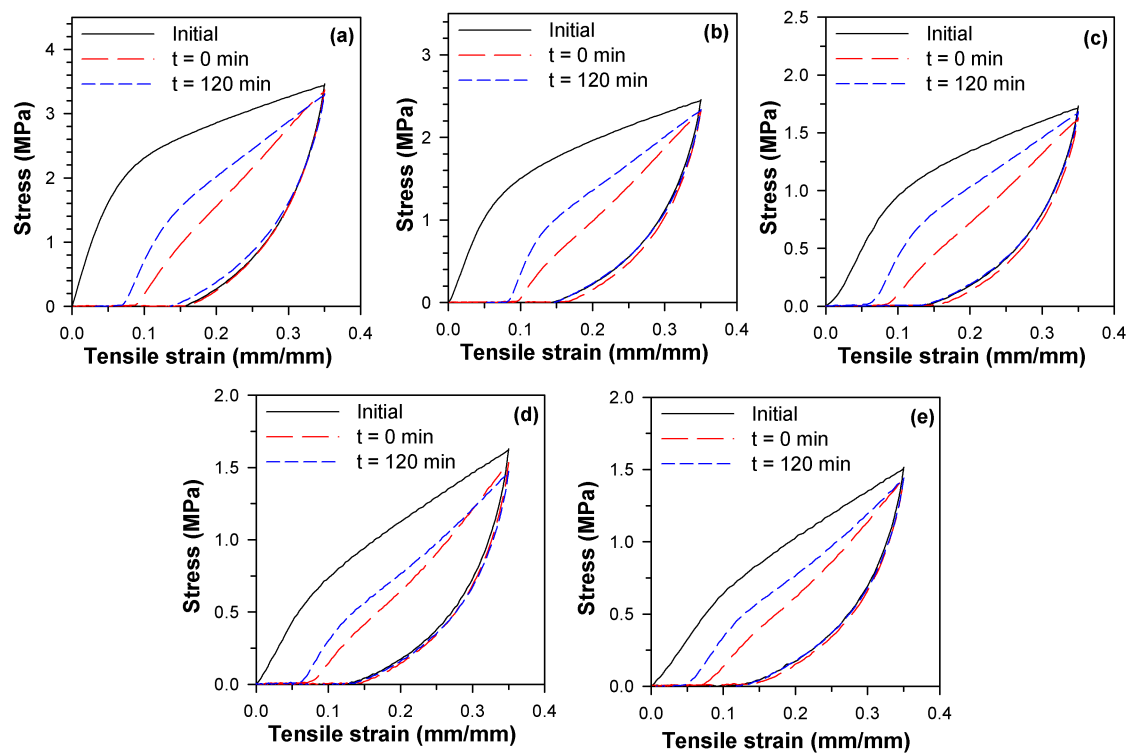


Figure 4.S7. Representative cyclic tensile testing curves for pI-treated BPH films further treated with FeCl₃ solutions of (a) 500 mM, (b) 50 mM, (c) 5 mM, (d) 0.5 mM and (e) 0.05 mM. All samples were stretched in a distilled water bath.

Recovery results expressed as percentages of the initial values

Table 4.S1. Stress recovery percentage at maximum strain (35 %), after different recovery times, for the BPH materials tested by cyclic uniaxial tensile deformation.

Time between cycles (min)	Pre-conditioning											
	Pristine	Pristine	pl	pl	pl	Pristine	KCl pH 1	pl	pl	pl	pl	pl
	Salt addition											
	-	-	-	-	Ca ²⁺	Ca ²⁺	Ca ²⁺	Fe ³⁺ 0.05 mM	Fe ³⁺ 0.5 mM	Fe ³⁺ 5 mM	Fe ³⁺ 50 mM	Fe ³⁺ 500 mM
	Bath filling											
Buffer pH 10.5	Distilled Water	Distilled Water	500 mM NaCl	Distilled Water	Buffer pH 10.5	Buffer pH 1	Distilled Water	Distilled Water	Distilled Water	Distilled Water	Distilled Water	Distilled Water
0	95.1 ± 0.3	96.4 ± 0.4	95 ± 1	94 ± 1	96.9 ± 0.9	96.0 ± 0.3	96.4 ± 0.1	95.1 ± 0.2	94.7 ± 0.5	94.2 ± 0.3	96 ± 3	95 ± 2
5	91.5 ± 0.2	94.0 ± 0.1	93 ± 2	92.2 ± 0.9	97 ± 1	93.3 ± 0.9	93.7 ± 1.0	93.6 ± 0.4	92.8 ± 0.8	94.0 ± 0.6	95 ± 4	94 ± 2
20	88 ± 1	93.4 ± 0.3	93 ± 2	90.7 ± 0.9	97 ± 1	92 ± 1	90 ± 1	93.3 ± 0.4	92 ± 2	95.5 ± 0.8	97 ± 5	94 ± 3
60	83 ± 1	95.6 ± 0.4	93 ± 2	89.6 ± 0.8	99 ± 2	91 ± 1	86 ± 3	93.8 ± 0.8	93 ± 3	96.8 ± 0.8	98 ± 4	94 ± 3
120	78.4 ± 0.7	102 ± 1	92 ± 3	89.2 ± 0.5	100 ± 3	89 ± 1	80.5 ± 3.1	94.6 ± 0.8	94 ± 3	97.9 ± 0.7	98 ± 5	93 ± 2

pH of distilled water ~ 5.5

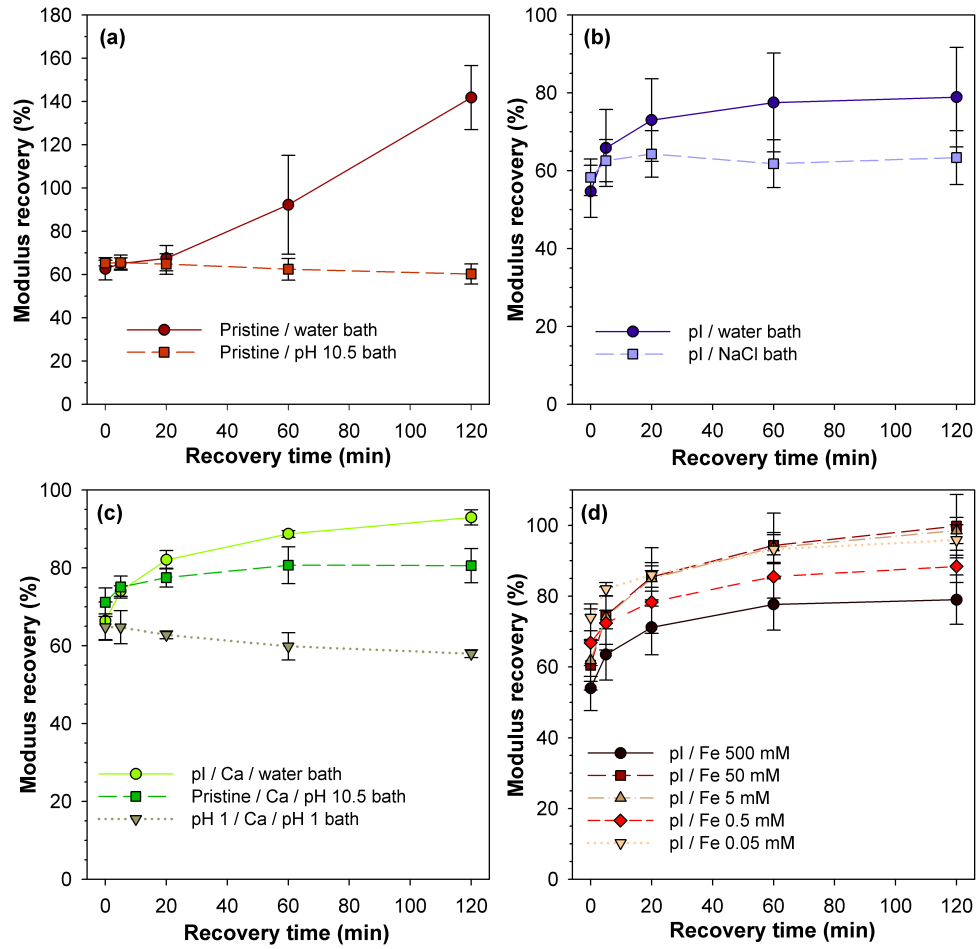


Figure 4.S8. Modulus recovery relative to the initial value for the various recovery times between the uniaxial tensile cycles. Results show the effects of (a) the bath pH on pristine films; (b) the presence of 500 mM NaCl in the testing bath on pI-treated films; (c) bath pH on CaCl₂-treated films; and (d) FeCl₃ treatment at different concentrations on pI-treated films.

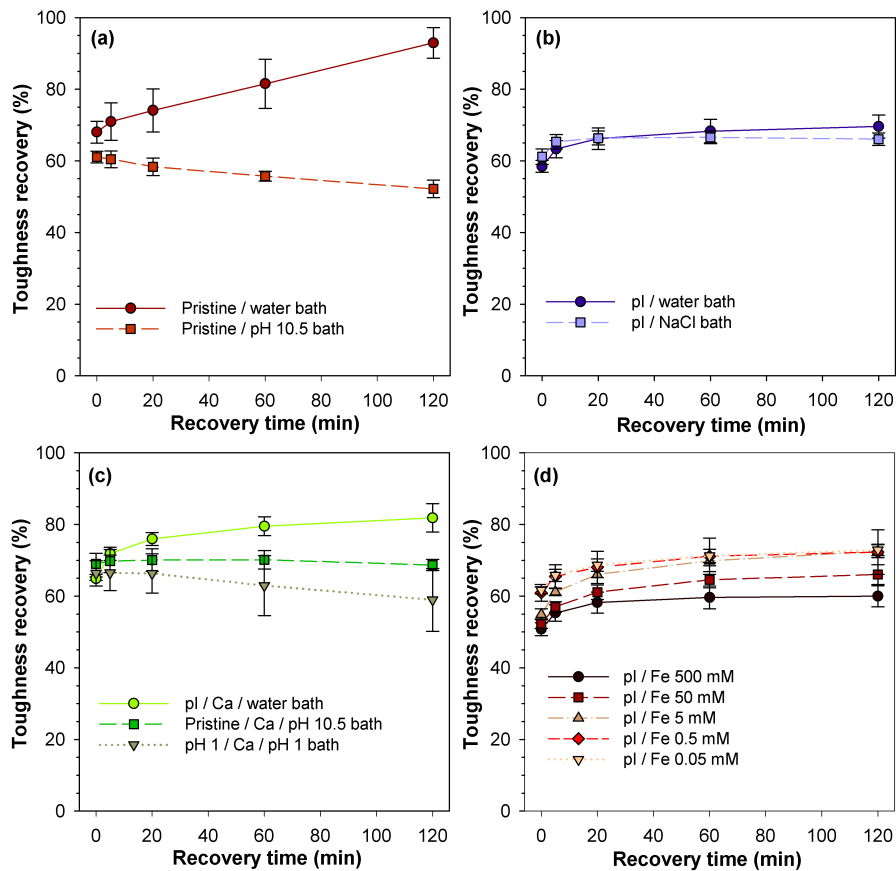


Figure 4.S9. Toughness recovery relative to the initial value for the various recovery time between the uniaxial tensile cycles showing the effects of (a) the bath pH on the pristine films; (b) the presence of 500 mM NaCl in the testing bath on pI-treated films; (c) bath pH on CaCl₂-treated films; and (d) FeCl₃ treatment at different concentrations on pI-treated films.

SI References

1. M. J. Harrington, J. H. Waite, *J. Exp. Biol.*, 2007, **210**, 4307-4318.
2. J. Diani, B. Fayolle, P. Gilormini, *Eur. Polym. J.*, 2009, **45**, 601-612.
3. J. D. Ferry, *Viscoelastic Properties of Polymers, 3rd Edition*, John Wiley & Sons, Inc., 1980.

Chapitre 5 : Conclusion

5.1 Conclusions générales

5.1.1 Extraction des protéines de byssus et mise en forme des matériaux

Les matériaux régénérés à partir de protéines fibreuses extraites de tissus ou de fibres biologiques peuvent posséder des propriétés inédites. Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse était d'extraire les protéines d'une fibre biologique aux propriétés mécaniques impressionnantes, le byssus de la moule, afin de produire une nouvelle gamme de matériaux protéiques. Bien que le byssus soit essentiellement composé de différentes protéines (plus de 90 % de sa masse sèche), leur extraction représentait un défi de taille puisque cette fibre est réticulée de multiples façons, e.g. avec des liens covalents et organo-métalliques.

En 1952, Brown rapportait que ces fibres n'étaient solubles que dans certains acides et bases à température élevée ou suite à un traitement à l'aide d'hypochlorite de sodium.¹ Bien que l'hydrolyse des fibres de byssus dans ces conditions se soit montrée efficace, les extraits obtenus n'ont pas permis de produire des matériaux avec des propriétés intéressantes. Il a toutefois été possible d'obtenir un hydrolysât de protéines avec un rendement de ~15 % (m/m) lors d'une extraction prolongée à froid (4 °C) en milieu basique (NaOH) en présence d'EDTA. L'EDTA permet d'enlever les métaux de la fibre et ainsi d'augmenter le rendement d'extraction, alors que la température plus faible permet de limiter le degré d'hydrolyse des protéines et ainsi de conserver des fragments de protéines de masses élevées (60 à 65 kDa) tel que démontré par SDS-PAGE. La taille de ces fragments correspond bien à la taille des domaines de collagène retrouvés dans les preCols formant les fibrilles au cœur des fibres de byssus.^{2,3} L'hydrolysât de protéines de byssus (BPH) purifié et lyophilisé peut ensuite être remis en solution en milieu aqueux à pH 10.5, puis converti sous forme de film par évaporation lente du solvant, tel que décrit dans le chapitre 2.

Alors que la majorité des matériaux régénérés à partir de protéines nécessitent des traitements additionnels afin d'induire leur insolubilité dans l'eau, les films de BPH deviennent automatiquement insolubles et forment plutôt un hydrogel lorsque submergés. Un

parallèle de biomimétisme peut donc être tracé avec le byssus natif, qui est formé quasi instantanément dans le pied de la moule par un processus similaire au moulage par injection de polymère.^{4,5} Les protéines qui y sont injectées s'auto-assemblent en fibre en quelques secondes et sont ensuite complètement insolubles dans l'eau. La spectroscopie FTIR s'est montrée particulièrement utile afin d'élucider le mécanisme d'auto-assemblage des protéines menant à l'insolubilité des films de BPH dans l'eau. Nous avons déterminé que le processus consiste d'abord en la formation d'un hydrogel riche en triples hélices de collagène/gélatine. Par la suite, l'évaporation lente de l'eau permet l'agrégation des chaînes de polypeptides et mène à la formation de feuillets- β anti-parallèles intermoléculaires. Ces deux structures sont aussi retrouvées à l'intérieur des fibres de byssus tel que démontré précédemment.^{6,7} Ainsi, nous avons attribué l'insolubilité des films de BPH régénérés à la présence de structures secondaires stables agissant comme points de réticulation physique, d'une manière analogue aux fibres de soies riches en feuillets- β anti-parallèles⁸ ou aux gels de collagène contenant des triples hélices.⁹

L'AFM et la SEM ont permis de détecter un réseau de fibrilles de différentes tailles à la surface des films. Bien qu'il n'ait pas été possible de déterminer la structure moléculaire de ces fibrilles à cause de leur faible taille (~10 à 60 nm), nous avons posé l'hypothèse qu'elles se formaient de façon analogue aux fibres de collagène, soit par l'assemblage d'hélices PPII pour former des domaines de triples hélices qui s'agrègent par la suite de façon hiérarchique. Des études futures avec une méthode telle que l'AFM couplée à la spectroscopie infrarouge pourraient certainement nous informer sur la nature de ces fibrilles auto-assemblées.

5.1.2 Effet du pH sur les films de BPH

Les protéines sont des polyampholites et leurs structures et/ou propriétés sont généralement affectées par le pH environnant. Les films de BPH possèdent une grande quantité d'acides aminés chargés (~30 % mol) tel que démontré par analyse du contenu en acides aminés dans le chapitre 2. Une relation a été trouvée entre le degré de gonflement des films et leurs propriétés mécaniques en fonction du pH. Au point iso-électrique du BPH (pI = 4.5), les films ont le degré de gonflement le plus faible, ce qui mène à un hydrogel compact

qui possède un module de Young de ~ 10 MPa et une contrainte à la rupture de ~ 2.5 MPa. Ce phénomène est attribuable aux interactions électrostatiques entre les groupements fonctionnels des chaînes latérales des acides aminés dans le BPH qui agissent comme des points de réticulation effectifs. À pH inférieur ou supérieur au pI, il y a respectivement protonation ou déprotonation de certains acides aminés, ce qui crée de la répulsion électrostatique entre les charges. Les groupements chargés interagissent alors avec des molécules d'eau et le degré de gonflement devient donc plus élevé. Ce phénomène contribue ainsi à diminuer le module de Young jusqu'à ~ 2 MPa et la contrainte à la rupture jusqu'à ~ 0.8 MPa. Cependant, le pH n'affecte pas la déformation à la rupture, qui reste constante avec une valeur ~ 0.7 (mm/mm). De plus, l'effet du pH sur le gonflement et les propriétés mécaniques est réversible, ce qui est un avantage pour des applications où le relargage de molécules actives est un atout, comme dans les formulations pharmaceutiques ou les biomatériaux bioactifs. Enfin, le pH n'affecte pas la structure moléculaire des films telle que déterminée par spectroscopie FTIR. Les propriétés mécaniques des films de BPH en fonction du pH sont donc régies par l'enchevêtrement du réseau de protéines et les interactions entre les acides aminés plutôt que par un changement de structure moléculaire.

Différentes stratégies de réticulation ont été explorées afin de moduler les propriétés mécaniques des films de BPH au-delà de ce qui est possible via le changement de pH, et ainsi d'élargir leur champ d'applications potentielles dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. La première méthode est la réticulation covalente à l'aide du GTA et d'EDC selon les mécanismes décrits à la section 1.3.1 du chapitre 1, et la deuxième est la réticulation non-covalente à l'aide de métaux. Ces deux approches de réticulation sont aussi exploitées dans les fibres de byssus et contribuent substantiellement à leur performance mécanique.

5.1.3 Effet de la réticulation covalente sur les films de BPH

Les réticulations covalentes ont été possibles sur les films de BPH puisqu'ils contiennent ~ 20 % de glutamate et aspartate et ~ 5 % de lysines, des acides aminés nécessaires aux réactions à l'aide de GTA et d'EDC. Le degré de réticulation des films de BPH augmente de 8 à 35 % (groupements amines bloqués) lorsque la concentration d'EDC utilisée passe de

0.1 à 5 mM, suivi d'un plateau à des concentrations d'EDC plus élevées. La réticulation au GTA à une concentration de 2.5 % (v/v) pour une durée de 5 min mène à un degré de réticulation similaire à celle du plateau avec EDC, soit ~38 %. Cependant, un temps de réticulation prolongé à une concentration plus élevée de GTA permet d'atteindre ~80 % de groupements amines bloqués. Cette différence entre le GTA et l'EDC est attribuable à leur mode de réticulation différent. La réaction avec l'EDC n'introduit aucune longueur de chaîne supplémentaire et nécessite donc une mobilité suffisante des chaînes de protéines pour qu'elle se complète. Le GTA introduit plutôt une nouvelle chaîne de 5 carbones et peut aussi réagir avec un seul groupement amine, laissant alors un aldéhyde libre qui doit être bloqué avec une autre molécule pour freiner sa réactivité.

La réaction de réticulation à l'aide de l'EDC permet de faire varier le module de Young entre 2 et 21 MPa et la contrainte à la rupture entre 0.7 et 2.9 MPa, mais mène à une diminution de la déformation à la rupture de 0.4 à 0.24 mm/mm. D'une manière analogue au taux de réticulation, un plateau est obtenu à partir d'une concentration de 5 mM en EDC. À ce plateau, les films deviennent quasi totalement résistants à la dégradation par la collagénase, conservant 95 % de leur masse initiale. La résistance à la dégradation enzymatique est un avantage potentiel en ingénierie tissulaire puisqu'elle permet aux matériaux de conserver leur performance mécanique advenant une implantation *in vivo*. De son côté, la réaction avec le GTA mène à un module de Young et une contrainte à la rupture de 6.5 et 1.1 MPa respectivement, soit plus faible que les valeurs obtenues pour les matériaux réticulés à l'EDC contenant le même nombre de groupements amines bloqués. Il en est de même pour la résistance à la collagénase; les films réticulés au GTA conservent plutôt ~85 % de leur masse initiale, similairement aux films réticulés avec 1 mM de EDC.

La spectroscopie FTIR a permis de détecter une conversion moléculaire inusitée, lors de la réticulation, soit de feuillets- β anti-parallèles intermoléculaires (structures agrégées) vers des structures hydratées de collagène/hélices-PPII. Cette conversion est expliquée par le gonflement des films de BPH dans le milieu réactionnel lors des réactions de réticulation. La réticulation créerait une contrainte interne sur le réseau de protéines gonflé et les zones de protéines agrégées se rompraient alors partiellement, libérant ainsi des hélices PPII libres pouvant former des structures de triple hélice de collagène hydratées. Bien que plus de

structures reliées au collagène soient retrouvées dans les films de BPH suite à la réticulation, leur résistance à la collagénase est tout de même améliorée à cause des nombreux points de réticulation qui empêchent le clivage enzymatique. La réticulation covalente à l'aide de EDC et GTA permet donc de moduler à la fois les propriétés mécaniques et la résistance à la collagénase des films de BPH tout en induisant un changement partiel de structure moléculaire de structures agrégées vers des hélices hydratées de collagène/PPII. Il serait envisageable de coupler le degré de réticulation covalente à des variations de pH afin de moduler les propriétés mécaniques des matériaux sur une gamme plus étendue, ou pour libérer des molécules thérapeutiques qui seraient retenues à l'intérieur de la matrice de protéines.

5.1.4 Liens sacrificiels dans les films de BPH

Dans une optique de biomimétisme du byssus, le chapitre 4 portait sur la formation de liens sacrificiels dans les films de BPH et leurs répercussions sur les propriétés mécaniques statiques et cycliques. Des métaux de différentes valences et communément retrouvés dans le byssus à l'état naturel, soit du Na^+ , Ca^{2+} ou Fe^{3+} ,¹⁰⁻¹² ont été ajoutés aux films de BPH natifs ou pré-traités à leur point isoélectrique ($\text{pI} = 4.5$). Les propriétés mécaniques statiques ont démontré que le module de Young et la contrainte à la rupture peuvent être grandement modulés à la hausse suite à l'ajout des différents métaux ou d'un simple traitement au pI. Un effet beaucoup plus prononcé que les autres traitements a été observé suite à l'ajout de fer à différentes concentrations, permettant d'augmenter le module de 15 fois et la contrainte à la rupture de 7 fois par rapport aux films de BPH natifs. Contrairement à la réticulation covalente, les différents traitements utilisés lors de cette étude n'ont pas affecté la déformation à la rupture des films et ont ainsi mené à leur plus grande ténacité. Cet effet confirme la formation de liens sacrificiels permettant de renforcer les films et de dissiper l'énergie mécanique lors de l'application d'une contrainte, évitant alors leur fracture critique à une faible déformation.

Les propriétés mécaniques cycliques avec un temps de repos entre les cycles ont permis d'étudier le processus d'auto-guérison promu par la présence des liens sacrificiels. L'ajout de sodium ne permet que de légèrement moduler les propriétés mécaniques et leur

auto-guérison par écrantage des charges électrostatiques. La présence de calcium permet d'améliorer les performances mécaniques et l'auto-guérison des films mais seulement à certains pH puisque le caractère des interactions avec les groupements fonctionnels est plus ionique que covalent. Ainsi, l'effet du calcium se rapproche de celui d'un simple traitement au point isoélectrique, qui favorise lui aussi le processus d'auto-guérison lorsque les interactions entre les acides aminés de charges opposées se reforment suite à leur rupture pendant la déformation. Enfin, l'ajout de fer permet de récupérer une grande partie des performances mécaniques lors du repos post-déformation ainsi que de rigidifier les films. Ce phénomène est causé par le caractère plus covalent des liens entre le fer et certains acides aminés. Aussi, tel que détecté grâce aux spectroscopies Raman et FTIR ainsi que par microscopie de fluorescence, le fer interagit avec plusieurs acides aminés, dont les DOPA et les histidines. Ces techniques n'ont pas permis de détecter de changement notable lors des traitements avec les autres métaux, expliquant l'effet nettement plus prononcé du fer sur les performances mécaniques des films de BPH.

Enfin, les études présentées dans cette thèse ont permis de démontrer qu'il est possible d'extraire des protéines du byssus et de les utiliser pour former des films, et ainsi de valoriser cette fibre biologique qui est présentement traitée comme déchet de l'aquaculture. Les films de BPH sont très intéressants puisqu'ils possèdent plusieurs acides aminés chargés et réactifs, ce qui permet de moduler les propriétés mécaniques à l'aide de différents traitements comme la variation de pH, la réticulation covalente et la formation de liens organo-métalliques. D'ailleurs, le module d'élasticité des films a pu être modulé entre 2 et 28 MPa suite aux différents traitements. Ces valeurs concordent très bien avec l'intervalle de modules de plusieurs tissus biologiques tel que présenté à la figure 1.4 du chapitre 1, e.g. veines, artères, cœur, peau et cartilages. Ces résultats valident ainsi la polyvalence des films de BPH et leur haut potentiel d'application en ingénierie tissulaire pour la réparation de tissus mous. Certaines limitations ont cependant été rencontrées durant le projet, ce qui sera souligné dans la section suivante.

5.2 Perspectives

La production de matériaux fonctionnels biomimétiques a évolué rapidement ces dernières années. Les deux types d'approche rencontrées sont le « Bottom-Up », soit de partir de molécules ou de polymères pour former de nouveaux matériaux avec les formes et propriétés désirées, et le « Top-Down », soit de partir d'une structure initialement intéressante et d'en extraire les composantes pour ensuite régénérer des matériaux sous différentes formes. L'approche « Top-Down » s'est montrée efficace avec plusieurs types de ressource biologique pour former des matériaux applicables à l'ingénierie tissulaire, e.g. la fibroïne de soie extraite des cocons de ver à soie¹³ ou le collagène extrait de la peau ou de tendons bovins.¹⁴ Cette méthode a donc été employée dans cette thèse afin de préparer des films à base de protéines extraites du byssus de moule.

Dans le but de produire les matériaux biomimétiques du byssus les plus performants et les plus adéquats pour une application en ingénierie tissulaire, différentes méthodes de confection de matériaux ou de modification de l'auto-assemblage et de la structure du BPH ont été explorées. Des recuits par vapeur de solvants ou à différentes températures et l'utilisation de solvants organiques sur les films n'ont pas eu d'impact sur la structure des protéines et sur la qualité des matériaux. Aussi, la variation du pH des solutions de BPH (pH < 10.5) lors de la formation des films pour contrôler l'auto-assemblage du BPH n'a pas mené à des matériaux de qualité. Pour obtenir des matériaux avec des morphologies variables, diverses méthodes de confection ont été expérimentées incluant la formation d'éponges 3D par lyophilisation, de fibres par électrofilage, et de gels, fibres et billes par mélange ou injection de solutions de BPH dans différents solvants. Dans la majorité des cas, si un matériau était obtenu, il demeurait soluble en milieu aqueux ou possédait des propriétés mécaniques inadéquates pour les applications visées.

Plusieurs autres obstacles ont freiné les efforts pour l'obtention de matériaux à haut potentiel d'application. D'abord, l'approvisionnement en byssus s'est avéré plus difficile que ce qui avait été prévu au départ. L'industrie mytilicole étant soumise aux aléas de la nature et des saisons, la production n'est pas constante. De plus, l'ablation du byssus des moules directement sur les bateaux est devenue une pratique courante afin d'optimiser le temps

d'exploitation; le byssus est alors rejeté à la mer. Ensuite, il a été impossible d'obtenir les protéines de type copolymères blocs retrouvées dans le byssus à leur état pur et en quantité suffisante pour former des matériaux mimant parfaitement la fibre naturelle, possiblement à cause du degré de réticulation très élevé de la fibre. Enfin, tel que stipulé dans le paragraphe précédent, l'extrait de protéines de byssus utilisé dans les études des chapitres 2, 3 et 4 s'auto-assemble dans des conditions bien précises que nous n'avons pas réussi à modifier/contrôler à notre guise jusqu'à maintenant.

Malgré tout, les films de BPH auto-assemblés présentés dans cette thèse sont performants mécaniquement et ont démontré leur biocompatibilité lors de tests de culture cellulaire en présence de fibroblastes NIH/3T3. Donc, outre les problèmes d'approvisionnement en byssus et le rendement de production de BPH et des films, ces matériaux protéiques possèdent un bon potentiel pour des applications en ingénierie tissulaire, même s'ils ne miment pas parfaitement le byssus. Il est important de souligner que les matériaux formés par « top-down » n'ont jamais les mêmes propriétés que la ressource d'origine. Par exemple, la fibroïne de soie extraite des cocons de ver à soie pour la production de matériaux possède un indice de polymolécularité élevé, et les traitements subséquents sur les matériaux formés à partir de cet extrait ne mènent pas à la structure moléculaire et aux propriétés mécaniques retrouvée dans les soies naturelles. Ainsi les perspectives présentées dans la section suivante soulignent d'autres avenues de production de matières premières ainsi que des pistes de réflexion pour la confection de matériaux synthétiques ou biologiques biomimétiques.

5.2.1 Production de peptides et protéines avec capacité d'auto-assemblage

Comme alternative à la production de matériaux protéiques biomimétiques par l'approche « top-down » présentée dans cette thèse, la synthèse de peptides avec des capacités d'auto-assemblage est une approche « bottom-up » présentant plusieurs avantages. Les peptides synthétiques peuvent pallier à la fois les problèmes d'approvisionnement et d'auto-assemblage imprévisibles et difficilement contrôlables décrits plus tôt. Ceci est possible grâce au contrôle de la séquence primaire des acides aminés, des structures secondaires en découlant

ainsi que du caractère amphiphile des peptides synthétiques. Ces caractéristiques permettent l'auto-assemblage en milieu aqueux et ainsi de générer des matériaux avec des formes et textures variables.¹⁵

Les peptides amphiphiles sont une classe de molécules similaires aux surfactants, possédant un domaine hydrophobe composé d'une chaîne alkyle et un domaine hydrophile généralement composé d'acides aminés pouvant interagir entre eux et s'auto-assembler avec des structures secondaires bien définies. Ces peptides amphiphiles peuvent former des micelles cylindriques en milieu aqueux, enfouissant la chaîne alkyle au centre et exposant le domaine peptidique en solution. Le groupe de Stupp a développé plusieurs peptides de ce type tout en y ajoutant d'autres domaines pour faciliter l'auto-assemblage et la stabilisation des structures résultantes et rendre les matériaux biocompatibles et même bioactifs.¹⁵⁻¹⁷ La figure 5.1 représente un de ces peptides et son auto-assemblage en milieu aqueux. Ces peptides possèdent un domaine avec des cystéines permettant de stabiliser et de rigidifier la structure par des liens covalents entre les atomes de soufre (ponts disulfures) suite à leur oxydation. Ces liens sont réversibles par réduction et permettent soit de corriger des imperfections dans la structure ou de revenir aux macromolécules seules. Une phosphosérine est aussi incorporée dans le peptide pour induire la germination de cristaux d'hydroxyapatite (phosphate de calcium) à la surface des fibrilles. Enfin, un groupement RGD peut être ajouté à la fin du peptide pour promouvoir l'adhésion et la croissance des cellules à la surface des fibrilles formées suite à l'auto-assemblage, et ainsi rendre le matériau final à la fois biocompatible et bioactif.

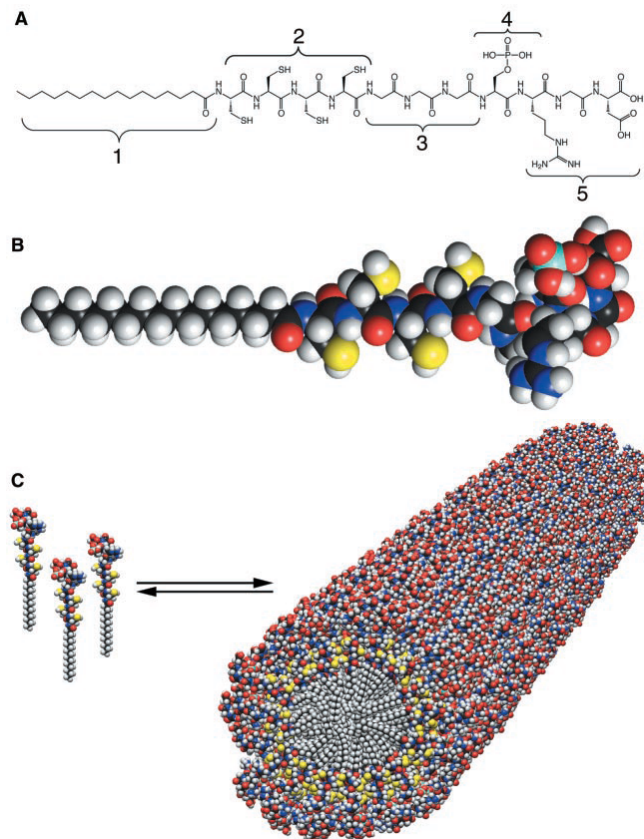


Figure 5.1. Structure d'un peptide amphiphile montrant (a) ses différents domaines et (b) sa représentation en 3D. (c) Schéma de l'auto-assemblage en micelle cylindrique formant un réseau de fibrilles biomimétique de la matrice extra-cellulaire retrouvée dans les os. Reproduite de la référence 16 © 2001 avec la permission de American Association for the Advancement of Science.

Un autre type de peptide avec des capacités d'auto-assemblage en milieu aqueux, mais cette fois sans la présence d'une chaîne alkyle, a été rapporté par Zhang *et al.*^{18,19} Ces peptides longs de 16 acides aminés alternent des motifs hydrophiles ioniques à des motifs hydrophobes. Les acides aminés hydrophiles peuvent porter des charges positives, négatives ou une alternance des deux. La figure 5.2 illustre un type de ces peptides et les niveaux d'assemblage hiérarchique menant au matériau final. Suite à l'assemblage de deux peptides en feuillets- β , une des deux faces expose les motifs ioniques tandis que l'autre côté expose les motifs hydrophobes. Les côtés hydrophobes des peptides s'auto-assemblent en s'empilant d'une

façon similaire aux feuillets- β retrouvés dans la soie de vers à soie ou d'araignées et forment alors des fibrilles, laissant les côtés ioniques vers l'extérieur. Les côtés hydrophiles peuvent alors interagir soit avec les molécules d'eau ou avec d'autres peptides de charge opposée. Un hydrogel comportant jusqu'à 99,9 % d'eau par rapport à la masse de peptides est finalement formé.

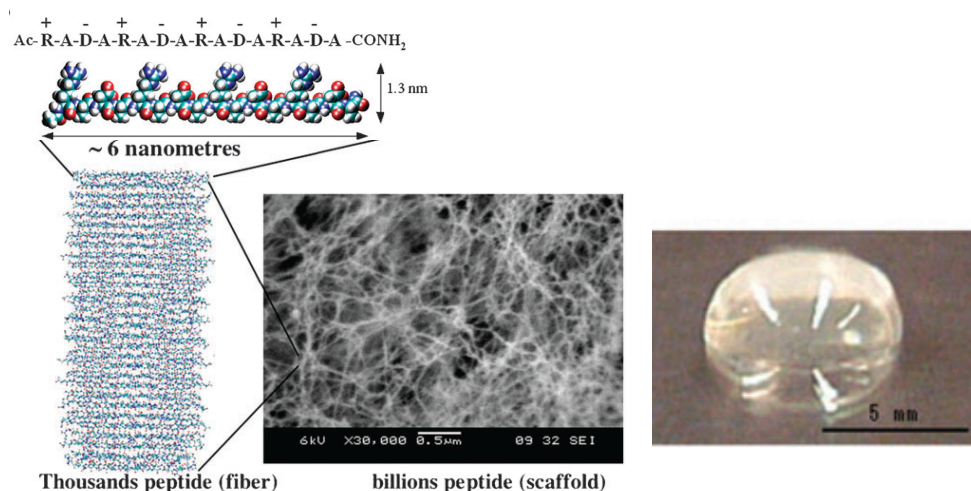


Figure 5.2. Représentation d'un peptide RADA 16-I, composé de 16 acides aminés alternant les motifs hydrophiles arginine (R, +) et aspartate (D, -) avec les motifs hydrophobes alanine (A). Ces peptides s'auto-assemblent en feuillets- β qui s'empilent ensuite grâce aux interactions entre les charges opposées de R et D et par les interactions hydrophobes entre les A, formant alors un hydrogel composé d'un réseau de fibrilles interconnectées. Reproduite de la référence 19 © 2010 avec la permission de The Royal Society for Chemistry.

Bien qu'il soit possible de réguler l'auto-assemblage de ces peptides grâce au contrôle de la séquence d'acides aminés lors de la synthèse, les structures finales résultantes sont des hydrogels possédant de faibles performances mécaniques.¹⁵ Cette caractéristique rend difficile leur implantation *in vivo* pour des applications en ingénierie tissulaire. Aussi, bien que les méthodes de synthèse peptidiques aient grandement évolué,²⁰ il reste difficile de générer des peptides avec un faible indice de polymolécularité et sans défauts tout en ayant une haute masse moléculaire, le tout en évitant une agrégation incontrôlable et irréversible.²¹ La

production de peptides avec des masses moléculaires plus élevées favoriserait l'enchevêtrement des chaînes et améliorerait les propriétés mécaniques des matériaux. Aussi, les synthèses peptidiques s'effectuent généralement à l'aide de solvants organiques à la fois nocifs pour l'environnement et inadéquats pour des applications dans le domaine de la santé. La production à grande échelle demeure aussi un défi de taille puisque les synthèses s'effectuent en plusieurs étapes successives, abaissant les rendements et menant à un coût élevé. Malgré tout, ces types de peptides sont une avancée majeure vers le développement contrôlé de biomatériaux fonctionnels applicables à l'ingénierie tissulaire.

La question demeure cependant : comment produire des matériaux biomimétiques à la fois performants mécaniquement et en quantité suffisamment grande pour trouver une niche d'application à un niveau commercial? Une partie de la réponse se trouve probablement dans la production de protéines de type copolymère blocs, comme celles présentes dans le byssus natif mais qui n'ont pas pu être extraites par notre processus d'hydrolyse, par bioingénierie. La jeune compagnie Bolt Threads Inc. se spécialise dans ce type de technologie afin de produire des polymères de protéines inspirés de la soie dans le but de fabriquer des tissus et vêtements. Le domaine des copolymères blocs étant très vaste, le sujet ne sera qu'effleuré dans cette section. D'abord, les copolymères blocs sont bien connus pour leur capacité à s'auto-assembler par une nano-séparation de phases, résultant en des morphologies variables en fonction de la nature des blocs régissant leurs interactions, leur degré de polymérisation et leur fraction volumique.²¹ Il est donc possible de faire varier à la fois la morphologie et les propriétés des matériaux suivant l'auto-assemblage des copolymères blocs. Cependant l'analogie entre les copolymères blocs à base de protéines et ceux synthétiques s'arrête à ce niveau, car plusieurs autres paramètres influencent la séparation de phases dans le cas des protéines, et les structures résultantes ne sont donc pas aussi conventionnelles que dans le cas des polymères synthétiques. Alors que la nano-séparation de phases des copolymères blocs synthétiques est généralement bien définie (e.g. structures lamellaires, cubiques, hexagonales, etc.), celle obtenue avec des protéines mène plutôt à un mélange de domaines moins bien définis dans lesquels les protéines ont adopté des structures variables (e.g. feuillets- β vs hélices- α). Ceci est causé par la très grande différence entre les motifs de répétition d'un polymère et les acides aminés des protéines. Les protéines font beaucoup de ponts hydrogène, ont des interactions

hydrophobes et électrostatiques, et possèdent une chaîne principale limitée dans ses angles de torsion, tel que décrit au chapitre 1, ce qui est rarement le cas des copolymères blocs synthétiques.²¹

La production de copolymères blocs de protéines par ingénierie génétique consiste en l'expression des protéines par les techniques d'ADN recombinant. Le fonctionnement précis de cette méthode est bien en dehors des limites de cette thèse, mais les étapes globales sont schématisées à la figure 5.3. Brièvement, des segments d'ADN codant les protéines d'intérêt sont insérés dans un plasmide qui est à son tour incorporé dans des bactéries ou levures. Les cellules clonées contenant le plasmide modifié expriment alors les protéines désirées, qui peuvent alors être récupérées et purifiées pour utilisation ultérieure.²¹ Cette méthode comporte les avantages de permettre le contrôle de la séquence des acides aminés et de la stéréochimie tout en obtenant une masse moléculaire précise pouvant atteindre plus d'une centaine de kDa.²¹ De plus, il est possible de produire des quantités appréciables de protéines et la production se fait en milieu aqueux, ce qui facilite l'approbation pour des applications en ingénierie tissulaire.²¹

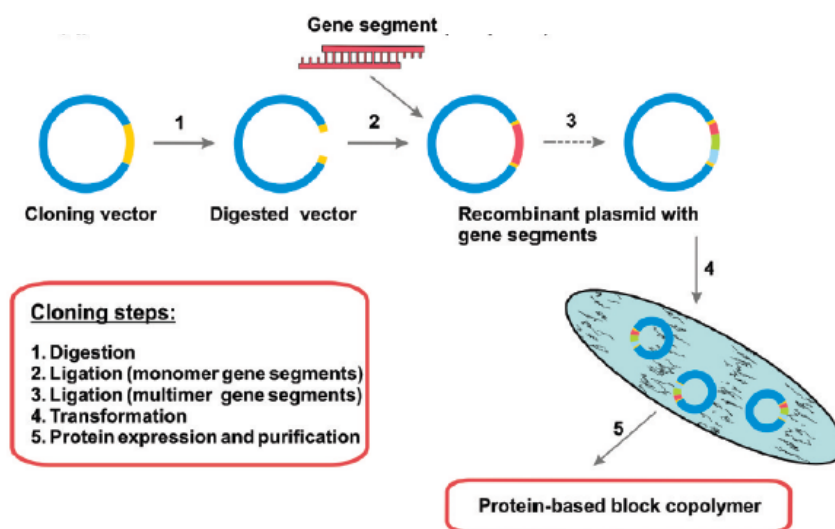


Figure 5.3. Schéma représentant la méthode de production de copolymère blocs à base de protéines. Reproduite de la référence 21 © 2011 avec la permission de American Chemical Society.

Plusieurs types de copolymères blocs à base de protéines ont été développés en sélectionnant bien les séquences des acides aminés, permettant de contrôler différentes structures secondaires et les propriétés finales des matériaux en découlant. Des copolymères blocs de soie-élastine ont permis de générer des matériaux avec des applications potentielles en pharmaceutiques ou en ingénierie tissulaire.²² Des hydrogels biocompatibles à base de copolymères blocs de soie-collagène ont aussi été produits pour des applications biomédicales.²³ Les séquences et combinaisons des blocs de protéines deviennent ainsi pratiquement infinies et cette classe de matériaux pourrait bien devenir l'avenir du domaine biomédical. D'ailleurs, Hagenau et Scheibel soulignaient en 2010 que les preCols retrouvés dans les byssus de moules seraient de bons candidats pour une production par bioingénierie puisqu'ils pourraient mener à des applications extrêmement intéressantes.²⁴ Ils précisait cependant qu'une telle production demeure un défi très important à cause de la complexité de ces macromolécules.²⁴

Enfin, hormis les synthèses de peptides et protéines dans une optique biomimétique, il est incontournable de mentionner tous les efforts déployés à la confection de matériaux polymériques synthétiques. Entre autre, plusieurs groupes de recherche tentent de mieux comprendre et de mimer les propriétés adhésives des protéines retrouvées dans la plaque des byssus.²⁵⁻³¹ La stratégie consiste à fonctionnaliser différents polymères synthétiques avec des DOPAs. Il est ensuite possible d'induire l'oxydation de ces groupements fonctionnels afin de générer des radicaux réactifs qui formeront des liens covalents avec plusieurs types de surface, ou d'utiliser la chimie de coordination en formant des liens organo-métalliques. Ces polymères pourraient entre autre trouver des applications en tant que biomatériaux pour refermer des plaies lors de chirurgies ou pour joindre des structures immergées sous l'eau.

5.2.2 Hiérarchie des structures et rôle des interfaces dans les matériaux

Jusqu'à maintenant, le focus a surtout été dirigé vers la mise en œuvre de matériaux suivant l'auto-assemblage de macromolécules à un niveau nano- ou microscopique. Cependant, tel que décrit dans l'introduction pour les os et le byssus, les propriétés mécaniques finales de plusieurs matériaux biologiques sont gérées par l'assemblage hiérarchique de

différentes composantes agissant de concert pour donner une structure macroscopique avec des propriétés très différentes de celles de chacun de ses constituants isolés les uns des autres. Les films de BPH présentés dans cette thèse ne possèdent évidemment pas le même niveau d'assemblage hiérarchique que la fibre de byssus naturel, ce qui explique en partie la différence entre leurs propriétés. Il en est de même pour les soies d'araignées; aucun matériau régénéré à partir d'un mélange de ces protéines ne mène à des propriétés aussi impressionnantes que la toile entière, qui est assemblée hiérarchiquement à partir de plusieurs variantes de ces protéines sécrétées à l'aide de différentes glandes. Ainsi, il devient nécessaire de trouver des stratégies d'assemblage pour améliorer les matériaux à base de protéines en général. Une partie de la solution à la préparation de matériaux de pointe semble ainsi résider dans la production de matériaux composites et hybrides contenant un agencement hiérarchique de leurs constituants et formant des interfaces. Cette section présente différentes structures biologiques et leur agencement sophistiqué à l'aide d'interfaces menant à des propriétés mécaniques surprenantes. La figure 5.4 illustre quatre différents exemples où les interfaces ont une influence marquée sur les propriétés.

La première technique consiste à utiliser une interface qui permet d'augmenter la résistance à la fracture de matériaux fragiles.³² La nacre des coquilles de mollusques en est un bon exemple qui sera décrit plus loin. La deuxième stratégie consiste en une interface qui agit comme lien ou joint entre des matériaux possédant des propriétés contrastantes (e.g. mou vs rigide).³² La jonction entre les ligaments et les os ou entre la dentine et l'émail des dents sont des exemples qui reflètent bien cette stratégie. La troisième méthode relève de la présence d'interfaces permettant aux matériaux de se déformer facilement tout en évitant une fracture nette.³² Mentionnons la suture entre les coquilles de la carapace des tortues, ou tel que décrit au chapitre 1, la déformabilité des os promue par les liens sacrificiels. Enfin, la dernière astuce est l'utilisation d'une interface agissant comme un déclencheur de mouvements et de force par le matériau lorsqu'un stimulus externe est présent.³² C'est le cas des cocottes de pins, qui s'ouvrent ou se referment en fonction de l'humidité grâce au gonflement de la matrice d'hémicellulose se situant entre les fibres de cellulose orientées, permettant ainsi de libérer les graines reproductrices.

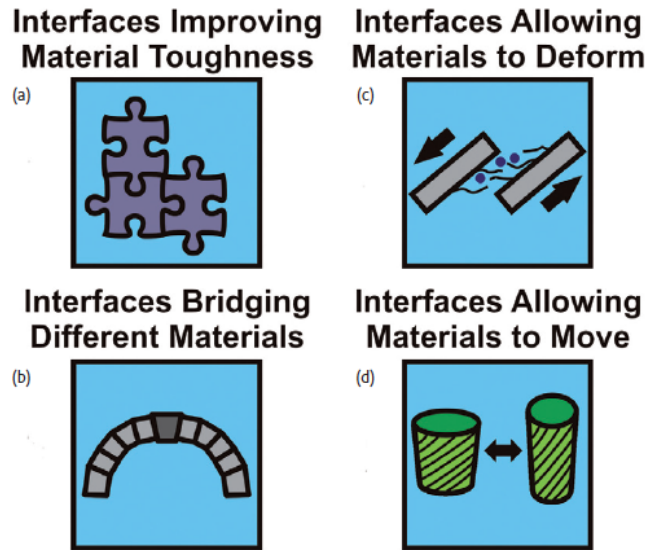


Figure 5.4. Exemples démontrant l’impact des interfaces sur les propriétés de matériaux biologiques : (a) interfaces augmentant la résistance à la fracture des matériaux, (b) interfaces servant à lier des éléments possédant des propriétés mécaniques différentes, (c) interfaces permettant aux matériaux de se déformer de manière plastique sans se rompre et (d) interfaces permettant aux matériaux d’agir en déclencheur de mouvement/stress. Reproduite de la référence 32 © 2011 avec la permission de Elsevier.

En lien avec le chapitre 1, la moule combine deux des méthodes illustrées ci-dessus en utilisant des interfaces comme stratégie évolutive pour se protéger efficacement des agressions de l’environnement. La première, soit la résistance à la fracture dans les matériaux fragiles, est retrouvée dans la nacre de sa coquille. La présence d’une interface de protéines entre les cristaux de carbonate de calcium la composant protège le mollusque contre la fracture abrupte de sa coquille en déviant les fissures vers et à travers cette interface. La deuxième méthode utilisée par le mollusque consiste à lier des structures de propriétés mécaniques différentes. Cette stratégie est plutôt retrouvée dans le byssus et consiste en un gradient des différents preCols et de leur jonction grâce à des zones riches en histidine contenant des métaux. Le gradient de preCols mène à un gradient dans les propriétés mécaniques, soit à une partie distale qui est rigide et une partie proximale qui est plutôt souple et extensible. De plus, la surface du byssus est recouverte d’une autre couche de protéines plutôt flexible contenant des

granules riches en liens DOPA-Fer rigidifiant cette interface. Il devient évident que les films de BPH ne peuvent pas atteindre ce niveau d'hierarchie précis, et ainsi mimer parfaitement les propriétés du byssus.

Puisque l'un des problèmes majeurs rencontrés avec ces matériaux est l'approvisionnement difficile en byssus et la faible quantité de protéines extractibles, leur fonctionnalisation ou modification afin de les utiliser soit comme matériau présent aux interfaces en conjonction avec d'autres types de matières pour former des composites (figure. 5.5b), soit en y intégrant d'autre matériaux pour générer des interactions interfaciales (figure 5.5c), pourrait bien être une façon de les valoriser à plus grande échelle. Dans cet ordre d'idée, l'addition de particules de remplissage permettrait de renforcer les matériaux de BPH d'une manière analogue à l'ajout de particules de noir de carbone ou de silice dans les matériaux de caoutchouc naturel (e.g. pneus).³³ Li *et al.* ont d'ailleurs démontré que l'ajout de nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_3O_4) à des polymères biomimétiques inspirés des protéines responsables de l'adhésion des moules menait à des hydrogels avec de meilleures performances mécaniques que l'ajout d'ions de fer seuls.³⁴ Non seulement ces gels nanocomposites sont plus rigides et élastiques que ceux préparés par simple ajout d'ions Fe^{3+} , mais ils conservent aussi la capacité d'auto-guérison promue par les liens sacrificiels DOPA-Fer.³⁴ Il serait ainsi intéressant d'étudier l'effet de l'ajout de ce type de particules sur les performances mécaniques des matériaux à base de BPH comme complément à l'étude présentée au chapitre 4.

Finalement, que l'approche pour la production de matériaux biomimétiques soit « bottom-up », en utilisant des matières premières synthétisées ou exprimées par bioingénierie, ou « top-down », suite à l'extraction des molécules comprises dans les ressources naturelles, il semble plus que probable que l'avenir de la science des matériaux se dirigera dans la direction des composites comprenant des interfaces. À mon avis, cette avenue permettra de générer de nouvelles classes de matériaux biomimétiques applicables dans des domaines extrêmement variés. Pour ce qui est de l'avenir du byssus pour la production de matériaux, suivre cette direction ne me semble pas envisageable à grande échelle. La ressource est trop difficile à obtenir en quantité suffisante et les matériaux résultants, bien que très intéressants sous plusieurs aspects, peuvent être substitués par des matériaux hybrides de nouvelle génération

plus polyvalents, e.g. les copolymères blocs de protéines biocompatibles. Cette thèse aura néanmoins permis de produire cette nouvelle classe de matériaux ainsi que d'explorer leurs propriétés biomimétiques. Il a ainsi été possible de mieux comprendre le byssus lui-même de même que l'importance de la nature polyampholytique des protéines et des liens sacrificiels sur les performances mécaniques des matériaux. Ces caractéristiques pourraient éventuellement être mis à profit dans d'autres systèmes à base de protéines.

5.3 Références

1. C. H. Brown, *Q. J. Microsc. Sci.*, 1952, **93**, 487-502.
2. X. Qin, J. H. Waite, *J. Exp. Biol.*, 1995, **198**, 633-644.
3. X.-X. Qin, J. H. Waite, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, **95**, 10517-10522.
4. H. Silverman, F. Roberto, in *Biological Adhesive Systems*, eds. J. Byern, I. Grunwald, Springer Vienna, 2010, ch. 18, pp. 273-283.
5. J. H. Waite, in *Structure, Cellular Synthesis and Assembly of Biopolymers*, ed. S. Case, Springer Berlin Heidelberg, 1992, vol. 19, ch. 2, pp. 27-54.
6. A. A. Arnold, F. Byette, M.-O. Séguin-Heine, A. LeBlanc, L. Sleno, R. Tremblay, C. Pellerin, I. Marcotte, *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 132-141.
7. A. Hagenau, P. Papadopoulos, F. Kremer, T. Scheibel, *J. Struct. Biol.*, 2011, **175**, 339-347.
8. R. Nazarov, H.-J. Jin, D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 718-726.
9. C. H. Lee, A. Singla, Y. Lee, *Int. J. Pharm.*, 2001, **221**, 1-22.
10. N. Holten-Andersen, T. E. Mates, M. S. Toprak, G. D. Stucky, F. W. Zok, J. H. Waite, *Langmuir*, 2009, **25**, 3323-3326.
11. N. Holten-Andersen, H. Zhao, J. H. Waite, *Biochemistry*, 2009, **48**, 2752-2759.
12. M.-O. Seguin-Heine, A.-A. Lachance, B. Genard, B. Myrand, C. Pellerin, I. Marcotte, R. Tremblay, *Aquaculture*, 2014, **426-427**, 189-196.
13. C. Vepari, D. L. Kaplan, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, **32**, 991-1007.

14. R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod, *Materials*, 2010, **3**, 1863-1887.
15. J. B. Matson, R. H. Zha, S. I. Stupp, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 2011, **15**, 225-235.
16. J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, *Science*, 2001, **294**, 1684-1688.
17. J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 5133-5138.
18. S. Zhang, T. Holmes, C. Lockshin, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 3334-3338.
19. C. A. Hauser, S. Zhang, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 2780-2790.
20. H. Robson Marsden, A. Kros, *Macromol. Biosci.*, 2009, **9**, 939-951.
21. O. S. Rabotyagova, P. Cebe, D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 269-289.
22. X. X. Xia, Q. Xu, X. Hu, G. Qin, D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 3844-3850.
23. M. K. Wlodarczyk-Biegun, M. W. Werten, F. A. de Wolf, J. J. van den Beucken, S. C. Leeuwenburgh, M. Kamperman, M. A. Cohen Stuart, *Acta Biomater.*, 2014, **10**, 3620-3629.
24. A. Hagenau, T. Scheibel, *J. Adhes.*, 2010, **86**, 10-24.
25. Y. Chan Choi, J. S. Choi, Y. J. Jung, Y. W. Cho, *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 201-209.
26. L. Hight, J. Wilker, *J. Mater. Sci.*, 2007, **42**, 8934-8942.
27. B. P. Lee, P. B. Messersmith, J. N. Israelachvili, J. H. Waite, *Annu. Rev. Mater. Res.*, 2011, **41**, 99-132.
28. H. Lee, S. M. Dellatore, W. M. Miller, P. B. Messersmith, *Science*, 2007, **318**, 426-430.
29. H. Lee, B. P. Lee, P. B. Messersmith, *Nature*, 2007, **448**, 338-341.
30. C. R. Matos-Pérez, J. D. White, J. J. Wilker, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 9498-9505.
31. H. J. Meredith, J. J. Wilker, *Adv. Funct. Mater.*, 2015, **25**, 5057-5065.
32. J. W. C. Dunlop, R. Weinkamer, P. Fratzl, *Mater. Today*, 2011, **14**, 70-78.

33. N. Rattanasom, T. Saowapark, C. Deeprasertkul, *Polym. Test.*, 2007, **26**, 369-377.
34. Q. Li, D. G. Barrett, P. B. Messersmith, N. Holten-Andersen, *ACS Nano*, 2016, **10**, 1317-1324.

Annexe I : Spectres FTIR de protéines, dérivées secondes et spectres de différence

Les spectres de protéines dans le moyen infrarouge sont dominés par les vibrations des liens chimiques dans les groupements amides du squelette peptidique.^{1,2} Puisque le repliement des structures secondaires des protéines implique la formation de ponts hydrogène qui délocalisent différemment les électrons dans les liens physiques et chimiques impliqués dans ces structures, il est possible d'associer diverses bandes à des motifs précis.^{1,2} Cependant, les bandes « plutôt fines » attribuables aux multiples structures secondaires se chevauchent généralement à cause de leur environnement chimique similaire, menant à une bande très large difficile à résoudre. C'est le cas de la bande amide I des protéines, située entre 1720 et 1580 cm^{-1} , qui est dominée par les vibrations du carbonyle des liens amide formant le squelette peptidique.¹⁻³ Cette bande est très utilisée pour déterminer les structures secondaires des protéines puisqu'elle est grandement sensible aux variations de géométrie moléculaire et de motifs formés par les ponts hydrogène.²⁻⁵

Puisque la largeur des bandes à l'intérieur de la bande amide I ne permet pas leur résolution directement avec le spectromètre, des méthodes mathématiques ont été développées afin d'augmenter la résolution spectrale et de détecter les différentes structures retrouvées à l'intérieur des bandes amide des protéines. Ces méthodes permettent d'attribuer les structures secondaires initiales retrouvées dans les protéines étudiées, puis de suivre les changements de structures provoqués par l'application de différents traitements physiques ou chimiques sur le système en question.

L'utilisation de dérivées secondes est la méthode la plus répandue pour détecter les différentes composantes attribuables à des structures secondaires qui sont camouflées dans une bande très large telle que la bande amide I. Le concept de la dérivée seconde est illustré à la figure I.I.⁶ Le traitement mathématique consiste à multiplier par une parabole le signal du spectre original dans le domaine de Fourier, puis de faire une transformée de Fourier pour revenir dans le domaine des nombres d'onde.⁶

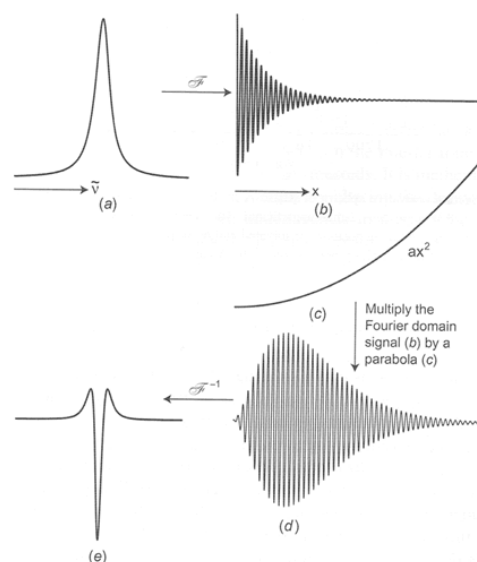


Figure I.I. Illustration du traitement mathématique impliqué dans le calcul d'une dérivée seconde sur un spectre infrarouge. Reproduite de la référence 6 © 2007 avec la permission de John Wiley & Sons, Inc.

L'application d'une dérivée seconde (ou autre dérivée de nombre pair) sur « l'enveloppe » de la bande amide I d'un spectre infrarouge mène à des bandes négatives plus étroites attribuables à la détection de changements de pente, donc à la présence de diverses composantes.³⁻⁶ Les bandes ainsi résolues dans le spectre de dérivée seconde renseignent à la fois sur la position des composantes à l'intérieur de la bande amide ainsi que sur leur intensité/quantité.⁷ La figure I.II illustre le spectre infrarouge d'une fibre de soie de ver à soie *Bombyx mori* dans la région de la bande amide I ainsi que la dérivée seconde calculée. Des bandes sont présentes près de 1620 et 1700 cm^{-1} , attribuable à la présence de feuillets β anti-parallèles. Les autres bandes détectées se retrouvent à environ 1680, 1670 et 1655 cm^{-1} et sont attribuables à la présence de coudes β et hélices α . Tel que décrit à la section 1.2.2, toutes ces structures sont reconnues pour être présentes dans les fibres de soie naturelle.

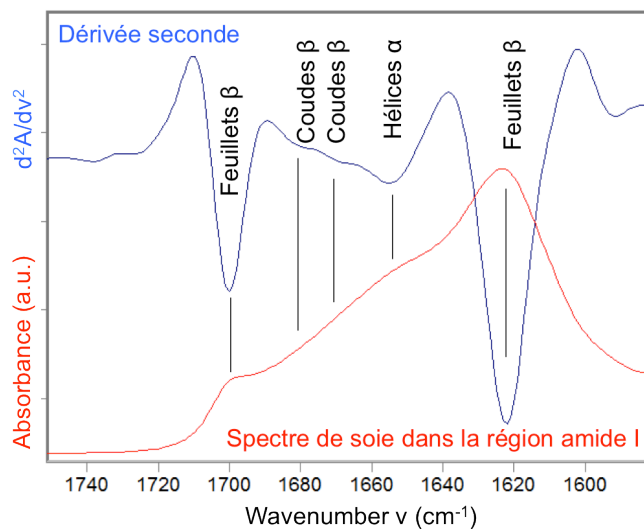


Figure I.II. Spectre infrarouge d’une fibre de soie dans la région amide I (rouge) et sa dérivée seconde (bleu), incluant l’attribution des différentes composantes détectées.

La détection de structures secondaires grâce à une dérivée seconde sur la bande amide I est limitée par la présence potentielle de bandes attribuables à la vapeur d’eau dans cette région du spectre infrarouge. Un spectre contenant une quantité non négligeable de signal émanant de la vapeur d’eau mènerait à la résolution de ces composantes suite au traitement à l’aide de la dérivée seconde, et donc à une interprétation erronée. Pour cette raison, il est important d’acquérir les spectres en simple faisceau de l’échantillon et du fond (background) dans un intervalle rapproché et dans des conditions atmosphériques identiques avant de calculer le spectre infrarouge. Aussi, le rapport signal sur bruit du spectre infrarouge doit être élevé pour éviter d’amplifier des bandes qui seraient attribuables au bruit. La plupart des logiciels de spectroscopie intègrent un paramètre de lissage du spectre lors de l’application d’une dérivée seconde, ce qui permet de diminuer les problèmes associés à la présence mineure de bandes de vapeur d’eau ou de bruit dans le spectre. Cependant, il est plutôt recommandé d’acquérir de meilleurs spectres puisque le lissage mène à l’élargissement des bandes et à une perte de leur intensité,⁶ ce qui va à l’encontre de l’objectif d’une dérivée seconde.

Il est aussi possible de suivre les changements entre des spectres infrarouges grâce à des spectres de différence. Ceux-ci sont calculés en soustrayant un spectre de référence à un

un spectre initial. Si la différence entre le spectre de référence et le spectre initial est négative, il y a une perte de composante/structure alors que si la différence est positive, il y a apparition d'une nouvelle composante/structure par rapport au spectre initial. Enfin si la différence est de zéro, il n'y a pas de changement entre les deux spectres. À titre d'exemple, la figure I.III illustre les spectres de références et initial ainsi que leur différence pour des caillots de fibrine soumis à une contrainte mécanique.⁸ Les changements détectés ont été attribués à une transition d'hélice α (signal négatif autour de 1651 cm^{-1}) vers feuillets β (signal positif autour de 1622 cm^{-1}).

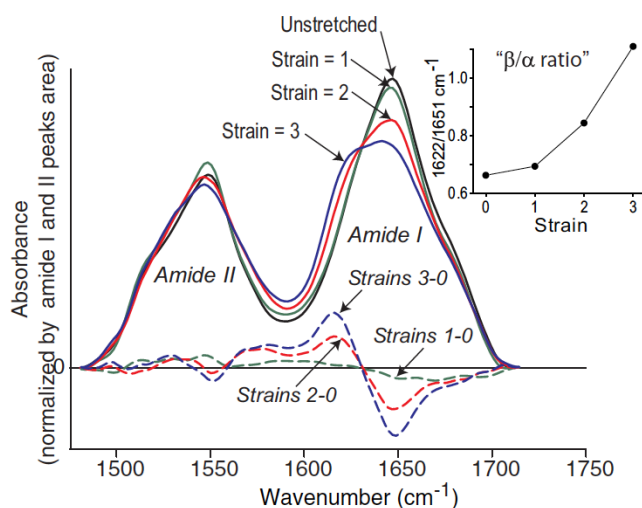


Figure I.III. Spectres infrarouge et leurs spectres de différence dans les régions amide I et II enregistrés lors de l'application d'une contrainte mécanique (extension) sur des caillots de fibrine. Reproduite de la référence 8 © 2012 avec la permission de Elsevier.

Bien que cette méthode soit utile pour détecter les différences entre deux états d'un échantillon ou entre deux échantillons, ce n'est pas une méthode utilisée pour augmenter la résolution d'un spectre au même titre qu'une dérivée seconde, et elle ne permet pas de quantifier la structure secondaire avec la même précision. Il est important de s'assurer que la ligne de base et le rapport signal sur bruit entre les spectres utilisés pour calculer un spectre de différence soient identiques afin d'éviter de détecter des changements qui ne seraient pas attribuables aux échantillons mais plutôt à des artefacts.

Références

1. H. Fabian, W. Mäntele, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, eds. J. M. Chalmers, P. R. Griffiths, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2002, vol. 5, p. 27.
2. M. Jackson, H. H. Mantsch, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1995, **30**, 95-120.
3. J. Kong, S. Yu, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2007, **39**, 549-559.
4. D. M. Byler, H. Susi, *Biopolymers*, 1986, **25**, 469-487.
5. D. M. Byler, R. Wilson, C. Randall, T. Sokoloski, *Pharm. Res.*, 1995, **12**, 446-450.
6. P. R. Griffiths, J. A. d. Haseth, *Fourier Transform Infrared Spectrometry, Second Edition*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007.
7. A. Dong, P. Huang, W. S. Caughey, *Biochemistry*, 1990, **29**, 3303-3308.
8. R. I. Litvinov, D. A. Faizullin, Y. F. Zuev, J. W. Weisel, *Biophys. J.*, 2012, **103**, 1020-1027.