

Université de Montréal

**Étude spectroscopique du collagène de type I traité avec des solutions
acides ; influence du pH et du temps d'exposition**

par

Pascal L'Ecuyer

Département de Chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en chimie

Avril 2001

© Pascal L'Ecuyer, 2001



QD

3

U54

2001

v.029

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

“Étude spectroscopique du collagène de type I traité avec des solutions acides ;
influence du pH et du temps d'exposition”

présenté par :
Pascal L'Ecuyer

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Gilles Durocher	président-rapporteur
Thomas Ellis	directeur de recherche
Michel Lafleur	membre du jury

Sommaire

La médecine dentaire utilise plusieurs types d'acides pour déminéraliser la dentine. Le choix de l'acide utilisé est basé sur des études cliniques, dont les mécanismes d'adhésion sont incertains. Le phénomène de déminéralisation est étudié et les résultats de ces travaux sont disponibles dans la littérature, mais très peu observent le comportement du collagène face à ces acides.

C'est pour mieux comprendre les interactions du collagène avec les acides que ces travaux furent entrepris. Pour situer les travaux réalisés en relation avec la médecine dentaire, une description du collagène et des techniques utilisées en médecine dentaire sera faite. Des fibrilles de collagène seront étudiées spectroscopiquement, suite à un traitement par les acides phosphorique, chlorhydrique et maléique à différents pH et différents temps d'exposition. Les techniques de préparation des échantillons seront variées afin d'optimiser la reproductibilité des mesures. Pour effectuer une analyse adéquate des groupements de surface, les techniques de caractérisation utilisées seront la spectroscopie infrarouge photoacoustique à transformée de Fourier et la spectroscopie Raman. Ces techniques permettront d'établir les espèces qui s'adsorbent le plus sur le collagène ainsi que les conditions optimales pour qu'il y ait une telle adsorption.

Une discussion plus approfondie suivra, où une synthèse des résultats obtenus sera faite et les résultats spectroscopiques seront utilisés pour proposer un mécanisme d'action des acides sur le collagène. Il sera déterminé que le collagène interagit avec les groupements phosphate de l'acide phosphorique. Le collagène ayant été traité avec une solution d'acide phosphorique de pH 0,7 présente des caractéristiques particulières qui ne sont influencées ni par le temps d'exposition, ni par le type de rinçage utilisé. L'étude spectroscopique

nous permet de supposer qu'il existe un pH critique où le collagène subit une protonation de ses chaînes latérales.

Il sera finalement démontré qu'il est pertinent de réaliser de telles études pour comprendre les mécanismes qui régissent l'adhésion de matériaux de restauration dentinaire. L'utilisation de l'acide phosphorique lors de travaux de restauration dentinaire peut être expliquée par sa capacité de demeurer adsorbé sur le collagène. Les techniques spectroscopiques utilisées se sont avérées de très bons outils pour faire l'étude de tissus biologiques. Une utilisation accrue de la spectroscopie Raman serait un atout pour ce genre d'étude.

Table des matières

Sommaire	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures.....	x
CHAPITRE 1	1
1. Introduction	1
1.1. Composition de la dentine	1
1.2. Le collagène.....	2
1.2.1. Structure.....	2
1.2.2. Superstructure	5
1.3. Exposition de la dentine lors de la restauration	6
1.4. Adhérence à la dentine	7
1.5. Dissolution de la phase minérale	7
1.6. Objectifs du projet.....	8
1.7. Références	9
CHAPITRE 2	13
2. Partie expérimentale.....	13
2.1. Spectroscopie photoacoustique.....	13
2.1.1. Effet photoacoustique.....	13
2.1.2. Cellule photoacoustique.....	15
2.1.3. Le gaz porteur	16
2.1.4. La source.....	16
2.1.5. Appareillage	16
2.1.6. Acquisition de spectres PA-IRTF	17
2.2. Spectroscopie Raman	17
2.2.1. Appareillage	18
2.2.2. Acquisition des spectres Raman.....	18
2.3. Première série d'échantillons.....	19

2.4. Deuxième série d'échantillons	20
2.5. Solutions acides	21
2.6. Lyophilisation	21
2.7. Références	22
CHAPITRE 3	23
3. Spectroscopie photoacoustique, résultats et discussion ; échantillons de collagène lavé	23
3.1. Collagène lavé.....	23
3.2. Collagène lavé, traité avec une solution de HCl.....	25
3.2.1. Protonation des chaînes latérales.....	27
3.2.2. Protonation des bouts de chaînes	30
3.2.3. Bris de liaisons peptidiques, signal des ions ammoniums.....	30
3.2.4. Dénaturation du collagène	31
3.2.5. Conclusion partielle.....	32
3.3. Collagène lavé, traité avec une solution d'acide maléique.....	32
3.4. Collagène lavé, traité avec une solution de H ₃ PO ₄	37
3.4.1. Région de 1200 à 900 cm ⁻¹	40
3.4.2. Région de 2700 à 2300 cm ⁻¹	42
3.4.3. Les pKa de l'acide phosphorique.....	43
3.4.4. Conclusion partielle.....	44
3.5. Références	45
CHAPITRE 4.....	47
4. Spectroscopie photoacoustique, résultats et discussion ; échantillons de collagène lavé et lyophilisé	47
4.1. Collagène lavé et lyophilisé.....	47
4.1.1. Contribution de la lyophilisation à la dénaturation	50
4.2. Collagène lavé, lyophilisé, puis rincé avec de l'eau de pH 1,0 et 9,050	
4.3. Collagène lavé, lyophilisé, puis traité avec une solution de H ₃ PO ₄ ..	53
4.4. Influence du rinçage à l'eau sur le collagène lyophilisé, traité avec une solution de H ₃ PO ₄	58

4.5. Influence du rinçage à l'eau de pH 1,0 sur le collagène lyophilisé, traité avec une solution de H_3PO_4	60
4.6. Influence du rinçage à l'eau de pH 9,0 sur le collagène lyophilisé, traité avec une solution de H_3PO_4	62
4.7. Conclusion partielle	63
4.8. Références	64
CHAPITRE 5	65
5. Spectroscopie Raman, résultats et discussion ; échantillons de collagène lavé et lyophilisé.....	65
5.1. Introduction.....	65
5.2. Collagène lavé et lyophilisé.....	65
5.3. La fluorescence des échantillons organiques.....	67
5.4. Spectres Raman de solutions d'acide phosphorique	69
5.5. Collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution de H_3PO_4 , rincé à l'acétone.....	73
5.6. Collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution de H_3PO_4 , rincé à l'eau.....	74
5.7. Conclusion partielle	76
5.8. Références	77
CHAPITRE 6	78
6. Structure du collagène, incidence des résultats et discussion.....	78
6.1. Interactions qui stabilisent le collagène.....	78
6.2. Influence des acides utilisés.....	78
6.3. Emplacement des H_3PO_4 ou des $H_2PO_4^-$	79
6.4. Parallèle avec les phosphorynes.....	80
6.5. Collagène et ponts hydrogène.....	81
6.6. pKa des chaînes latérales.....	82
6.7. Conclusion partielle	82
6.8. Références	83
CHAPITRE 7	85

7. Conclusion.....	85
7.1. Le collagène et l'acide chlorhydrique.....	85
7.2. Le collagène et l'acide maléique.....	85
7.3. Le collagène et l'acide phosphorique.....	85
7.3.1. Source de stabilisation.....	85
7.3.2. Effet des rinçages.....	86
7.3.3. Particularité du pH 0,7.....	86
7.3.4. Influence de la préparation des échantillons.....	87
7.4. Spectroscopie photoacoustique.....	87
7.5. Spectroscopie Raman.....	88
7.6. Aspect pratique.....	88
7.7. Voies à entreprendre.....	88
Annexe A : Acides aminés.....	A
Annexe B : Choix de solvant pour laver le collagène ; étude PA-IRTF.....	B
Remerciements.....	xiv

Liste des tableaux

Tableau 1 : Désignation et description des bandes amides caractéristiques des peptides en infrarouge[1]. s : étirements, d : déformation.	24
Tableau 2 : Représentation des concentrations de chacun des acides utilisés afin d'obtenir le pH indiqué. (Les concentrations ont été calculées à partir des pKa de chacun des acides)	37
Tableau 3 : Désignation des bandes attribuables aux étirements des phosphates et de l'acide phosphorique en infrarouge[8, 17, 18].....	42
Tableau 1 : Désignation des bandes amides caractéristiques du collagène de tendons d'Achille de bovins en spectroscopie Raman[2].	66

Liste des figures

Figure 1 : Composition en acides aminés de chacun des types d'hélices du collagène de type I pour 3000 résidus[6].	3
Figure 2 : Représentation des structures qui forment les fibrilles de collagène à partir de microfibrilles[8].	4
Figure 3 : Représentation schématique de la génération du signal photoacoustique dans une dimension[2].	15
Figure 4 : Spectre photoacoustique infrarouge du collagène lavé avec de l'acétone pendant 10 minutes au bain à ultrasons, puis sous vide pendant 1 heure.	23
Figure 5 : Spectre photoacoustique infrarouge du collagène lavé, traité pendant 60 secondes avec une solution de HCl de pH 0,7, puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes.	26
Figure 6 : Soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, traité avec une solution de HCl de pH 0,7, puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes.	27
Figure 7 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, traité avec une solution de HCl de pH de 0,7 pendant divers temps, puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes.	28
Figure 8 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, traité avec une solution de HCl à divers pH pendant 120 secondes, puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes.	29
Figure 9 : Acide maléique.	32
Figure 10 : Spectre photoacoustique infrarouge du collagène lavé, traité pendant 60 secondes avec une solution d'acide maléique de pH 1,0 puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes.	33
Figure 11 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, traité avec une solution d'acide maléique de pH 1,0, puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes.	34
Figure 12 : Spectre photoacoustique infrarouge de l'acide maléique sous forme de cristaux.	36
Figure 13 : Spectre photoacoustique infrarouge du collagène lavé, traité pendant 60 secondes avec une solution de H ₃ PO ₄ de pH 0,7, puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes.	38
Figure 14 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, traité avec une solution de H ₃ PO ₄ à divers pH pendant 60 secondes, puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes.	39
Figure 15 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, traité avec une solution de H ₃ PO ₄ à divers pH pendant 15 secondes, puis rincé à l'acétone au bain à ultrasons pendant 10 minutes.	40
Figure 16 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, traité avec une solution de H ₃ PO ₄ de pH 1,0 pendant divers temps, puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes.	41

Figure 17 : Spectre photoacoustique infrarouge du collagène lavé, puis lyophilisé.	48
Figure 18 : Spectre photoacoustique infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, puis rincé à l'acétone et mis sous vide.	49
Figure 19 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, traité avec les solutions à pH 1,0 et 9,0, puis rincé à l'acétone.	51
Figure 20 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, traité avec les solutions à pH 1,0 et 9,0, puis rincé à l'eau.	52
Figure 21 : Spectre photoacoustique infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, traité pendant 15 secondes à une solution d'acide phosphorique de pH de 0,7, puis rincé à l'acétone et mis sous vide.	54
Figure 22 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution de H ₃ PO ₄ à divers pH pendant 15 secondes, puis rincé à l'acétone pendant 30 secondes.	55
Figure 23 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution de H ₃ PO ₄ à divers pH pendant 15 secondes, puis rincé à l'acétone pendant 30 secondes.	56
Figure 24 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, traité avec une solution de H ₃ PO ₄ à divers pH pendant 15 secondes, puis rincé à l'acétone au bain à ultrasons pendant 10 minutes.	57
Figure 25 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution de H ₃ PO ₄ à divers pH pendant 15 secondes, puis rincé à l'eau pendant 30 secondes.	59
Figure 26 : Agrandissement de la soustraction spectrale du collagène lavé lyophilisé traité avec une solution de H ₃ PO ₄ à divers pH pendant 15 secondes, puis rincé à l'acétone pendant 30 secondes par le collagène lavé lyophilisé rincé à l'acétone.	60
Figure 27 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution de H ₃ PO ₄ à divers pH pendant 15 secondes, puis rincé à l'eau de pH 1,0.	61
Figure 28 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution de H ₃ PO ₄ à divers pH pendant 15 secondes, puis rincé à l'eau de pH 9,0.	63
Figure 29 : Spectre Raman de 1750 à 750 cm ⁻¹ du collagène lavé, puis lyophilisé.	66
Figure 30 : Spectres Raman d'un échantillon de collagène lavé pour différents temps d'exposition.	68
Figure 31 : Agrandissement du spectre Raman du collagène lavé et du collagène lavé, traité avec une solution de H ₃ PO ₄ de pH 0,7 pendant 15 secondes.	69
Figure 32 : Agrandissement de la soustraction spectrale Raman du collagène lavé, lyophilisé, traité 15 secondes avec une solution de H ₃ PO ₄ de pH 0,7, puis rincé à l'acétone.	70

Figure 33 : Spectre Raman de solutions de H_3PO_4 de pH 0,7 et 2,5. Les spectres n'ont subi aucune normalisation.	71
Figure 34 : Agrandissement d'un spectre Raman d'une solution de H_3PO_4 et de NaOH de pH 2,5 dont la simulation a été réalisée.....	72
Figure 35 : Détermination du pK_{a1} de l'acide phosphorique à partir de solutions par spectroscopie Raman.....	73
Figure 36 : Agrandissement du spectre Raman du collagène lavé, lyophilisé et du collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution de H_3PO_4 de pH 0,7 pendant 15 secondes, puis rincé à l'eau.	75
Figure 37 : Agrandissement de la soustraction spectrale du spectre Raman du collagène lavé, traité avec une solution de H_3PO_4 de pH 0,7 pendant 15 secondes, puis rincé à l'eau.	76

A ceux que j'aime et en souvenir de ceux qui nous ont quittés

CHAPITRE 1

1. INTRODUCTION

L'essor récent des sciences biomédicales et leurs incroyables domaines d'applications ne laissent aucune place au hasard. En effet, l'étude des matériaux est plus que jamais présente et les techniques utilisées pour les caractériser sont des plus puissantes. C'est dans ce cadre qu'ont été amorcés ces travaux, où l'utilisation de nouvelles techniques est mise à contribution afin d'étudier les surfaces de biomatériaux. Le domaine biomédical est vaste et les travaux effectués ciblent particulièrement la médecine dentaire. La restauration dentinaire est un domaine de la médecine dentaire où la chimie est mise à profit afin d'étudier et de maximiser les interactions chimiques. Les travaux entrepris envisagent d'éclaircir les interactions qui peuvent favoriser une meilleure adhésion entre les matériaux composites et la dentine. Afin de pouvoir saisir l'implication médicale des travaux réalisés, la composition de la dentine et les techniques de restauration seront exposées dans un premier temps.

1.1.Composition de la dentine

La dentine humaine est constituée essentiellement d'hydroxyapatite de calcium ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) qui est présente dans une proportion d'environ 70 % en poids. D'autres formes d'apatites se retrouvent également dans la dentine, dont l'apatite de calcium contenant du carbonate[1]. La partie organique compte pour environ 18 % et l'eau pour 12 %[2]. De la partie organique, le collagène de type I est présent dans une proportion de 90 %, ce qui laisse quelque 10 % pour le collagène de type III, les protéoglycans et les phosphoprotéines. La partie d'intérêt dans ce travail est le collagène de type I, dont la structure et la superstructure sont définies dans ce qui suit.

1.2.Le collagène

1.2.1. Structure

Le collagène est une protéine qui se retrouve dans la plupart des tissus structuraux du corps humain. Il se retrouve entre autres dans les os, la peau, les cartilages, les tendons et les dents. La structure de cette protéine est tout à fait singulière et son étude est très répandue. La structure primaire du collagène est constituée de longues chaînes d'acides aminés qui peuvent compter jusqu'à plus de 1000 résidus. Une particularité de ces chaînes est la présence de glycine à tous les trois résidus, formant un motif de répétition $(\text{Gly-X-Y})_n$. Les résidus X et Y sont divers, mais il y a une forte proportion de proline à la position X et d'hydroxyproline à la position Y[3]. La structure secondaire adopte une conformation définie par une hélice dont l'orientation tourne vers la gauche de type polyproline II[4]. Trois de ces hélices sont unies pour former une triple hélice orientée vers la droite. Cette structure se nomme triple hélice et constitue la forme la plus simple d'une molécule de collagène de type I. Il existe plusieurs types de collagènes qui se retrouvent dans les différents tissus, pas moins d'une vingtaine de types de collagènes sont identifiés et chacun de ces types peut être distingué par la composition de sa structure primaire[5]. Donc, différentes compositions d'acides aminés et différentes longueurs de chaînes justifient plus de 20 différents types de collagènes.

Le collagène de type I est caractérisé par une structure comportant deux chaînes identiques nommées $\alpha 1(\text{I})$ et d'une chaîne nommée $\alpha 2(\text{I})$. Une molécule de collagène de type I compte plus de 3000 acides aminés. La formation du collagène dentinaire de type I est un processus régi par les odontoblastes[2]. La synthèse du collagène débute dans le réticulum endoplasmique où les précurseurs du collagène sont synthétisés. Il y a d'abord production de chaînes pro- $\alpha 1$ et pro- $\alpha 2$ qui s'unissent de façon à ce qu'il y ait deux pro- $\alpha 1$ pour une pro- $\alpha 2$. Les trois chaînes se réorganisent pour former le domaine qui constitue la triple hélice. Suite à la sortie de cette molécule de procollagène hors de la cellule, il y a coupure enzymatique des bouts de

chaînes, d'où l'on obtient la molécule de collagène[6]. La molécule de collagène de type I a un diamètre de 1,5 nm et une longueur de 300 nm. Comme il est possible de le constater dans la figure 1, le collagène comporte beaucoup d'acides aminés polaires ou chargés. La distribution de ces acides aminés de façon inégale en domaines stabilise la structure grâce aux interactions intramoléculaires[7].

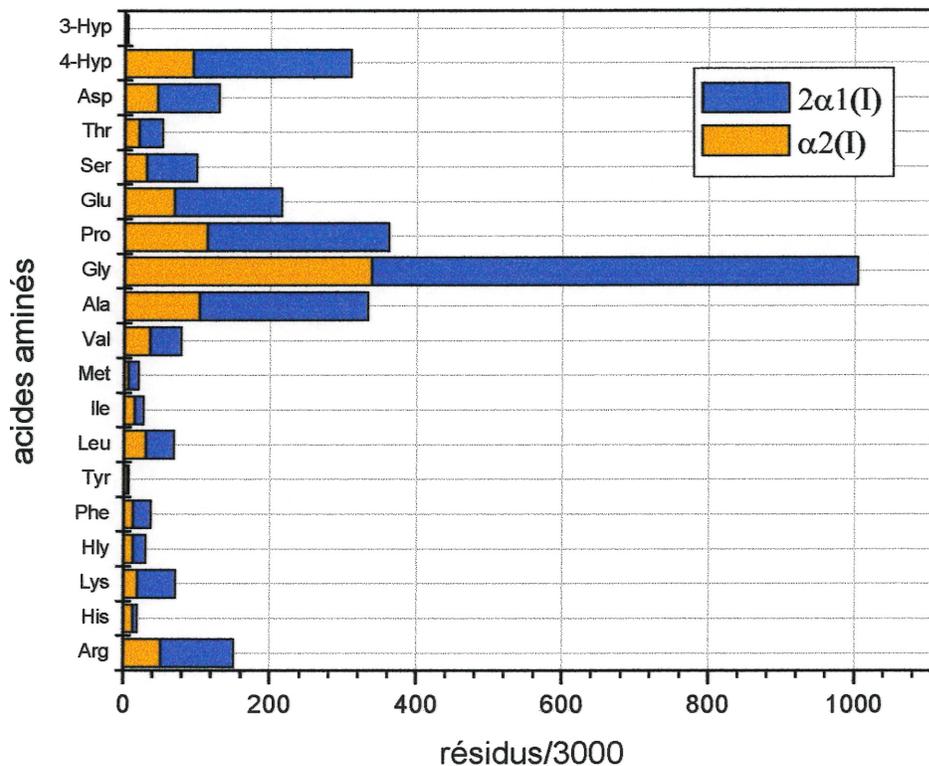


Figure 1 : Composition en acides aminés de chacun des types d'hélices du collagène de type I pour 3000 résidus[6].

La molécule de collagène est constituée d'une zone hélicoïdale à laquelle est fixée une zone non hélicoïdale à chaque extrémité. Les régions non hélicoïdales en bout de chaîne se nomment télépeptides. La zone hélicoïdale comprend la grande majorité des acides aminés constituant la molécule, soit

plus de 3000 en considérant la contribution de trois hélices α . La composition des régions non hélicoïdales est également bien définie, mais beaucoup moins importante en fait de quantité de résidus, soit entre 10 et 25[7].

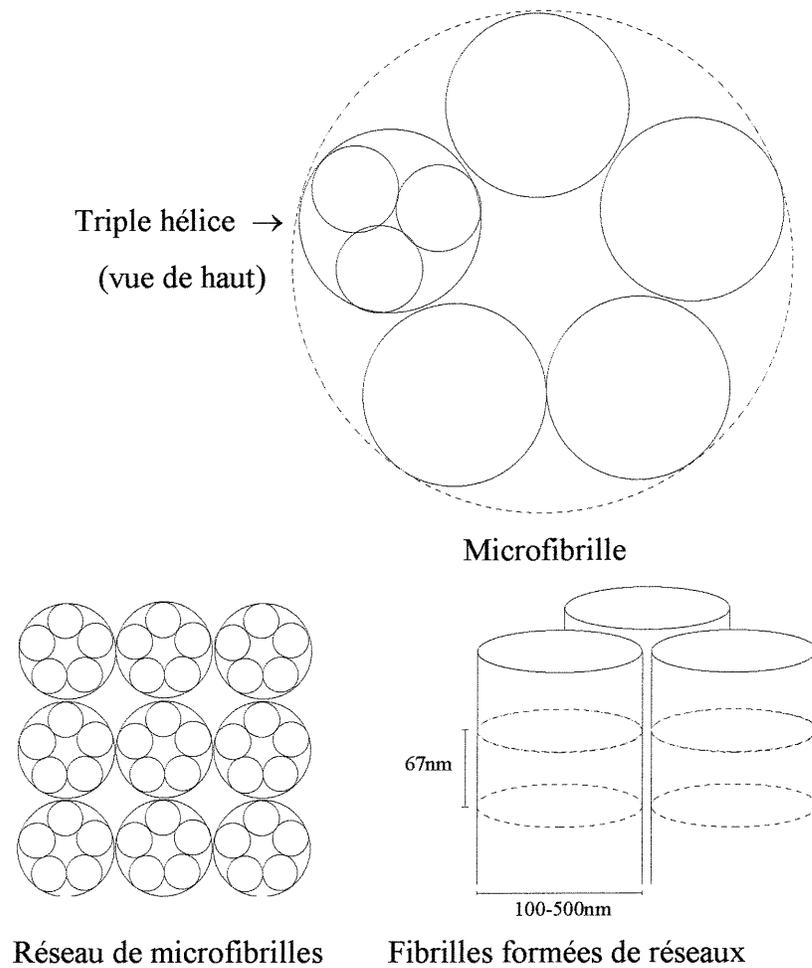


Figure 2 : Représentation des structures qui forment les fibrilles de collagène à partir de microfibrilles. La périodicité de 67 nm est indiquée au niveau des fibrilles, mais elle est présente à partir de la microfibrille, les triples hélices étant toutes décalées les unes par rapport aux autres[8].

1.2.2. *Superstructure*

Les molécules de collagène s'unissent de façon très ordonnée pour former des microfibrilles. Les microfibrilles sont formées de 5 molécules de collagène orientées parallèlement, mais toutes décalées les unes par rapport aux autres. Les molécules de collagène peuvent former des liaisons croisées et ainsi stabiliser les microfibrilles. Ces liaisons croisées témoignent des propriétés physiques du collagène, tels la solubilité et le gonflement[9]. Selon l'emplacement du collagène dans le corps, il y a divers degrés de liaisons croisées. Par exemple, les molécules de collagène provenant des os et de la dentine ont la particularité de posséder beaucoup de liaisons croisées contrairement à celles provenant de la peau et d'autres tissus fibreux. Ces liaisons sont formées par les dérivés aldéhydes de la lysine et de l'hydroxylysine ou encore de dérivés de la leucine[6]. Ces microfibrilles s'unissent à leur tour côte à côte pour former des réseaux de microfibrilles. Ces réseaux de microfibrilles s'alignent et s'ajoutent bout à bout et forment les fibrilles. Ce processus et l'aspect macroscopique des différentes étapes sont démontrés à la figure 2. Selon où sont situées les fibrilles, elles adoptent une orientation différente, dans les tendons par exemple, elles adoptent une conformation parallèle. Dans la dentine, elles adoptent une conformation plane et circulaire à la fois ; elles sont disposées sur un même plan et forment des cercles[10].

L'assemblage des fibres de collagène à partir des hélices α implique plusieurs types d'interactions. Les interactions électrostatiques sont responsables en grande partie de l'assemblage des fibrilles de collagène[6, 11]. En effet, il existe plusieurs domaines où il y a regroupement de charges et d'autres où il y a possibilité de faire des ponts hydrogène[11]. Ces domaines sont disposés de façon à ce que les molécules de collagène s'assemblent avec un décalage et ainsi, cinq molécules de collagène donnent un motif de répétition de 67 nm[6, 11]. L'édification de ces interactions électrostatiques est responsable de la stabilité du collagène sur un grand domaine de pH[12]. La

stabilité du collagène repose également en grande partie sur les interactions impliquant les dipôles et les ponts hydrogène[13-15]. La présence de l'hydroxyproline n'est pas étrangère à cette stabilité contribuant aux interactions en raison de son groupement hydroxyle.

1.3.Exposition de la dentine lors de la restauration

La restauration de dentine cariée est une opération qui remonte à bien loin dans l'histoire. Au temps des Égyptiens, l'or était déjà utilisé pour effectuer de telles tâches[16]. Avec le temps, les progrès en la matière n'ont cessé de faire avancer les pratiques, allant vers des matériaux plus performants, dont les propriétés mécaniques s'apparentent à celles de la dent, qui sont biocompatibles et ce jamais au détriment de l'esthétique. C'est dans cette perspective que sont apparus les matériaux composites. Un des objectifs des travaux portant sur ces matériaux est d'arriver à caractériser et à favoriser les interactions entre le matériau et la dentine.

Le processus de réfection d'une dent cariée comporte plusieurs étapes et celles portant sur la préparation de la surface dentaire seront décrites. Dans un premier temps, il faut enlever la partie de la dentine qui est cariée. Pour ce faire, une bure est utilisée pour enlever mécaniquement une partie de l'émail et de la dentine cariée. En fonction du matériau de remplissage utilisé, soit l'amalgame ou un matériau composite, la surface subira différents traitements. Dans le cas de l'amalgame, un vernis est appliqué sur la surface dentinaire afin de sceller celle-ci. Dans le cas des matériaux composites, les systèmes proposés cherchent à maximiser les interactions entre la dentine et l'agent liant. Dans ce dernier cas, la surface ayant été fraisée sera traitée avec un acide afin d'éliminer la boue dentinaire, de déminéraliser la surface dentinaire, d'exposer les réseaux de fibrilles de collagène et d'augmenter la microporosité de la dentine intertubulaire[17, 18].

C'est pourquoi divers agents liants sont proposés et chacun utilise une technique d'application qui lui est propre. Plusieurs d'entre eux utilisent

l'acide phosphorique pour préparer la dentine[19-21]. En effet, l'acide phosphorique est utilisé pour enlever la boue dentinaire qui se retrouve à la surface de la dentine. La boue dentinaire est composée de débris de minéraux et de collagène. Ceci nous amène à discuter des types d'adhérence qui interviennent entre l'agent liant et la dent.

1.4. Adhérence à la dentine

On peut répertorier trois types d'adhérence entre la dent et l'agent liant[18, 22]. Il y a d'abord les adhérences mécanique et micromécanique qui font intervenir les irrégularités et la microporosité à la surface de la dentine de sorte qu'il y a rétention de l'agent liant dans la structure dentinaire. Il y a également l'adhérence physique qui fait intervenir les interactions dites faibles, telles de van der Waals. De plus, il y a l'adhérence chimique qui fait intervenir les liaisons ioniques et les liaisons covalentes. C'est ce dernier type d'adhérence qui semble être le plus prometteur et duquel de plus grandes forces d'adhésion sont attendues. L'adhérence chimique fait intervenir des forces de liaison beaucoup plus grandes que l'adhérence physique. Il y a également les liaisons hydrogène qui ont des énergies de liaison assez importantes et qui contribuent à augmenter la force d'adhésion. Dans le cas de l'adhérence physique, les forces impliquées sont de l'ordre de quelques kJ/mol, dans le cas de l'adhérence chimique les forces sont beaucoup plus importantes, jusqu'à 200 kJ/mol. Dans le cas des liaisons hydrogène, leur force se situe entre celles physiques et chimiques et sont de l'ordre de 20 kJ/mol.

1.5. Dissolution de la phase minérale

Le mécanisme de dissolution de l'hydroxyapatite n'est pas encore bien connu, mais plusieurs modèles sont suggérés[23, 24]. Dans les études portant sur le collagène dentinaire, ce dernier est obtenu par dissolution de l'hydroxyapatite. Une méthode couramment utilisée pour dissoudre l'hydroxyapatite est l'utilisation de l'acide tétraacétique éthylène diamine

(EDTA) à un pH de +/- 7,4[25-27]. En traitant le collagène ainsi, les minéraux disparaissent, mais il peut demeurer des protéines autres que le collagène[28]. La dissolution de l'hydroxyapatite contenue dans la dentine a fait l'objet de plusieurs travaux, mais l'intérêt porté aux conséquences de tels traitements sur la partie organique est plus restreint.

1.6.Objectifs du projet

L'utilisation de l'acide phosphorique est courante en médecine dentaire, son impact sur la phase minérale est connu et documenté[18, 29-31]. Cependant, très peu d'informations sont disponibles au sujet de l'impact de l'utilisation de cet acide sur la phase organique qui compose la dentine. Au cours de ce travail, il sera tenté de comprendre spectroscopiquement l'impact de solutions d'acides concentrés sur le collagène insoluble de type I. Afin d'observer l'étendue de cet impact, les acides chlorhydrique, maléique et phosphorique seront utilisés. Il sera tenté de préciser les interactions entre le collagène et les groupements qu'engendrent ces acides. L'acide phosphorique sera celui qui subira l'étude la plus approfondie, ce dernier étant au coeur de plusieurs systèmes d'adhésif dentinaire. Les impacts du pH et du temps de traitement sur la nature du collagène seront étudiés. Enfin, une évaluation de l'effet du rinçage sur le type de phosphate présent sera effectuée. Les spectroscopies photoacoustique infrarouge et Raman seront utilisées afin d'étudier le collagène traité. La nature solide du collagène de type I constitue le principal obstacle à son étude spectroscopique, mais les techniques utilisées sont très bien adaptées pour des études de cette nature. La spectroscopie vibrationnelle est le choix tout indiqué pour faire ce type d'étude, elle permet d'observer la nature chimique des groupements présents à la surface, plusieurs travaux étant présentés à ce sujet[30, 32].

1.7.Références

1. M. DiRenzo, T. H. Ellis, E. Sacher et I. Stangel, *L'étude des tissus calcifiés par spectroscopie infrarouge photoacoustique*, J. Physique IV, 1997. **7 (C6)**, p. 221-228.
2. Ivar A. Mjör, *The Morphology of Dentin and Dentinogenesis*, dans *Dentin and Dentinogenesis*, Editeur Anders Linde, 1984, CRC Press, Inc.: Boca Raton. p. 1-18.
3. G. N. Ramachandran et C. Ramakrishnan, *Molecular Structure*, dans *Biochemistry of Collagen*, Editeur R.N. Ramachandran & A.H. Reddi, 1976, Plenum Press: New York. p. 45-84.
4. Ju. V. Milchevsky, B. S. Zhorov, N. G. Esipova et V. G. Tumanyan, *Two-H-Bonded and One-H-Bonded Structure Alternations in Collagen*, J. Biomolecular Structure & Dynamics, 1999. **16 (4)**, p. 977-988.
5. Edward J. Miller, *Collagen Types: Structure, Distribution and Functions*, dans *Collagen*, Editeur Marcel E. Nimni, 1988, CRC Press Inc.: Boca Raton. p. 139-156.
6. Marcel E. Nimni et Robert D. Harkness, *Molecular Structures and Functions of Collagen*, dans *Collagen*, Editeur Marcel E. Nimni, 1988, CRC Press Inc.: Boca Raton. p. 1-77.
7. Karl A. Piez, *Primary Structure*, dans *Biochemistry of Collagen*, Editeur G.N. Ramachandran & A.H. Reddi, 1976, Plenum Press: New York. p. 1-44.
8. S. Nomura, A. Hiltner, J. B. Lando et E. Baer, *Interaction of Water with Native Collagen*, Biopolymers, 1977. **16**, p. 231-246.
9. Marvin Lawrence Tanzer, *Cross-Linking*, dans *Biochemistry of Collagen*, Editeur G.N. Ramachandran & A.H. Reddi, 1976, Plenum Press: New York. p. 137-162.
10. S. Wiener et H.D. Wagner, *The Material Bone: Structure-Mechanical Function Relations*, Annu. Rev. Mater. Sci., 1998. **28**, p. 271-298.

11. A. Miller, *Molecular Packing in Collagen Fibrils*, dans *Biochemistry of Collagen*, Editeur G.N. Ramachandran & A.H. Reddi, 1976, Plenum Press: New York. p. 85-136.
12. Manju Grover Venugopal, John A. M. Ramshaw, Emory Braswell, Dan Zhu et Barbara Brodsky, *Electrostatic Interactions in Collagen-like Triple-Helical Peptides*, *Biochemistry*, 1994. **33** , p. 7948-7956.
13. Steven K. Holmgren, Kimberley M. Taylor, Lynn E. Bretscher et Ronald T. Raines, *Code for collagen's stability deciphered*, *Nature*, 1998. **392** , p. 666-667.
14. G. N. Ramachandran, M. Bansal et R. S. Bhatnagar, *A Hypothesis on the Role of Hydroxyproline in Stabilizing Collagen Structure*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1973. **322** , p. 166-171.
15. Luigi Vitagliano, George Némethy, Adrina Zagari et Harold A. Scheraga, *Stabilization of the Triple-Helical Structure of Natural Collagen by Side-Chain Interactions*, *Biochemistry*, 1993. **32** , p. 7354-7359.
16. Jack L. Ferracane, *Materials in Dentistry: Principles and Applications*. J. B. Lippincott Company éd. 1995, Philadelphia. 360.
17. David H. Pashley, Bernard Ciucchi, Hidehiko Sano et Jack A. Horner, *Permeability of dentin to adhesive agents*, *Quintessence Int.*, 1993. **24** , p. 618-631.
18. J. D. Eick, A. J. Gwinnett, D. H. Pashley et S. J. Robinson, *Currents Concepts on Adhesion to Dentin*, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1997. **8** (3), p. 306-335.
19. John Kanca, *Etchant composition and bond strength to dentin*, *Am. J. Dent.*, 1993. **6** , p. 287-290.
20. John Kanca, *Resin bonding to wet substrate. I. Bonding to dentin*, *Quintessence Int.*, 1992. **23** , p. 39-41.
21. Ario Santini et Stephen Mitchell, *A scanning electron microscopic study of the effect of Gluma CPS bonding system on dentinal smear layers produced*

- by different bur types and rotational speeds and on the resin-dentin interface, *Quintessence Int.*, 1998. **29** , p. 737-747.
22. Françoise Roth, *Les composites*. 1991, Paris: Masson. 211.
23. Sergey V. Dorozhkin, *Surface Reactions of Apatite Dissolution*, *J. Colloid and Interface Science*, 1997. **191** , p. 489-497.
24. M. DiRenzo, *et al.*, *Adhesion to dentin: studies of surface chemical reactions towards the goal of improved bonding*, *Canadian Journal of Chemistry*, 1998. **76** (11), p. 1668-1673.
25. Zhizhong Cao, Lizi Huang et Jiying Jiang, *A scanning electron microscopic observation of inner carious dentin after cleansing and of the dentin-resin interface*, *Quintessence Int.*, 1992. **23** , p. 439-444.
26. L. Breschi, P. Gobbi, G. Mazzotti, T. H. Ellis, E. Sacher et I. Stangel, *Field emission in-lens SEM study of enamel and dentin*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999. **46** , p. 315-323.
27. Arthur Veis et Robert J. Schlueter, *The Macromolecular Organization of Dentine Matrix Collagen. I. Characterization of Dentine Collagen*, *Biochemistry*, 1964. **3** (11), p. 1650-1657.
28. Jean Curley-Joseph et Arthur Veis, *The Nature of Covalent Complexes of Phosphoproteins with Collagen in the Bovine Dentin Matrix*, *J. Dent. Res.*, 1979. **58** (6), p. 1625-1633.
29. George Eliades, Georgios Palaghias et George Vougiouklakis, *Effect of acid conditioners on dentin morphology, molecular composition and collagen conformation in situ*, *Dental Materials*, 1997. **13** , p. 24-33.
30. R. Lemor, M. B. Kruger, D. M. Wieliczka, P. Spencer et T. May, *Dentin etch chemistry investigated by Raman and infrared spectroscopy*, *J. Raman Spectrosc.*, 2000. **31** , p. 171-176.
31. F. El Feninat, T. H. Ellis, E. Sacher et I. Stangel, *Moisture-dependent renaturation of collagen in phosphoric acid etched human dentin*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998. **42** , p. 549-553.

32. Angela Carden et Michael D. Morris, *Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review)*, J. Biomedical Optics, 2000. **5** (3), p. 259-268.

CHAPITRE 2

2. PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les travaux effectués se divisent en deux grands axes, l'étude du collagène lavé, puis traité avec des acides et l'étude du collagène lavé, lyophilisé, puis traité avec l'acide phosphorique. La plus grande partie des travaux a nécessité l'utilisation de la spectroscopie photoacoustique, mais la spectroscopie Raman a également été sollicitée. Les paramètres expérimentaux concernant les techniques spectroscopiques utilisées seront d'abord exposés. Les techniques de préparation des échantillons seront expliquées par la suite.

2.1.Spectroscopie photoacoustique

L'effet photoacoustique a été découvert accidentellement en 1880 par Alexander Graham Bell. Par la suite, l'effet photoacoustique n'a pas été étudié pendant près de 50 ans. Ce n'est que dans les années 70 que l'effet photoacoustique fut utilisé à des fins expérimentales sur des solides[1]. Plus de 90 années se sont écoulées avant que l'effet ne soit appliqué à l'étude des solides. L'un des principaux avantages de l'utilisation de la spectroscopie photoacoustique réside dans le peu de préparation requise pour effectuer les mesures. L'échantillon peut être introduit sans préparation antérieure et l'acquisition pratiquée. Cette technique permet d'effectuer des traitements successifs sur une même surface en ayant la possibilité de faire l'acquisition d'un spectre après chacune des étapes du traitement. L'information chimique disponible à partir de ces spectres en utilisant une source infrarouge est essentiellement la même que celle obtenue avec un spectromètre infrarouge en mode transmission.

2.1.1. Effet photoacoustique

Les radiations qui frappent l'échantillon et qui conduisent au signal photoacoustique sont soumises à plusieurs transferts énergétiques. La

compréhension du signal photoacoustique passe par l'interprétation de la génération de ce signal. Les radiations frappant la surface de l'échantillon sont en partie réfléchies et en partie absorbées. Définissons P_0 comme étant la puissance de la radiation frappant l'échantillon. De cette puissance, $(1-R)$ est absorbée par l'échantillon, où R est la fraction de la lumière réfléchie par la surface de l'échantillon. Il s'en suit donc que la puissance qui atteint la surface de l'échantillon et qui y pénètre à peine est donnée par $P_1 = (1-R)P_0$. L'absorption de la radiation à mesure que celle-ci va en profondeur contribue à la décroissance de la puissance de la radiation à une profondeur x définie par $P_2 = (1-R)P_0 e^{-\alpha x}$. Où α définit le coefficient d'absorption de l'échantillon. La puissance pouvant être transformée en chaleur dans l'intervalle dx est proportionnelle à $(1-R)P_0 \alpha e^{-\alpha x}$. Ce transfert de chaleur résulte de la première onde thermique d'amplitude ΔT_1 qui est proportionnelle à $(1-R)P_0 \alpha e^{-\alpha x}$. Or, l'amplitude de l'onde thermique responsable du transfert de chaleur au gaz est définie par ΔT_2 et cette deuxième est proportionnelle à $(1-R)P_0 \alpha e^{-(\alpha+\alpha_s)x}$ où α_s est le coefficient de diffusion thermique[2]. Il est donc possible de constater que l'énergie dégagée par l'échantillon provient de la partie la plus près de la surface. Selon la théorie de Rosencwaig-Gersho, il n'y aurait qu'une très faible épaisseur de gaz qui subit des changements de température dus aux transferts de chaleur[1]. Cette couche de gaz agirait comme piston sur le reste de la colonne de gaz afin de créer des variations de pression pouvant être détecté par le microphone. Des informations plus détaillées sont disponibles dans le mémoire de Mauro DiRenzo[3].

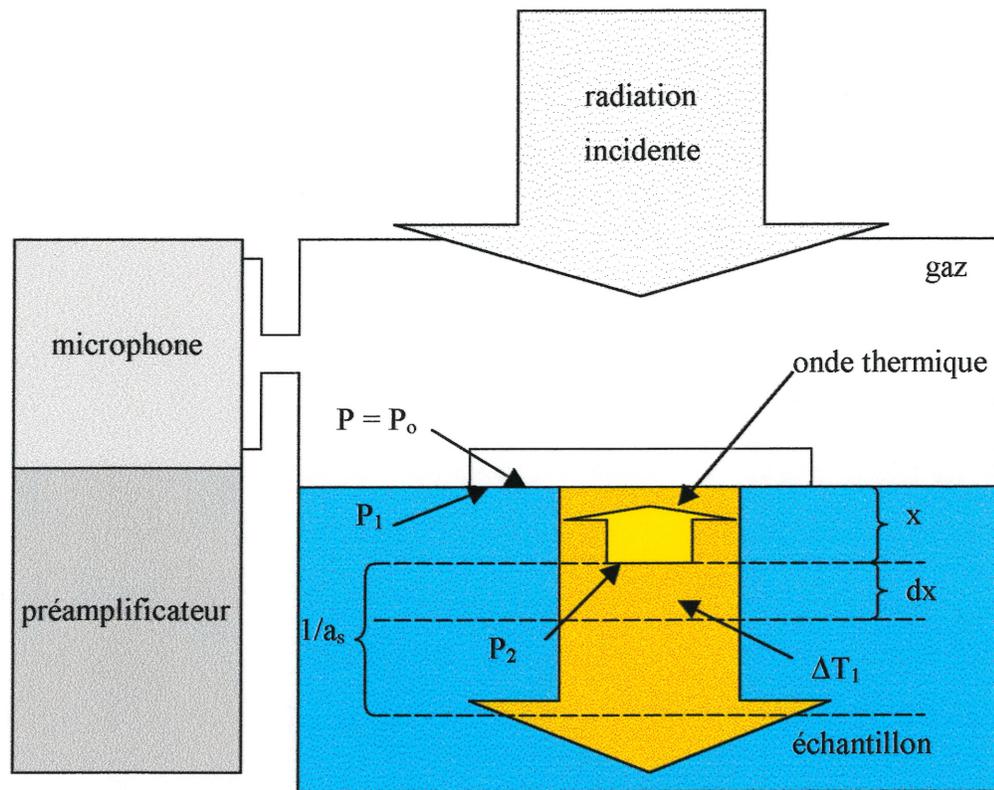


Figure 3 : Représentation schématique de la génération du signal photoacoustique dans une dimension[2].

2.1.2. Cellule photoacoustique

Voici l'aperçu d'une cellule photoacoustique à des fins d'études de solides. La cellule est constituée d'une fenêtre laissant passer les radiations de la source. Dans la cellule, un miroir est disposé de façon à diriger les radiations vers l'échantillon qui est disposé orthogonalement par rapport à celles-ci. La cellule contient un microphone qui est disposé au bout d'un conduit servant à canaliser le signal depuis l'enceinte où est disposé l'échantillon. Le signal recueilli au microphone est amplifié par un amplificateur électronique à même la cellule. Le volume de gaz dans la cellule doit être le plus petit possible afin d'augmenter le signal, ce dernier étant inversement proportionnel au volume de gaz dans la cellule[1].

2.1.3. Le gaz porteur

Le gaz porteur peut être divers, mais il doit posséder de bonnes propriétés de conductivité thermique. C'est pour cette raison que l'utilisation de He est très répandue[1, 2]. Plus important encore, le gaz ne doit pas absorber en infrarouge dans la région étudiée. L'azote peut également être utilisé comme gaz porteur.

2.1.4. La source

Les sources utilisées pour faire l'étude des phénomènes photoacoustiques peuvent être de diverses formes. Il est possible de retrouver entre autres des ouvrages sur des sources cohérentes et incohérentes dans le domaine des radiations optiques. Pour les fins qui nous intéressent, les sources infrarouges seront utilisées. Afin d'observer l'effet photoacoustique, il doit y avoir modulation de l'intensité de la radiation. L'utilisation d'un spectromètre à transformée de Fourier est tout indiquée pour l'étude photoacoustique en utilisant une source infrarouge. D'abord, toutes les fréquences sont étudiées simultanément, le rapport signal/bruit est supérieur pour un même temps d'acquisition, ceci constitue l'avantage de Fellgett. L'intensité des radiations est plus importante comme elles se rendent toutes à l'échantillon, ceci définit l'avantage évoqué par Jacquinot[1].

2.1.5. Appareillage

Un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier de marque Mattson Research Series FTIR RS-1 (Mattson Instruments, Madison, WI) a été utilisé. À ce spectromètre a été couplée une cellule photoacoustique 300 de MTEC (MTEC Photoacoustics, Ames, IA) afin de recueillir les spectres infrarouges des échantillons. L'interface est assurée par le logiciel WinFIRST version 2.10. Dans ces conditions, la technique est définie comme étant la spectroscopie photoacoustique infrarouge à transformée de Fourier et son acronyme est PA-IRTF.

2.1.6. Acquisition de spectres PA-IRTF

Les échantillons sont placés dans le support à échantillon de la cellule photoacoustique et des purges ouvertes et fermées d'une minute sont effectuées. La cellule est ensuite scellée. Le gaz utilisé pour la purge est le gaz porteur qui est l'hélium. Le débit du gaz est réglé à $10 \text{ cm}^3\text{s}^{-1}$. La purge pour le spectromètre est ajustée à $20 \text{ cm}^3\text{s}^{-1}$ pour la durée des mesures. Pour juger si la purge d'hélium dans la cellule est suffisamment longue, le signal du CO_2 est observé et s'il n'apparaît pas, la purge est jugée satisfaisante. Sinon la purge dite fermée est laissée plus longtemps, jusqu'à ce que ce signal ne soit plus présent. Les paramètres d'acquisition sont les suivants dans tous les cas, 250 spectres sont recueillis et additionnés pour donner l'interférogramme. La fréquence du miroir mobile est de 1,6 kHz, ce qui correspond à une vitesse de 0,098 cm/s. La résolution du spectromètre est de 8 cm^{-1} . Une fonction « zero-filling » est appliquée 2 fois aux données brutes afin d'augmenter la résolution digitale. L'apodization effectuée est de type triangle et elle fait partie des fonctions d'apodization par défaut du logiciel WinFIRST. La carte d'acquisition offre une plage de potentiel de +5 à -5 volts, le gain est ajusté de façon à ce que le signal ait une amplitude maximale de 6,5 volts et minimale de 2 volts. Cet ajustement est effectué afin d'utiliser la plage de potentiel de la carte d'acquisition au maximum.

2.2. Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman a été utilisée en complémentarité à l'infrarouge. Deux raisons s'imposent pour une telle utilisation, d'abord la présence d'eau est beaucoup moins dommageable sur l'ensemble du spectre qu'elle ne l'est en infrarouge. De plus, le signal du phosphate est moins évasé en Raman qu'il ne l'est en infrarouge et une assignation du groupement H_3PO_4 et H_2PO_4^- est possible. Il faut également mentionner que la spectroscopie Raman est une technique de diffusion, ce qui permet plus facilement l'étude d'échantillons opaques.

La spectroscopie Raman utilise une source laser afin de pouvoir être observée. De telles sources excitent les molécules jusqu'à un niveau virtuel d'où elles relaxent vers un niveau vibrationnel plus ou moins élevé que leur niveau initial. Si le niveau atteint suite à la relaxation est supérieur en énergie au niveau initial, le phénomène est appelé diffusion Stokes. Dans le cas où le niveau atteint suite à la relaxation est inférieur en énergie, le phénomène est appelé diffusion Anti-Stokes. Dans les présentes expériences, ce sera la bande Stokes qui sera observée car la population majoritaire se situe au niveau de vibration zéro à la température de la pièce. Dans le cas où la lumière effectue une collision élastique avec la molécule, il n'y a pas de phénomène Raman qui survient et ce phénomène se nomme diffusion Rayleigh.

2.2.1. Appareillage

Quatre sources lasers étaient disponibles pour effectuer les mesures. Il y avait deux lasers à argon ; un bleu émettant à 488 nm et un vert à 514 nm. Une raie dans le rouge provenant d'un laser hélium-néon à 632 nm était disponible également. Enfin, un laser à diode émettant dans l'infrarouge et de longueur d'onde de 782 nm a été utilisé. La puissance de tels lasers est de l'ordre de moins de 25 milliwatts.

Un microscope spectromètre Raman de marque Renishaw série 3000 (Renishaw, Hoffman Estates, IL) a été utilisé pour faire l'acquisition des spectres Raman. Le microscope sert à faire la mise au point et est lié optiquement au spectromètre. Le logiciel utilisé pour faire l'acquisition est le Grams/32®.

2.2.2. Acquisition des spectres Raman

Avant de procéder à la prise de spectres d'échantillons, un spectre du silicium est pris afin de référencer le système. Avant toutes les séances de travail, cette étape est répétée et le signal maximal du silicium est assigné à $520,5 \text{ cm}^{-1}$. Toutes les mesures subséquentes se réfèrent donc à ce spectre de

référence. Les échantillons sont placés sur le plateau mobile et la mise au point est effectuée. Pour ce faire, une première mise au point est faite avec la lumière blanche, puis avec le faisceau laser. Les domaines d'acquisitions sont variables, mais il est commun de balayer de 1800 à 200 cm^{-1} . Des temps d'intégration de 30 secondes sont utilisés et le nombre de balayages varie en fonction du rapport signal sur bruit désiré, mais un minimum de 10 balayages sont effectués. L'objectif utilisé est le 50x à longue distance de travail. La surface des échantillons n'étant pas uniforme, l'objectif 50x standard ne peut être utilisé sans risquer d'abîmer la lentille. Les raies laser utilisées sont celles à 514, 633 et 782 nm. La puissance du laser est laissée à 100 % afin de diminuer la fluorescence le plus possible. Une explication sera apportée à ce sujet au chapitre 5.

2.3.Première série d'échantillons

Le collagène de type I insoluble utilisé a été acheté chez Sigma. Il provient de tendons d'Achille de bovins et son numéro de lot est le 124H7060. Un échantillon typique est constitué de 0,0100 g de collagène qui est lavé 10 minutes au bain à ultrasons dans 10 mL d'acétone afin d'enlever les impuretés. À la suite de ce lavage, le collagène est récupéré à l'aide d'une spatule et placé dans un vial. Le tout est placé sous vide pendant au moins une heure avant la poursuite des traitements. Suite à ces traitements, les échantillons de collagène sont traités avec des acides pendant divers temps à divers pH. Les acides utilisés sont l'acide chlorhydrique, l'acide maléique et l'acide phosphorique. Les temps d'exposition sont de 15, 30, 60, 120, 300 et 600 secondes. Les pH utilisés sont 0,7, 1, 1,5, 2 et 2,5 sauf pour l'acide maléique qui a été utilisé à des pH de 1,0 et 1,5 seulement. À la suite du traitement, les échantillons sont rincés à l'acétone. Le traitement s'effectue comme suit; les échantillons sont placés quantitativement dans un vial contenant 10 mL de la solution acide puis retirés et placés dans un vial contenant 10 mL d'acétone. Ces vials sont placés au bain à ultrasons pendant 10 minutes. Suite à ces rinçages, le collagène est récupéré

et placé à nouveau dans un vial puis mis sous vide pendant 24 heures. L'acquisition des spectres est ensuite effectuée.

2.4. Deuxième série d'échantillons.

Le collagène utilisé est le même, mais il n'est pas préparé de la même façon. Une quantité de 0,0100 g est utilisée et lavée pendant 10 minutes dans 10 mL d'acétone dans le but d'éliminer les impuretés. Suite à ce lavage, le collagène est placé quantitativement dans un support de polyéthylène de 0,9 cm de diamètre. L'échantillon est placé sous vide pendant 1 heure au moins. Une fois le séchage terminé 200 μ L d'eau millipore sont ajoutés aux échantillons et il y a incubation pendant une heure à la température de la pièce, puis les échantillons sont plongés dans l'azote liquide et lyophilisés pendant 24 heures. Ces échantillons sont ensuite soumis à l'acide phosphorique à raison de 100 μ L à des pH compris entre 0,7 et 5,0 pendant 15 secondes toujours dans le support de polyéthylène. Pour rincer ces échantillons, un jet d'eau ou d'acétone a été employé pendant 30 secondes en utilisant une spatule pour maintenir l'échantillon dans le support. Puis les échantillons sont mis sous vide dans le cas de ceux rincés à l'acétone, gelés et soumis à la lyophilisation dans le cas de ceux rincés à l'eau, le tout 24 heures. L'acquisition des spectres est faite par la suite.

D'autres échantillons ont subi un traitement similaire, mais leur rinçage fut tout autre. Des solutions de pH 1,0 et de 9,0 furent également préparées, en utilisant de l'acide chlorhydrique et de l'hydroxyde de sodium. Des échantillons de collagène lyophilisés et traités avec l'acide phosphorique ont été rincés pendant 30 secondes avec ces solutions et certains échantillons ont été rincés 30 secondes de plus avec de l'eau ou de l'acétone.

2.5.Solutions acides

Les solutions acides sont préparées à différents pH en utilisant l'acide phosphorique à 85 %, l'acide chlorhydrique à 37 % et l'acide maléique à 99 % sous forme solide. L'eau millipore est utilisée pour la préparation des solutions et son pH est d'environ 5. Le pH des solutions a été déterminé en utilisant un pH-mètre Oakton 35615-03 calibré en quatre points, soit aux pH 1,68, 4, 7, 10. De plus, une série de solutions d'acide phosphorique a été préparée entre 0,7 et 2,5. Pour ce faire, la solution de 0,7 a subi des ajouts successifs d'hydroxyde de sodium afin d'augmenter le pH et de maintenir le signal phosphate élevé. Cette série d'échantillons sera utilisée pour l'étude Raman du signal phosphate.

2.6.Lyophilisation

La lyophilisation consiste à retirer les molécules d'eau d'un substrat par sublimation de la glace. La formation de la glace se fait rapidement en plongeant les échantillons dans l'azote liquide, ce qui conduit à la formation rapide de cristaux de glace[4]. Le retrait des molécules d'eau qui se fait sous vide, laisse des cavités dans la structure du substrat. Ce retrait des molécules d'eau ne contribue pas à l'effondrement de la structure du substrat comme c'est le cas si ce dernier n'est pas gelé avant la mise sous vide. La pompe mécanique utilisée donne un vide semblable à la pompe utilisée pour les échantillons mis simplement sous vide, sans lyophilisation.

2.7.Références

1. Allan Rosencwaig, *Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy*. 1980, New York: John Wiley & Sons. 309.
2. J. F. McClelland, *Photoacoustic Spectroscopy*, Analytical Chemistry, 1983. **55** (1), p. 89A-105A.
3. Mauro DiRenzo, *Étude spectroscopique par FTIR photoacoustique de l'interaction entre un adhésif dentinaire et la dentine humaine*, Chimie, 1993, Université de Montréal, Montréal.
4. B. Luyet, *On the Mechanism of Growth of Ice Crystals in Aqueous Solutions and on the Effect of Rapid Cooling in Hindering Crystallization*, dans *Recent Research in Freezing & Drying*, Editeur A.S Parkes & Audrey U. Smith, 1960, Charles C. Thomas: Springfield, Illinois. p. 3-22.

CHAPITRE 3

3. SPECTROSCOPIE PHOTOACOUSTIQUE, RÉSULTATS ET DISCUSSION ; ÉCHANTILLONS DE COLLAGÈNE LAVÉ

3.1. Collagène lavé

Pour comparer le collagène traité avec les solutions acides et le collagène natif, le spectre du collagène lavé a été pris à la suite de son lavage dans l'acétone. Ce spectre servira de référence pour les échantillons n'ayant pas subi de lyophilisation et il est représenté à la figure 4.

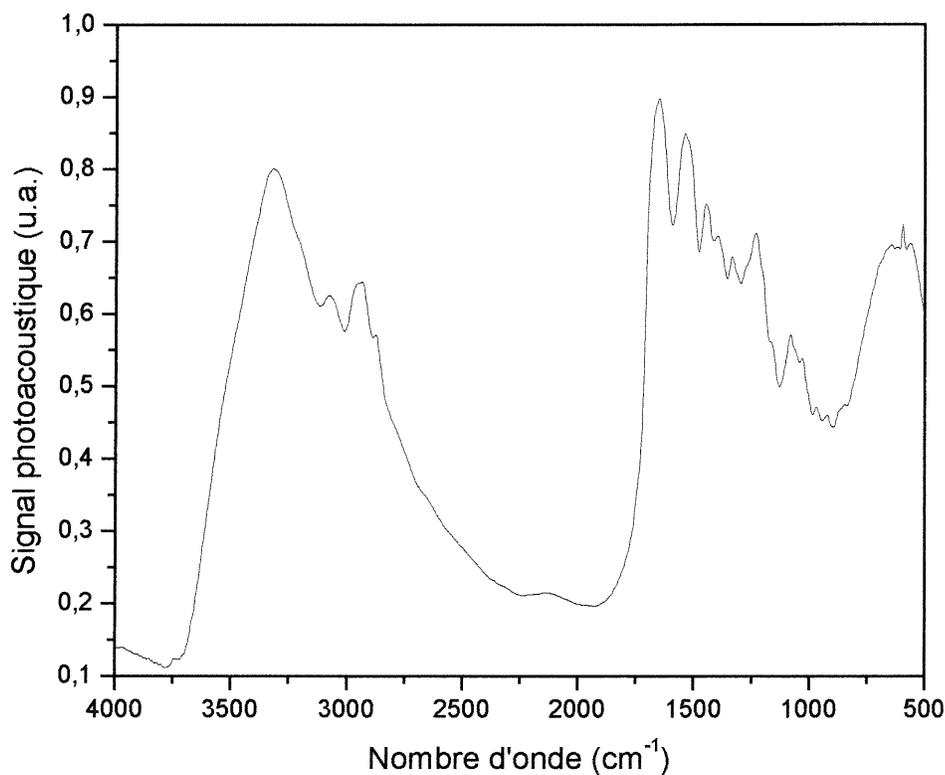


Figure 4 : Spectre photoacoustique infrarouge du collagène lavé avec de l'acétone pendant 10 minutes au bain à ultrasons, puis sous vide pendant 1 heure.

Les bandes caractéristiques des liens peptidiques sont présentées dans le tableau 1. Il y a beaucoup de bandes étant donné la nature de l'échantillon qui est une imposante protéine. L'étude du collagène par infrarouge se veut assez complexe, donc il sera difficile d'observer l'apparition ou le déplacement de nouvelles bandes. La figure 4 en est la preuve, les signaux sont intenses, mais les bandes sont mal résolues, plusieurs pics se chevauchant.

désignation	(cm^{-1})	description
Amide A	3300	NH(s)
Amide B	3100	NH(s)
Amide I	1650	C=O(s) C-N(s) NH(d)
Amide II	1560	C-N(s) N-H(d)
Amide III	1300	C=O(s) C-N(s) N-H(d) O=C-N(d) Autres

Tableau 1 : Désignation et description des bandes amides caractéristiques des peptides en infrarouge[1]. s : étirements, d : déformation.

Dans le cas de la bande amide I qui est une combinaison des étirements C=O, C-N et du cisaillement N-H, il sera difficile d'extraire l'information de toutes ces contributions. Normalement, il est possible d'extraire de l'information quant à la structure secondaire de la protéine par la forme de la bande amide I[2].

Pour arriver à faire l'étude spectroscopique de l'apparition de nouvelles bandes ou le déplacement de bandes, la soustraction spectrale a été utilisée. Cette façon de procéder consiste à soustraire, du spectre du collagène traité avec les solutions acides, le spectre du collagène lavé qui se veut la référence. Comme le signal n'est pas constant pour tous les échantillons, l'intensité de la

bande à 1539 cm^{-1} a été utilisée pour la normalisation. Les facteurs qui influencent le signal sont divers, mais les principaux sont la quantité de collagène utilisé pour faire l'acquisition et la texture macroscopique du collagène. C'est pour ces motifs qu'une normalisation a été effectuée. La bande amide II a été utilisée pour procéder à la normalisation en raison de l'apparition d'un signal contribuant à la bande amide I à la suite du traitement à l'acide chlorhydrique.

3.2. Collagène lavé, traité avec une solution de HCl

L'étude de la stabilité du collagène de type I à la suite d'un traitement avec des solutions acides sera entreprise avec l'acide chlorhydrique. D'abord parce que HCl est complètement dissocié en solution et surtout parce qu'il n'y aura pas de contribution de Cl⁻ en IR. Ceci nous permet d'étudier l'effet du pH sur le collagène. Le spectre du collagène lavé, traité pendant 60 secondes avec une solution de HCl de pH 0,7 est présenté à la figure 5. Comme il est possible de le constater, le spectre est très semblable à celui du collagène lavé présenté à la figure 4. Pour trouver les différences subtiles qui ont pu se manifester, mais qui ne sont pas visibles directement, une soustraction spectrale est effectuée et le spectre obtenu est représenté à la figure 6. Il est possible de voir qu'il y a un signal qui apparaît à 1732 cm^{-1} et ce signal est attribué aux carbonyles.

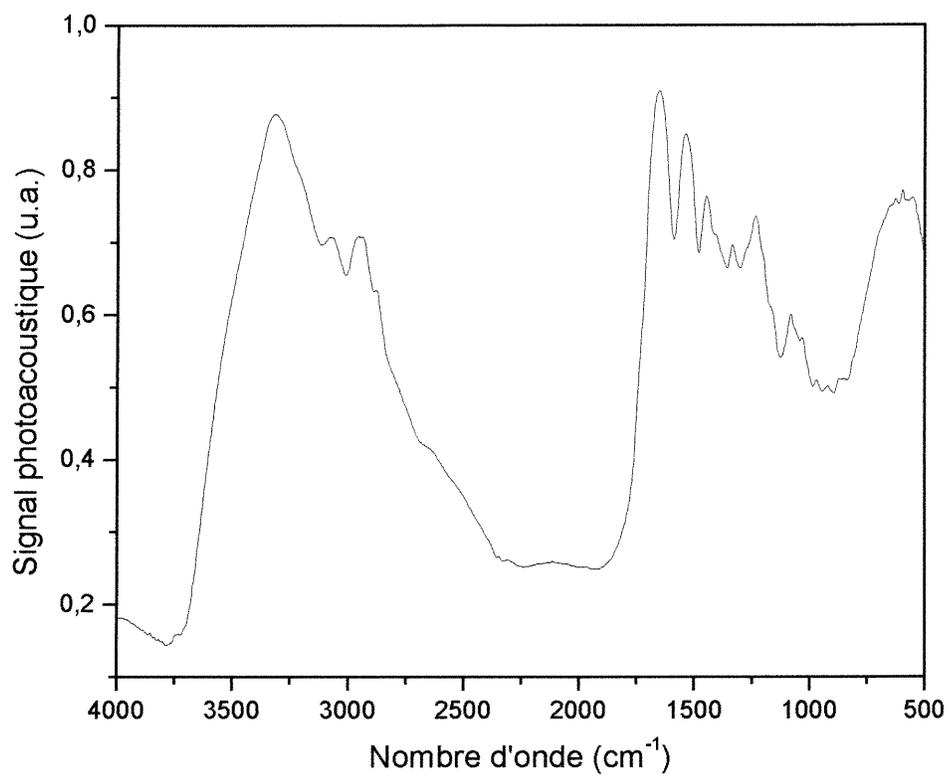


Figure 5 : Spectre photoacoustique infrarouge du collagène lavé, traité pendant 60 secondes avec une solution de HCl de pH 0,7, puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes.

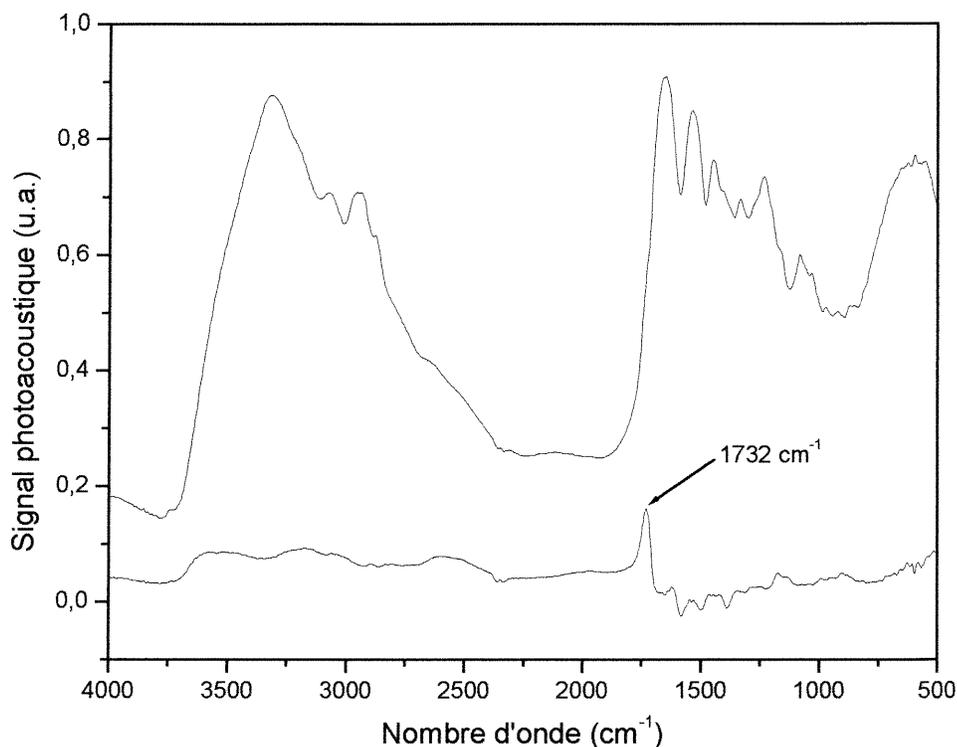


Figure 6 : Soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, traité avec une solution de HCl de pH 0,7, puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes. La référence utilisée est le collagène lavé. Le spectre du collagène lavé est présenté. Les spectres sont normalisés à 1539 cm^{-1} .

3.2.1. Protonation des chaînes latérales

Plusieurs groupements absorbent près de 1700 cm^{-1} , mais le traitement avec une solution de HCl conduit à l'hypothèse que des protons seront admis dans le collagène et donc que les régions susceptibles d'accepter les protons doivent être ciblées. La région des acides carboxyliques est une avenue intéressante, car il est admis que le collagène possède une bonne proportion d'acide glutamique et d'acide aspartique comme en fait foi la figure 1[3, 4]. Ces chaînes latérales des acides aminés sont chargées négativement à des pH supérieurs à 4,31, leur pKa respectif étant de 4,31 et de 3,90[5].

Lorsque le collagène est sous la forme native, les chaînes latérales des acides aminés Glu et Asp sont chargées. La protonation des chaînes latérales, à la suite du traitement avec des solutions acides, peut être observée à l'aide des

figures 7 et 8 où il est possible de voir que l'augmentation du signal à 1732 cm^{-1} conduit à une diminution du signal à 1589 et 1392 cm^{-1} . Le premier signal est dû au carbonyle de l'acide et les deux dernières régions correspondent aux ions carboxylates.

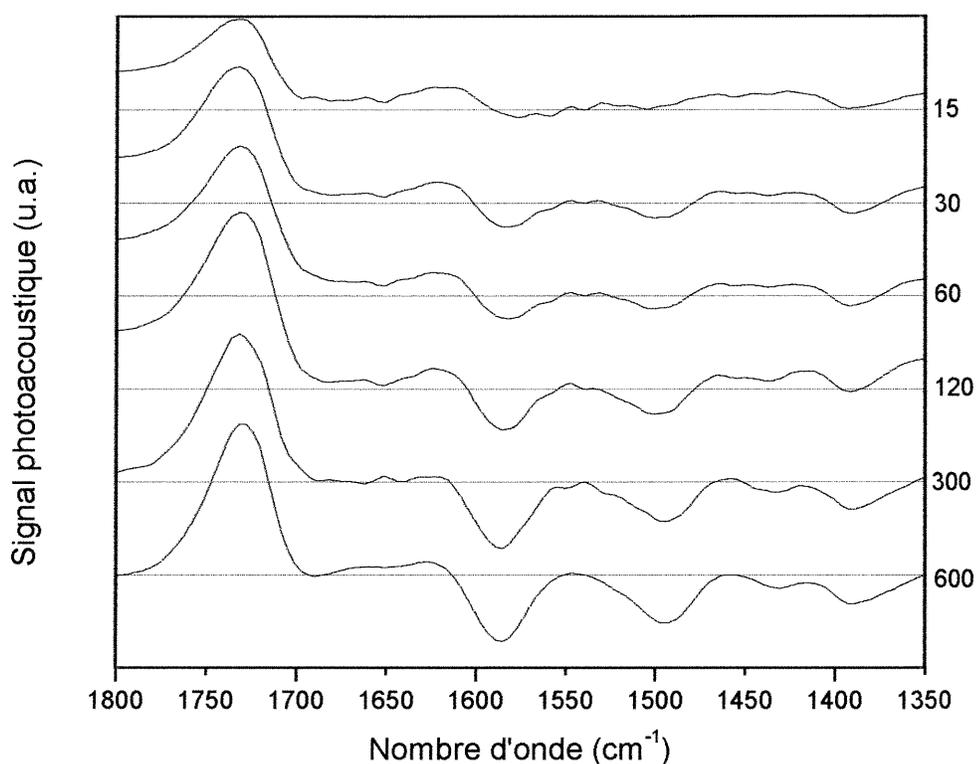


Figure 7 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, traité avec une solution de HCl de pH de 0,7 pendant divers temps, puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes. La référence utilisée est le collagène lavé. Les spectres sont normalisés à 1539 cm^{-1} .

Le traitement du collagène avec une solution acide se traduit par le passage de la forme ionique à la forme protonée des chaînes latérales d'acides carboxyliques tel qu'illustré à la figure 6. Les signaux à 1589 et 1392 cm^{-1} sont attribuables respectivement aux étirements asymétrique et symétrique des anions carboxylates[6, 7]. La tendance s'accroît plus le temps d'exposition

est long. De façon analogue, plus le pH est bas et plus l'intensité de la bande à 1732 cm^{-1} augmente alors que les deux autres de plus faible énergie diminuent comme l'indique la figure 8.

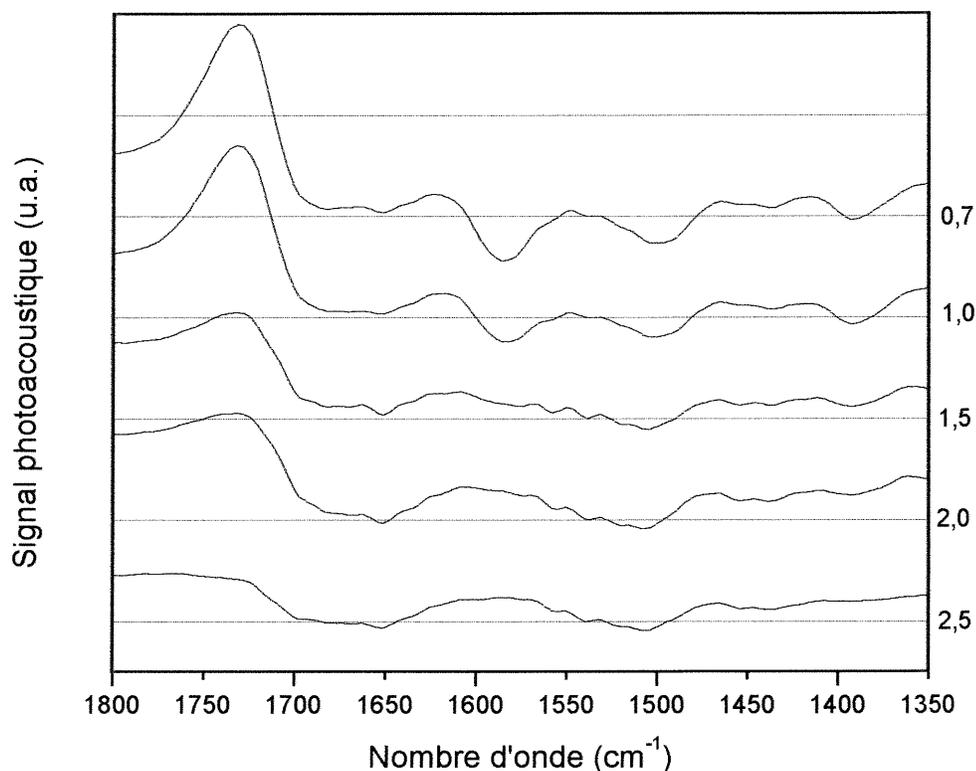


Figure 8 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, traité avec une solution de HCl à divers pH pendant 120 secondes, puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes. La référence utilisée est le collagène lavé. Les spectres sont normalisés à 1539 cm^{-1} .

Deux effets sont observés, celui relatif au pH et celui relatif au temps d'exposition. L'influence du pH semble être l'effet prédominant, car pour des pH supérieurs à 1,5, il est difficile d'observer la variation de ces bandes même pour de longues expositions. Il faut donc que le pH soit inférieur ou égal à 1,5 pour qu'une différence de signal soit significative. Pour les pH 0,7 et 1,0, il y a

une nette corrélation entre le temps d'exposition et l'intensité de ces bandes, cette corrélation temps-intensité constitue le second processus observé.

3.2.2. *Protonation des bouts de chaînes*

Une autre explication possible quant aux bandes des carbonyles qui changent selon le pH de la solution concerne les bouts de chaînes protéiniques C terminaux. À des pH aussi bas, il est possible que les bouts de chaînes carbonyles soient susceptibles d'être protonés également, leur pKa étant de l'ordre de 2. Les carbonyles des bouts de chaînes sont donc chargés à pH physiologique. Cette explication est tout à fait justifiée par l'allure des spectres des figures 7 et 8. Le signal issu de cette protonation viendrait s'ajouter à celui de la protonation des chaînes latérales. La contribution du signal dû aux chaînes latérales est plus importante que pour les bouts de chaîne. Ceci s'explique sachant que pour chaque carbonyle de bout de chaîne, il y a environ 73 carbonyles de chaîne latérale, il apparaît donc que la majorité du signal proviendrait de cette dernière région.

3.2.3. *Bris de liaisons peptidiques, signal des ions ammoniums*

Un autre phénomène pouvant expliquer la croissance du signal dans la région des acides carboxyliques est le bris du lien amide. Un tel bris contribuerait non seulement à varier le signal dans les régions mentionnées précédemment, mais également dans la région des ions ammonium. Il y a la présence de plusieurs bandes dans la région des énergies plus élevées de la figure 6, mais elles sont larges. Celle qui correspond aux ions ammonium est définie par un épaulement entre 2675 et 2350 cm^{-1} . La présence de cette bande à de faibles pH de même que l'augmentation de son intensité à des temps d'exposition plus longs indiquent qu'il y aurait protonation des amines des acides iminés proline et hydroxyproline. Les amines chlorhydriques tertiaires ($\text{R}_3\text{NH}^+\text{Cl}^-$) absorbent dans la région comprise entre 2700 et 2300 cm^{-1} [8]. Cette bande ne serait donc pas issue de bris de liaisons. Les bandes des ions

ammoniums des amines primaires ou secondaires sont présentes à de plus hautes énergies, soit entre 3200 et 2700 cm^{-1} [8]. Il est possible d'observer une contribution dans ce domaine sur la figure 6. Il est cependant possible que quelques liens se soient brisés, ce qui expliquerait en partie la présence du signal des ions ammoniums. Il a été considéré que le bris de quelques liens n'avait pas d'incidence sur la bande amide II utilisée pour normaliser les spectres. La contribution des liaisons brisées étant jugée faible par rapport à la contribution de la bande amide II. Il a été prouvé que la constante de vitesse d'hydrolyse de liens peptidiques est plus grande à faible pH[9]. De plus, il est montré que la triple hélice est stable dans un domaine de pH de 1 à 13[3]. Pour faire l'étude des compositions en peptides du collagène, l'hydrolyse des liens peptidiques est effectuée avec des solutions de HCl 12 M à 108 °C pendant 18 heures[10]. Le signal des carbonyles ne permet pas à lui seul de tirer de conclusions quant au bris de liaisons, ces derniers pouvant provenir des chaînes latérales comprenant les acides glutamiques et aspartiques.

3.2.4. *Dénaturation du collagène*

Dans le présent travail, la dénaturation désignera un changement d'un état macroscopique, par exemple, la perturbation de la structure fibrillaire du collagène[11]. Ce changement peut être causé par la température, le pH ou bien d'autres facteurs. Avec les résultats obtenus, il n'est pas possible d'affirmer si le collagène a subi une dénaturation et l'étude du signal de la bande amide I suppose le contraire. En effet, la transition de la forme native à la forme gélatineuse est un type caractéristique de dénaturation du collagène[12]. En spectroscopie infrarouge, une telle transition s'accompagne par le déplacement de la bande amide I vers des nombres d'ondes de moindre énergie[12-14]. Dans le cas présent, un tel déplacement n'a pas été observé ce qui suppose que le collagène n'a pas subi de dénaturation.

3.2.5. Conclusion partielle

Le collagène possède un point isoélectrique à un pH situé entre 4,5 et 6,5[15, 16]. La détermination approximative de ce pI peut être réalisée en considérant le plus grand nombre d'acides aminés acides plutôt que basiques dans le collagène de type I. Les acides aminés acides tendent à faire diminuer le pI alors que ceux basiques le font augmenter. Le collagène possédera donc un surplus de charges positives aux pH étudiés et par analogie, il possédera une charge négative à pH neutre. La présence d'un contre ion est de mise pour stabiliser la structure. Or, le principal anion disponible est le chlorure, mais il n'est pas possible de l'observer en infrarouge. De plus, il a été observé qu'il n'y avait pas d'évidence spectroscopique de la dénaturation du collagène. Dans ce qui suit, l'acide maléique est utilisé et il sera ainsi possible d'observer la présence des ions maléates grâce à leur signal en infrarouge.

3.3. Collagène lavé, traité avec une solution d'acide maléique

L'acide maléique présente un signal en infrarouge, contrairement à l'acide chlorhydrique. Il sera donc possible d'observer l'évolution de son signal en fonction du temps d'exposition et du pH utilisé. Comme il a été possible de le déterminer dans la partie précédente, des groupes carbonyles du collagène sont protonés. Il n'a cependant pas été possible de déterminer s'il y avait introduction d'une nouvelle espèce ionique pour stabiliser la structure. C'est avec cette perspective que l'étude du collagène traité avec des solutions d'acide maléique a été entreprise. L'acide maléique est un acide diprotique dont les pKa sont 1,83 et 6,07[5]. Sa structure est relativement simple comme en fait foi la figure 9.

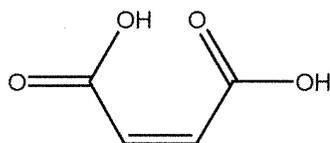


Figure 9 : Acide maléique.

Les solutions acides utilisées sont de pH 1,0 et 1,5. Le collagène est exposé pour des périodes de temps comprises entre 15 et 600 secondes. La figure 10 présente un spectre du collagène lavé, traité avec une solution d'acide maléique de pH 1,0 pendant 60 secondes, puis rincé à l'acétone. Il est possible d'y observer les bandes caractéristiques du collagène avec quelques subtiles modifications dans les régions 1740, 1365 et 1210 cm^{-1} . Ces régions sont caractéristiques de l'acide maléique. Le signal à 1740 cm^{-1} provient de l'étirement du lien C=O, celui à 1365 cm^{-1} de la déformation dans le plan du lien OH et celui à 1210 cm^{-1} à l'étirement du lien C-O[8].

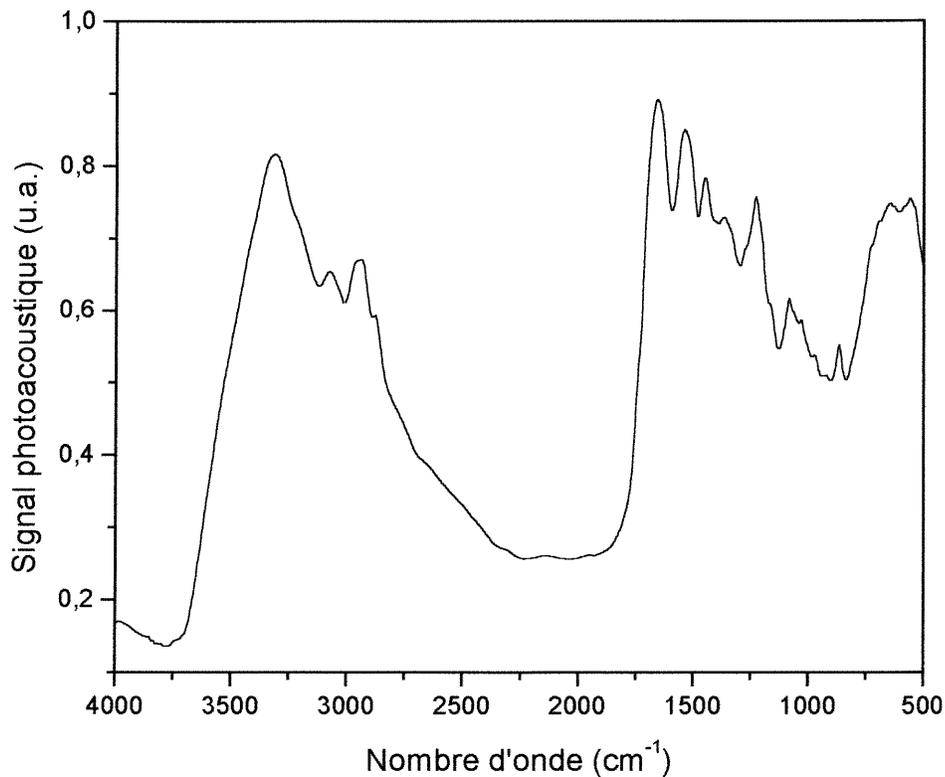


Figure 10 : Spectre photoacoustique infrarouge du collagène lavé, traité pendant 60 secondes avec une solution d'acide maléique de pH 1,0 puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes.

Pour observer plus en détails ces zones, une soustraction spectrale est effectuée en utilisant le collagène lavé comme référence. Le nombre d'onde utilisé pour la normalisation est 1539 cm^{-1} . Les résultats des soustractions spectrales sont présentés à la figure 11. Pour une solution d'acide de pH 1,0, divers temps d'exposition sont présentés. Il est possible d'observer la corrélation entre le temps d'exposition et les signaux issus de la soustraction. Ces signaux proviennent de l'acide maléique. Plus le temps d'exposition est long, plus les signaux sont importants. La bande à 1740 cm^{-1} se superpose à la bande observée avec l'acide chlorhydrique et qui correspondait aux acides carboxyliques protonés par la solution acide.

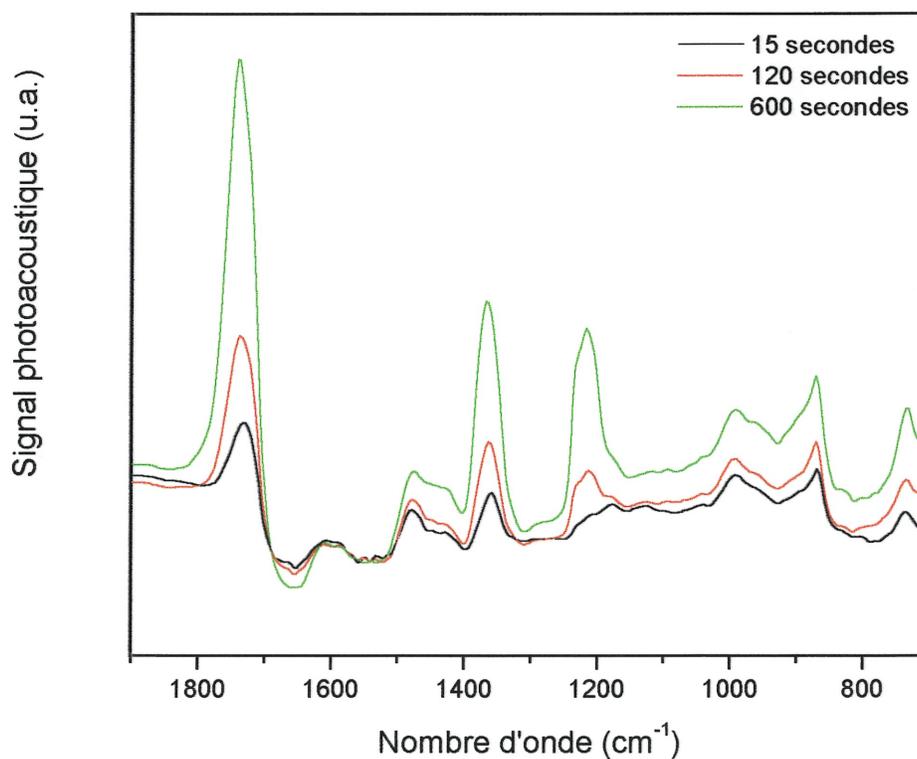


Figure 11 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, traité avec une solution d'acide maléique de pH 1,0, puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes. La référence utilisée est le collagène lavé. Les spectres sont normalisés à 1539 cm^{-1} .

Dans le cas de l'acide maléique, il est impossible de juger s'il y a protonation des chaînes latérales du collagène ou non. Contrairement au cas de l'acide chlorhydrique, l'augmentation du signal provient certainement en grande partie de l'acide lui-même ou de son ion maléate. La figure 12 présente le spectre de l'acide maléique sous forme solide. La bande à 1740 cm^{-1} est également présente sur le spectre de l'acide maléique. Cette bande est due à la vibration du groupement carbonyle de l'acide maléique. Il est intéressant de noter qu'il n'y a qu'une trace de contribution de l'acide maléique avec le traitement à un pH de 1,5, et ce même avec une exposition de 600 secondes. Pour 600 secondes d'exposition à un pH de 1,5, le signal est plus faible que pour une exposition de 15 secondes à un pH de 1,0. Il y a donc un impact du pH sur la rétention de l'acide maléique. Il est vrai cependant que pour obtenir une solution de pH de 1,0, il a été nécessaire d'ajouter beaucoup plus d'acide maléique sous forme solide que pour la solution de pH de 1,5. L'importante concentration d'acide maléique est directement responsable du signal observé à bas pH. Le tableau 2 présente en effet les concentrations des acides utilisés et il faut beaucoup plus d'acide maléique que d'acide chlorhydrique pour un même pH. Or, le domaine de pH correspond à ce qui a été observé pour l'acide chlorhydrique, où le signal pour la bande carbonyle était plus intense pour le pH 1,0 que pour 1,5 comme la figure 8 l'indiquait. De plus, sur cette même figure, les bandes correspondant aux chaînes latérales ionisées à 1589 et 1392 cm^{-1} ne disparaissent qu'aux pH 0,7 et 1,0.

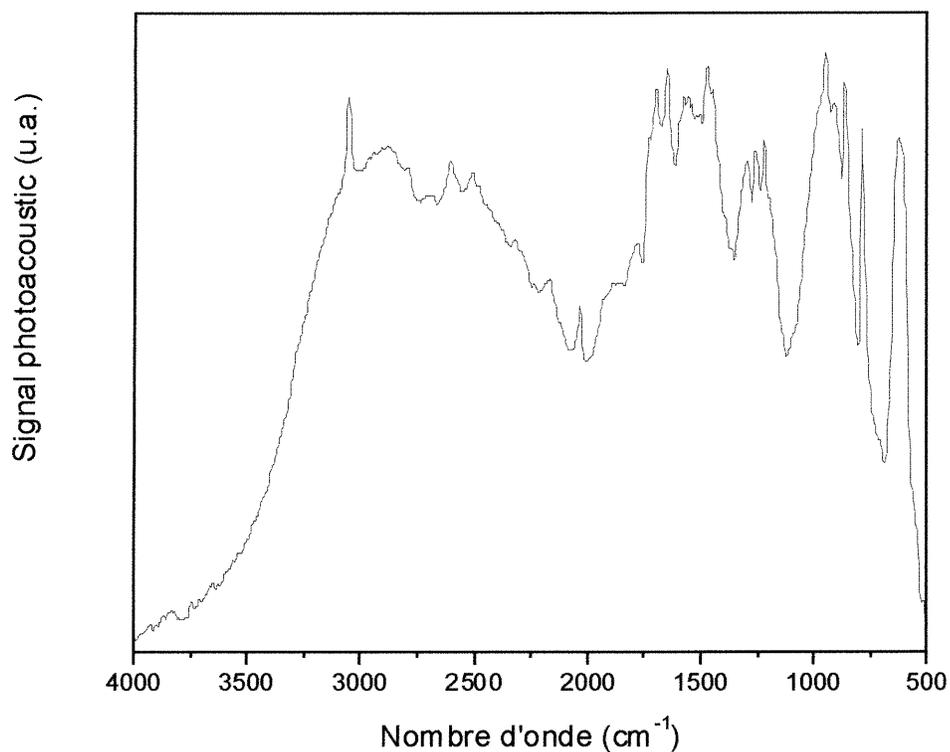


Figure 12 : Spectre photoacoustique infrarouge de l'acide maléique sous forme de cristaux.

Dans le cas des deux acides utilisés il semble se produire un phénomène entre les pH 1,0 et 1,5 qui s'explique par la protonation du collagène dans ce domaine. L'étape de protonation du collagène ne peut être observée avec l'acide maléique en raison des bandes vibrationnelles communes de ce dernier avec l'effet étudié. De ce fait, il n'est pas possible de déterminer si l'espèce adsorbée est l'acide maléique, son anion ou les deux.

pH	concentration d'acide pour obtenir le pH indiqué (mol/L)		
	acide chlorhydrique	acide phosphorique	acide maléique
0.7	0.2	5.4	
1.0	0.1	1.5	0.8
1.5	0.03	0.2	0.1
2.0	0.01	0.02	
2.5	0.003	0.005	

Tableau 2 : Représentation des concentrations de chacun des acides utilisés afin d'obtenir le pH indiqué. (Les concentrations ont été calculées à partir des pKa de chacun des acides)

3.4. Collagène lavé, traité avec une solution de H₃PO₄

Le collagène lavé, ayant subi un traitement à l'acide phosphorique, présente des bandes fort différentes de celles observées à la suite du traitement à l'acide chlorhydrique et de l'acide maléique. La figure 13 présente un spectre photoacoustique infrarouge du collagène traité pendant 60 secondes avec une solution d'H₃PO₄ de pH de 0,7. Une bande caractéristique apparaît dans la région de 950 cm⁻¹. Cette bande est attribuable à plusieurs groupements phosphate et leur assignation demandera une étude plus approfondie.

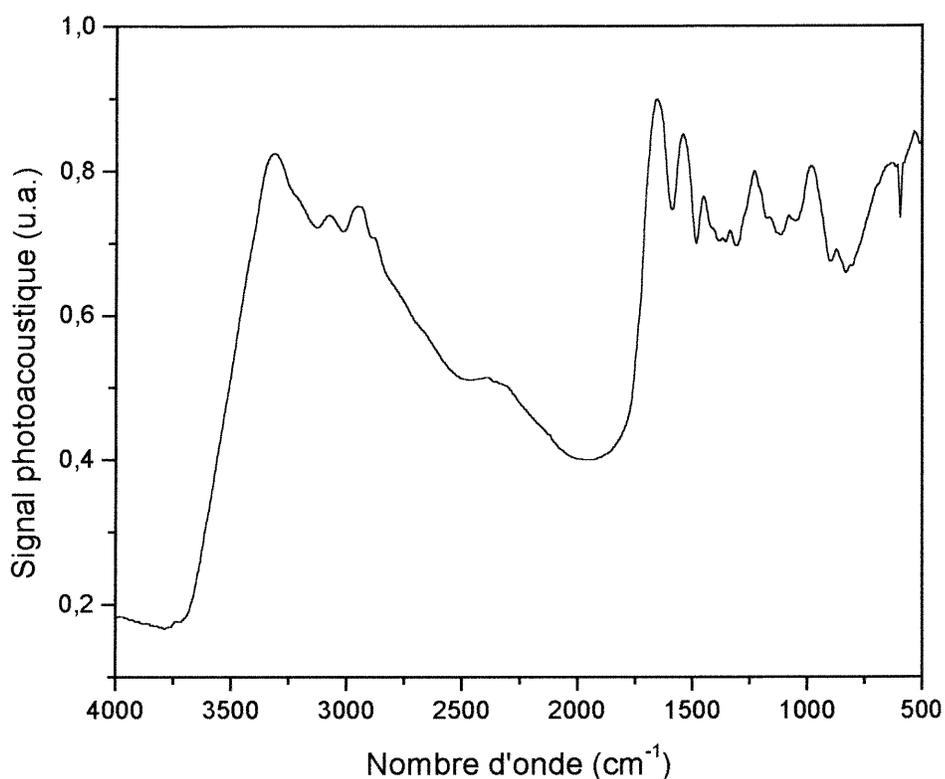


Figure 13 : Spectre photoacoustique infrarouge du collagène lavé, traité pendant 60 secondes avec une solution de H_3PO_4 de pH 0,7, puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes.

La soustraction spectrale sera à nouveau utilisée pour déterminer la contribution due au traitement par rapport au collagène lavé. L'agrandissement d'une soustraction de spectres de collagène lavé, traité pendant 60 secondes à différents pH est présenté à la figure 14. Il est possible d'observer qu'à des pH inférieurs à 1,5 il y a de nouvelles bandes d'une certaine intensité alors qu'aux pH 2,0 et 2,5, il n'y a pas de différences majeures. Des échantillons traités 15 secondes présentent des spectres très similaires à ceux traités 60 secondes. L'agrandissement d'une soustraction de tels spectres est présenté à la figure 15.

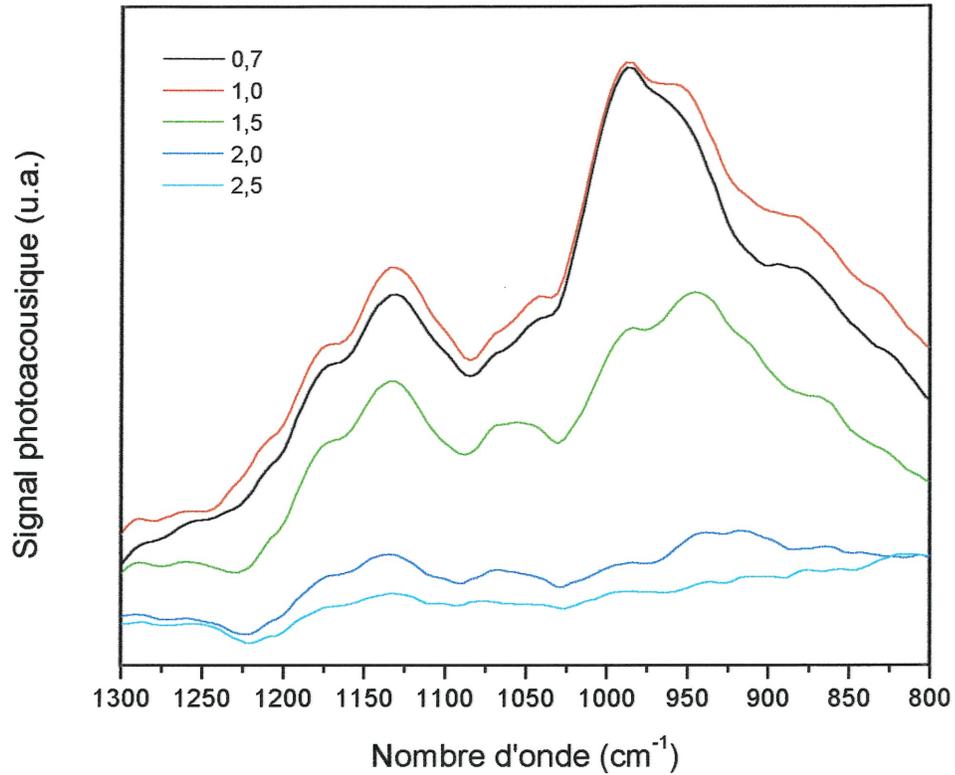


Figure 14 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, traité avec une solution de H_3PO_4 à divers pH pendant 60 secondes, puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes. La référence utilisée est le collagène lavé. Les spectres sont normalisés à 1539 cm^{-1} .

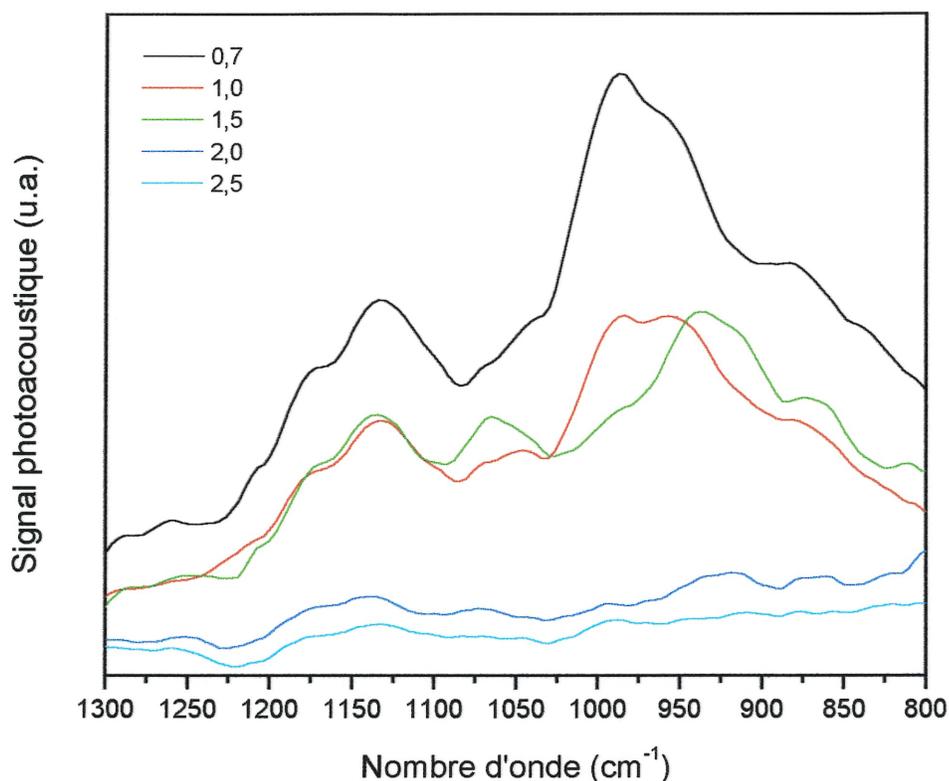


Figure 15 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, traité avec une solution de H_3PO_4 à divers pH pendant 15 secondes, puis rincé à l'acétone au bain à ultrasons pendant 10 minutes. La référence utilisée est le collagène lavé. Les spectres sont normalisés à 1539 cm^{-1} .

3.4.1. Région de $1200\text{ à }900\text{ cm}^{-1}$

Il est possible de voir sur la figure 1 que les bandes qui prennent naissance à $1053\text{ et }945\text{ cm}^{-1}$ à un pH de 2,0 gagnent en intensité lorsque le pH diminue. À un pH de 1,5, la bande à 945 cm^{-1} est déplacée vers de plus grands nombres d'onde. Une augmentation du signal est aussi observée pour les bandes à $1134\text{ et }987\text{ cm}^{-1}$. Ces bandes augmentent en intensité également en fonction du temps pour les pH de moins de 2,0. Pour les pH 0,7 et 1,0, la progression du signal est très rapide en fonction du temps d'exposition. Dans le cas du pH de 1,0, il est possible de voir la croissance du signal en fonction du temps sur la

figure 16. Il est possible d'observer que le signal n'est pas nul même pour une exposition de 15 secondes.

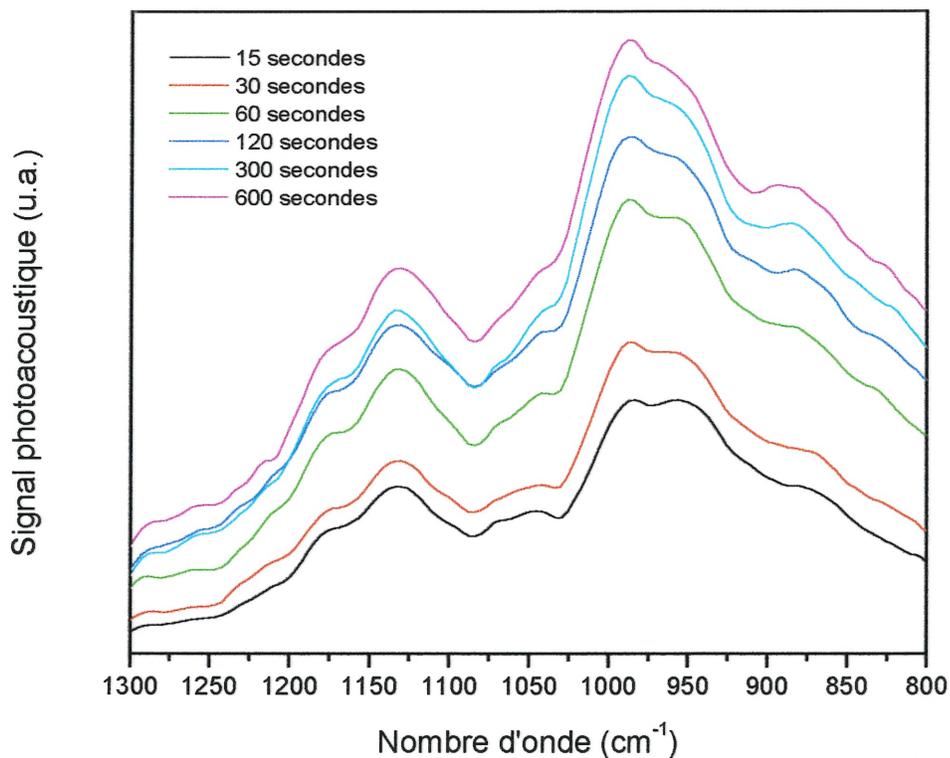


Figure 16 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, traité avec une solution de H₃PO₄ de pH 1,0 pendant divers temps, puis rincé à l'acétone pendant 10 minutes. La référence utilisée est le collagène lavé. Les spectres sont normalisés à 1539 cm⁻¹.

Il y a encore une fois deux effets qui contribuent à l'intensité du signal du phosphate, le temps d'exposition et le pH des solutions. L'effet du pH est l'effet limitant, car au-delà de 1,5, il est plus difficile d'observer des variations dans les signaux. D'autre part, pour une exposition de 15 secondes à une solution de pH 0,7, le signal est très intense dans la région ciblée. En effet, pour les échantillons traités avec les solutions de pH 2,0 et 2,5 aucun changement significatif n'affecte les spectres pour de courts temps

d'exposition. Dans le cas des échantillons traités avec la solution de pH 2,5, il n'y a qu'une faible contribution au signal pour 600 secondes d'exposition.

Les signaux observés à 987 et 945 cm^{-1} sont assignés à l'étirement du groupement P-O(H) et sont attribués respectivement à H_3PO_4 et H_2PO_4^- [8, 17]. La présence de H_2PO_4^- contribue au signal dans le domaine de 1134 et 1052 cm^{-1} en raison des étirements asymétrique et symétrique de la liaison PO_2^- [8, 17]. Pour ce qui est du signal à 1134 cm^{-1} , il y a également une contribution due à l'étirement du lien P=O[8, 18]. Le tout est très cohérent avec les résultats obtenus, présentés aux figures 14, 15 et 16, où les faibles pH donnent le signal à 987 cm^{-1} dû au H_3PO_4 et les pH plus élevés le signal à 945 cm^{-1} dû au H_2PO_4^- .

désignation	(cm^{-1})
H_3PO_4 P-O(H)	1040-910
H_2PO_4^- P-O(H)	950-900
HPO_4^{2-} P-O(H)	900-830
P=O	1300-1140
(P)O-H	2700-1600
PO_2^-	1185-1056

Tableau 3 : Désignation des bandes attribuables aux étirements des phosphates et de l'acide phosphorique en infrarouge[8, 17, 18].

3.4.2. Région de 2700 à 2300 cm^{-1}

Une autre région présente des caractéristiques fort intéressantes dans l'étude des interactions de l'acide phosphorique avec le collagène. La région comprise entre 2700 et 1600 cm^{-1} est reconnue pour présenter des signaux des acides contenant POOH[8, 17-19]. Ces bandes sont dues à l'étirement du lien OH qui absorbent dans un domaine particulier lorsqu'il fait partie d'un composé acide du phosphore[18]. Comme il est possible de le constater sur la figure 13, ce

signal est large et d'une intensité moyenne. Il trouve son centre à 2350 cm^{-1} et l'analyse de la bande due aux ions ammoniums qui présente un signal entre 2675 et 2350 cm^{-1} s'en trouve compromise. Il ne sera donc pas possible d'étudier la présence des ions ammonium lorsque l'acide phosphorique sera utilisé pour traiter le collagène. Dans le cas du (P)O-H, il est possible de constater que la contribution est proportionnelle au signal dans la région entre 1000 et 900 cm^{-1} . Tout comme dans la région de plus basse énergie, cette bande n'est présente que pour les solutions acides de pH de 1,5 et moins. De plus, dans le cas des pH 2,0 et 2,5 il n'y a aucun signal même après une exposition de 600 secondes.

3.4.3. *Les pKa de l'acide phosphorique*

L'acide phosphorique est un acide polyprotique qui présente trois pKa qui sont respectivement 2,16, 7,21 et 12,32[5]. Le pKa de 2,16 de l'acide phosphorique est compris dans le domaine de pH étudié. Il faut noter que dans le cas du collagène traité avec l'acide phosphorique, le pH où il est possible d'observer un changement marquant sur les spectres est entre 1,5 et 2,0. Il est vrai qu'à un pH inférieur à 2,16, l'acide phosphorique est majoritairement sous la forme protonée H_3PO_4 et qu'au dessus du pKa, l'espèce la plus présente est sous la forme ionique H_2PO_4^- . Cependant, en observant les résultats obtenus pour le collagène traité avec l'acide chlorhydrique, il est possible de voir que le collagène en soi est sensible à un pH critique d'environ 2. En plus des effets de pH et de temps d'exposition, il y a également le simple fait qu'à des pH de 2 et plus, la concentration de phosphates est beaucoup moins importante qu'à des pH plus faibles comme l'indique le tableau 2. De toute évidence, des quantités beaucoup plus faibles d'acide concentré doivent être ajoutées pour avoir des pH près de 2. Alors que pour des pH de 0,7, il faut compter environ 35 % en poids d'acide phosphorique dans l'eau. Une explication à la forte intensité du signal phosphate est donc la concentration de l'espèce phosphore. Outre cette explication, il est possible de voir sur la figure 14 que l'intensité du signal est la

même pour les pH de 0,7 et 1,0. La forme est cependant différente, le signal à 1,0 présentant un épaulement plus important dans la région de 950 cm^{-1} . Un épaulement qui peut être dû à la plus grande présence des ions H_2PO_4^- . L'effet de concentration est donc à considérer dans l'évaluation de l'intensité des bandes.

3.4.4. Conclusion partielle

Le collagène est sensible aux solutions d'acide phosphorique à des pH inférieurs à 2,0 et pour ces pH, il y a croissance du signal en fonction du temps. Les pH 0,7 et 1,0 présentent un signal d'une intensité significative après seulement 15 secondes d'exposition dans le cas de l'acide phosphorique et de l'acide chlorhydrique. Contrairement au cas du collagène traité avec les solutions d'acide chlorhydrique, le signal du phosphate est perceptible. Pour les pH 2,0 et plus, il n'y a que des effets mineurs observés. Il y a donc un phénomène qui dépend du pH et non de l'anion. En contrepartie, le signal obtenu est influencé par l'ion. Il s'avère qu'en plus des effets du temps d'exposition et du pH, il y a la concentration qui contribue au signal phosphate de toute vraisemblance.

3.5. Références

1. Timasheff, S.N. and G.D. Fasman, *Structure and Stability of Biological Macromolecules.*, New York: Marcel Dekker, 1969.
2. Surewicz, W.K., H.H. Mantsch, and D. Chapman, *Determination of Protein Secondary Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A Critical Assessment.* *Biochemistry*, **2**(32): p. 389-394, 1993.
3. Payne, K.J. and A. Veis, *Fourier Transform IR Spectroscopy of Collagen and Gelatin Solutions: Deconvolution of the Amide I Band for Conformational Studies.* *Biopolymers*, **27**: p. 1749-1760, 1988.
4. Bandekar, J., *Amide modes and protein conformation.* *Biochimica et Biophysica Acta*, **1120**: p. 123-143, 1992.
5. Venugopal, M.G., *et al.*, *Electrostatic Interactions in Collagen-like Triple-Helical Peptides.* *Biochemistry*, **33**: p. 7948-7956, 1994.
6. Nimni, M.E. and R.D. Harkness, *Molecular Structures and Functions of Collagen*, dans *Collagen*, M.E. Nimni, Editeur, CRC Press Inc.: Boca Raton. p. 1-77, 1988.
7. Lide, D.R., ed. *CRC Handbook of Chemistry and Physics.* 80^{ième} ed. ., CRC Press: New York, 1999-2000.
8. Bellamy, L.J., *Amides, Proteins and Polypeptides*, dans *The Infra-red Spectra of Complex Molecules.*, John Wiley & Sons: New York. p. 175-199, 1954.
9. Jordan, C.E., *et al.*, *Characterization of Poly-L-lysine Adsorption onto Alkanethiol-Modified Gold Surfaces with Polarization-Modulation Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Surface Plasmon Resonance Measurements.* *Langmuir*, **10**: p. 3642-3648, 1994.
10. Colthup, N.B., L.H. Daly, and S.E. Wiberley, *Introduction to Infrared and Raman spectroscopy.* 3rd ed, ed. N.B. Colthup., New York: Academic Press Inc. 547, 1990.
11. Smith, R.M. and D.E. Hansen, *The pH-Rate Profile for the Hydrolysis of a Peptide Bond.* *J. Am. Chem. Soc.*, **120**: p. 8910-8913, 1998.

12. Dung, S.-Z., *et al.*, *Degradation of Insoluble Bovine Collagen and Human Dentine Collagen Pretreated in vitro with Lactic Acid, pH 4,0 and 5,5.* Archs oral Biol., **39**(10): p. 901-905, 1994.
13. Feninat, F.E., *et al.*, *Moisture-dependent renaturation of collagen in phosphoric acid etched human dentin.* J. Biomed. Mater. Res., **42**: p. 549-553, 1998.
14. Vyavahare, N., *et al.*, *Mechanisms of bioprosthetic heart valve failure: Fatigue causes collagen denaturation and glycosaminoglycan loss.* J Biomed Mater Res, **46**: p. 44-50, 1999.
15. Radhika, M. and P.K. Sehgal, *Studies on the desamidation of the bovine collagen.* Journal of Biomedical Materials Research, **35**: p. 497-503, 1997.
16. Nezu, T. and F.M. Winnik, *Interaction of water-soluble collagen with poly(acrylic acid).* Biomaterials, **21**: p. 415-419, 2000.
17. Bellamy, L.J., *Inorganic Ions*, dans *The Infra-red Spectra of Complex Molecules.*, John Wiley & Sons: New York. p. 282-287, 1954.
18. Bellamy, L.J., *Organo-phosphorus Compounds*, dans *The Infra-red Spectra of Complex Molecules.*, John Wiley & Sons: New York. p. 257-268, 1954.
19. Ryskin, Y.I. and G.P. Stavitskaya, *The Deformation Vibrations d(OH) for Strong Hydrogen Bonds.* Optics and Spectrosc., **7**: p. 488-490, 1959.

CHAPITRE 4

4. SPECTROSCOPIE PHOTOACOUSTIQUE, RÉSULTATS ET DISCUSSION ; ÉCHANTILLONS DE COLLAGÈNE LAVÉ ET LYOPHILISÉ

4.1. Collagène lavé et lyophilisé

Au cours des travaux, certaines modifications furent apportées au protocole expérimental et le recours à la lyophilisation en est un bon exemple. Il est de pratique courante d'utiliser la lyophilisation dans le cadre d'expérience utilisant le collagène pour en retirer l'eau [1, 2]. Lors des manipulations qui suivront, la lyophilisation a été utilisée pour uniformiser les échantillons. Suite à la lyophilisation, les échantillons présentent une surface uniforme qui ne pouvait être obtenue auparavant. Dans cette première partie de chapitre, l'influence de la lyophilisation sur le collagène avant le traitement à l'acide sera examinée. Dans le but de prendre des mesures spectrales d'échantillons de formes et de masses constantes, la préparation des échantillons fut modifiée. Les échantillons ainsi obtenus sont traités avec les mêmes solutions acides, mais le traitement est fort différent. Le temps d'exposition est plus constant et la surface en contact avec la solution est également constante. Dans la première série d'échantillons, il était difficile de récupérer tout le collagène, car il était en suspension dans la solution.

Afin de faire le lien entre les deux techniques de préparation, la figure 17 présente le spectre du collagène lavé puis lyophilisé. À première vue, le spectre est identique à celui de la figure 4, mais la bande amide I semble plus intense que dans le cas où le collagène n'était que lavé à l'acétone, puis placé sous vide. Cette intensité plus grande semble être due à la structure plus aérée des fibres de collagène. Le constat de l'augmentation du signal n'est pas absolu car il est possible de constater en considérant l'intensité de la bande amide I constante, que c'est en fait tout le domaine sous 1600 cm^{-1} qui est moins intense. En considérant l'une ou l'autre des situations, l'explication de ces petites différences est attribuée à la matrice fibreuse formée à la suite de la

lyophilisation qui est beaucoup moins dense que les fibres lavées à l'acétone. Il y a donc beaucoup plus de surface exposée dans le cas de l'échantillon lyophilisé. La distribution macroscopique des fibres contribue au signal de la bande amide I. En photoacoustique, l'aspect physique des échantillons influence le signal[3].

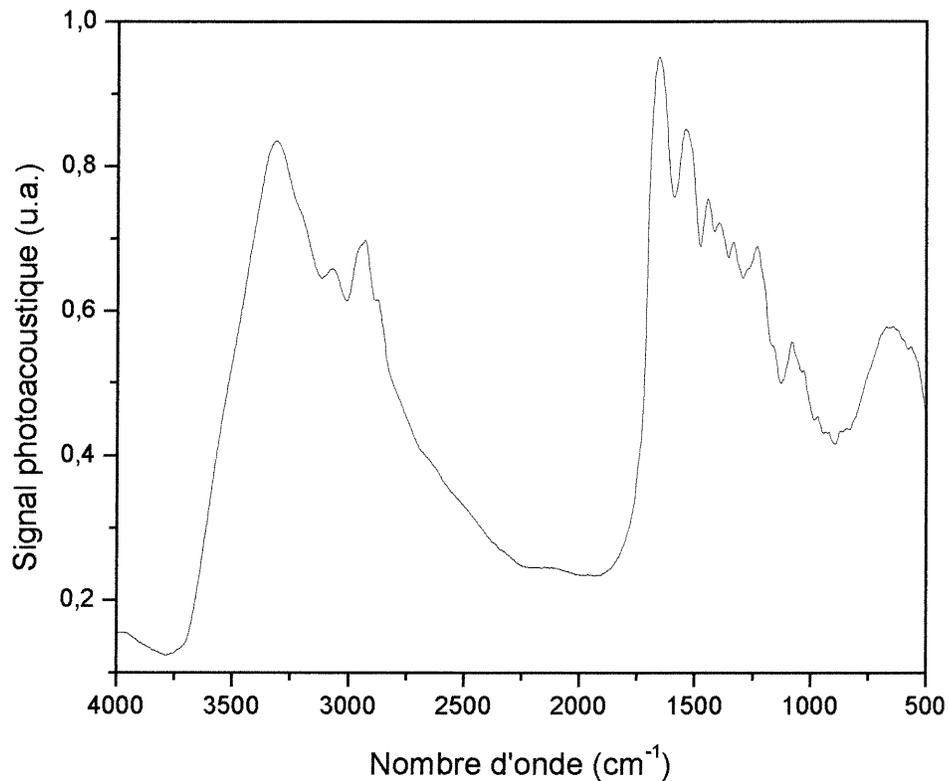


Figure 17 : Spectre photoacoustique infrarouge du collagène lavé, puis lyophilisé.

Les échantillons étant lyophilisés, puis rincés à l'acétone présentent un spectre dont l'intensité des signaux en général est identique à celle du collagène lavé sans être lyophilisé, comme en fait foi la figure 18. La principale disparité réside dans la différence d'intensité de la bande amide I. Comme les spectres du collagène ne sont pas tous identiques selon le rinçage effectué, il importera

donc d'utiliser le bon spectre de référence afin d'effectuer les soustractions spectrales. Ainsi, les échantillons étant rincés à l'eau, puis lyophilisés seront comparés avec le spectre de la figure 17 qui présente le spectre du collagène lavé, lyophilisé. Les échantillons rincés à l'acétone seront comparés avec le spectre de la figure 18 qui présente le spectre du collagène lavé, lyophilisé et rincé à l'acétone. L'influence du dernier type de traitement laisse donc des signes spectroscopiques non négligeables qui seront considérés lors de l'analyse.

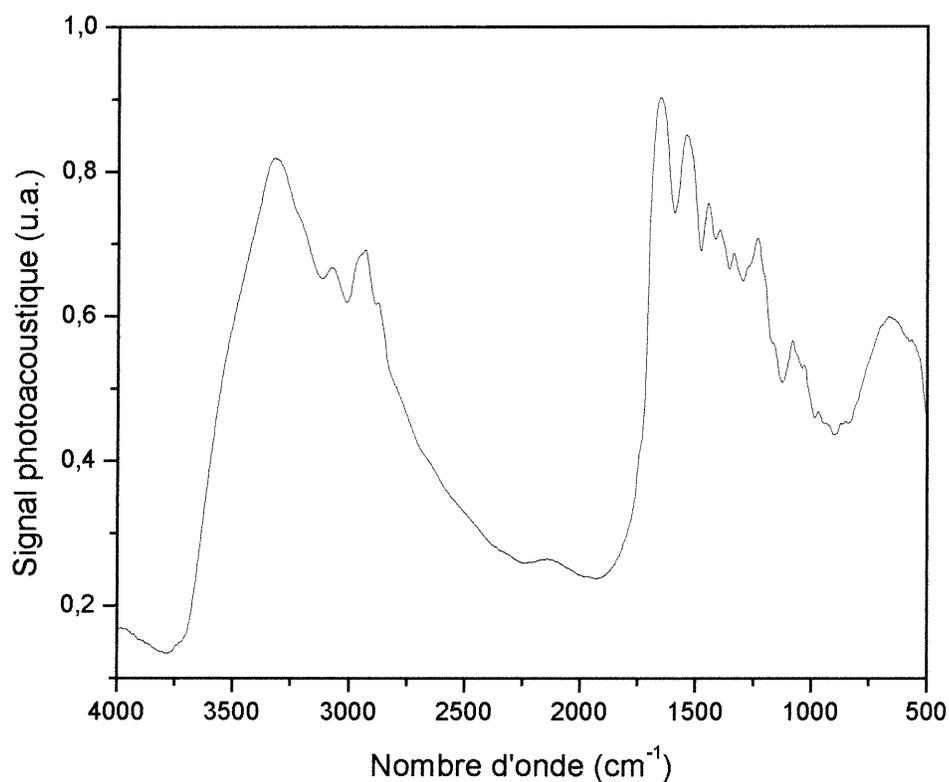


Figure 18 : Spectre photoacoustique infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, puis rincé à l'acétone et mis sous vide.

4.1.1. Contribution de la lyophilisation à la dénaturation

Pour vérifier l'effet de la lyophilisation sur la dénaturation du collagène, elle fut répétée une seconde fois sur un échantillon ayant déjà été lyophilisé. Il s'avère que le spectre obtenu est identique au spectre du collagène lavé et lyophilisé une seule fois présenté à la figure 17. De plus, aucun déplacement laissant croire à la dénaturation n'est observé dans la région amide I. Il est donc considéré que la lyophilisation ne contribue pas à la dénaturation des fibres de collagène. La technique a par conséquent été utilisée pour préparer les échantillons à être traités et à la suite du traitement lorsque les échantillons étaient rincés à l'eau.

4.2. Collagène lavé, lyophilisé, puis rincé avec de l'eau de pH 1,0 et 9,0

Le pH de l'eau utilisée pour le rinçage peut induire des différences spectroscopiques et c'est pour cette raison que l'influence du pH est étudiée. La figure 19 présente la soustraction spectrale d'échantillons de collagène ayant été lyophilisés, puis rincés avec une solution de pH 1,0 ou 9,0 et enfin rincés par de l'acétone. Ces solutions sont préparées à partir de HCl et de NaOH. Le spectre de référence utilisé pour effectuer la soustraction est celui de l'échantillon de collagène lavé, lyophilisé, puis rincé à l'acétone. Il y a une observation frappante pour les échantillons traités avec la solution de pH 1,0, soit la présence du signal à 1732 cm^{-1} . Ce signal correspond aux acides carboxyliques des chaînes latérales du collagène qui n'étaient pas protonés avant cette opération. Cette constatation confirme ce qui a été observé au chapitre 3 dans le cas des échantillons traités avec les solutions de HCl. De plus, la diminution du signal à 1585 et 1392 cm^{-1} , soit dans la région des ions carboxyliques des chaînes latérales du collagène, confirme que ce sont ces derniers qui, une fois protonés, donne le signal à 1732 cm^{-1} . Il y a également la bande caractéristique des ions ammoniums d'amines tertiaires entre 2700 et 2350 cm^{-1} qui est décrite dans le chapitre 3.

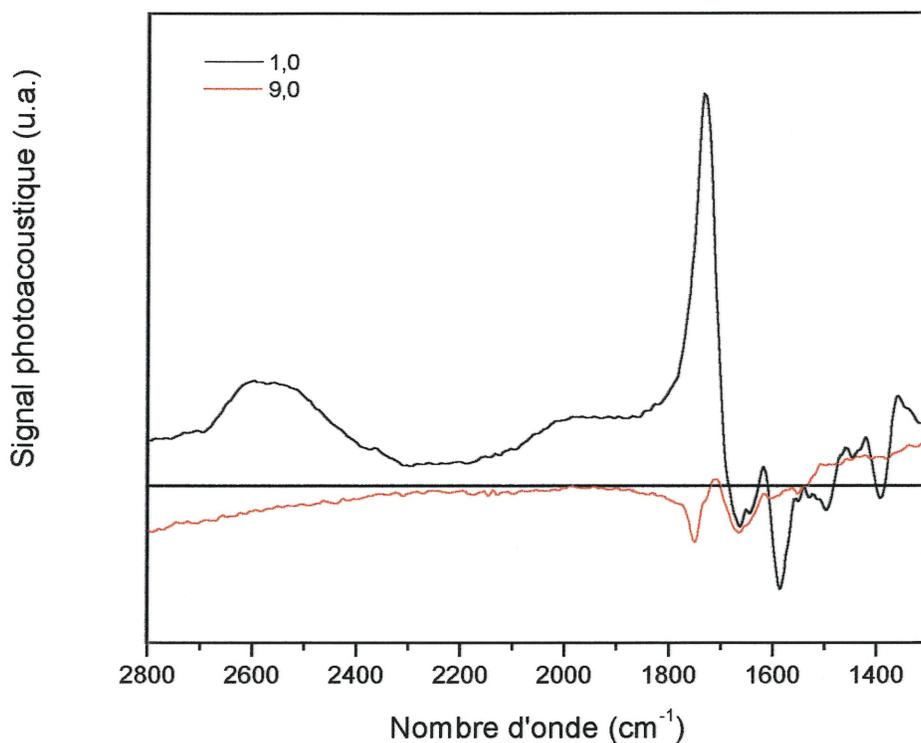


Figure 19 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, traité avec les solutions à pH 1,0 et 9,0, puis rincé à l'acétone. La référence utilisée est le collagène lavé, lyophilisé, rincé à l'acétone. Les spectres sont normalisés à 1539 cm^{-1} .

Pour l'échantillon rincé avec la solution de pH 9,0, il y a très peu de changement, si ce n'est la diminution de signal à 1747 cm^{-1} qui est attribuable à la perte de proton des acides carboxyliques des chaînes latérales du collagène qui étaient neutres jusque-là. En faisant abstraction de cette petite différence, le signal du collagène rincé avec la solution basique est semblable au collagène lyophilisé. Cette situation peut s'expliquer par le fait que l'eau utilisée pour lyophiliser les échantillons à un pH d'environ 5 et que la zone sensible tel qu'il a été démontré jusqu'à présent est près de 2. La référence ayant subi l'influence d'un pH de 5, il n'y a que de faibles changements tel que décrit. Comme il a été mentionné précédemment, le point isoélectrique du collagène se situe entre 4,5 et 6,5, ce qui peut expliquer pourquoi il y a des changements aussi minimes à la suite du traitement à la solution de pH 9,0. La référence et

l'échantillon se situant tous deux au-dessus du point isoélectrique l'effet dû à la déprotonation du collagène est moins important, moins de protons étant disponibles dans le cas du collagène de référence.

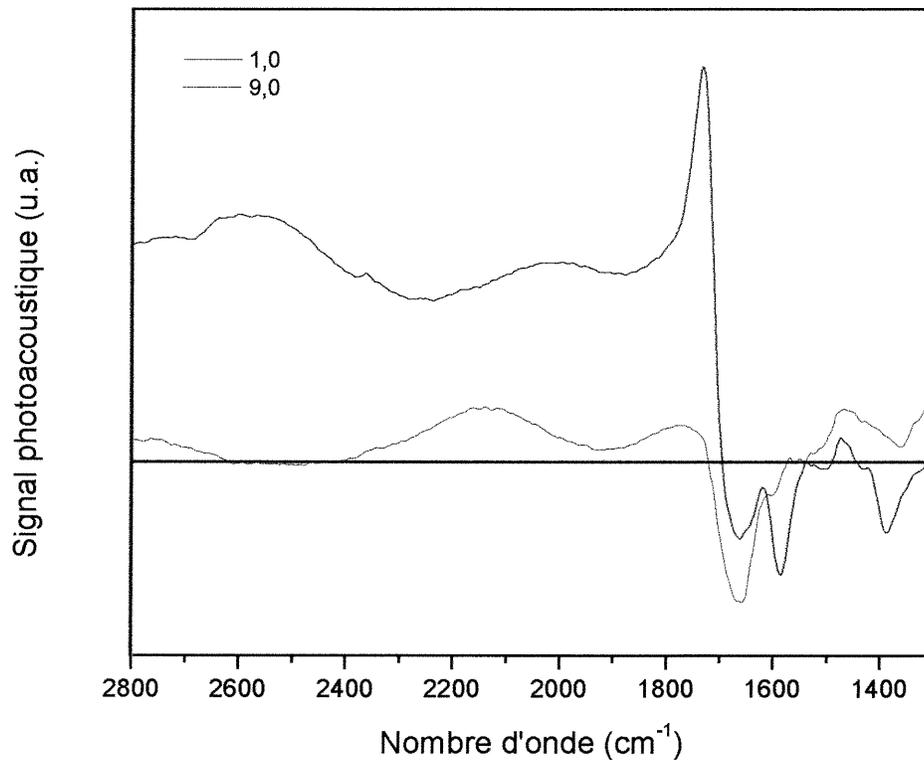


Figure 20 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, traité avec les solutions à pH 1,0 et 9,0, puis rincé à l'eau. La référence utilisée est le collagène lavé, lyophilisé, rincé à l'eau. Les spectres sont normalisés à 1539 cm^{-1} .

Le collagène ne subit aucune dénaturation suite au rinçage avec des solutions de pH 1,0 et 9,0. Le cas de la solution acide a été vérifié dans le chapitre 3, pour ce qui est de la solution basique, la forme de la bande amide I demeure inchangée de même que l'ensemble du spectre. Il est donc conclu que le rinçage avec la solution basique n'induit pas de dénaturation du collagène.

Ces mêmes essais ont été réalisés sur les échantillons de collagène lavé, puis rincé avec les solutions de pH 1,0 et 9,0 sans rincer à l'acétone comme c'était le cas dans les échantillons présentés précédemment, mais à l'eau et en les plaçant au lyophilisateur. La figure 20 présente une soustraction spectrale du collagène lavé rincé avec les solutions de pH 1,0 et 9,0 puis rincé à l'eau et lyophilisé soustrait par le collagène lavé, puis rincé à l'eau sans pH ajusté et lyophilisé. Dans le cas du collagène rincé avec la solution de pH 1,0, il y a la bande des acides carboxylique qui apparaît à 1732 cm^{-1} . De façon analogue, les bandes des ions carboxyles diminuent à 1585 et 1389 cm^{-1} . Le fait de rincer à l'eau ne diminue pas les protonations et la soustraction spectrale est très similaire à la soustraction présentée à la figure 19. Pour le collagène rincé avec une solution de pH 9,0, la figure 20 montre une diminution de l'intensité de la bande amide I. Cette diminution peut être causée par la dénaturation du collagène[4]. Or la dénaturation du collagène serait accompagnée d'une augmentation du signal vers 1630 cm^{-1} , ce qui n'est pas le cas ici.

4.3. Collagène lavé, lyophilisé, puis traité avec une solution de H_3PO_4

Les spectres obtenus à la suite du traitement à l'acide phosphorique sur les échantillons lyophilisés présentent plusieurs similitudes avec les échantillons n'ayant pas été lyophilisés. Un spectre d'un échantillon lyophilisé traité avec une solution de H_3PO_4 de pH 0,7 pendant 15 secondes, puis rincé à l'acétone est présenté à la figure 21.

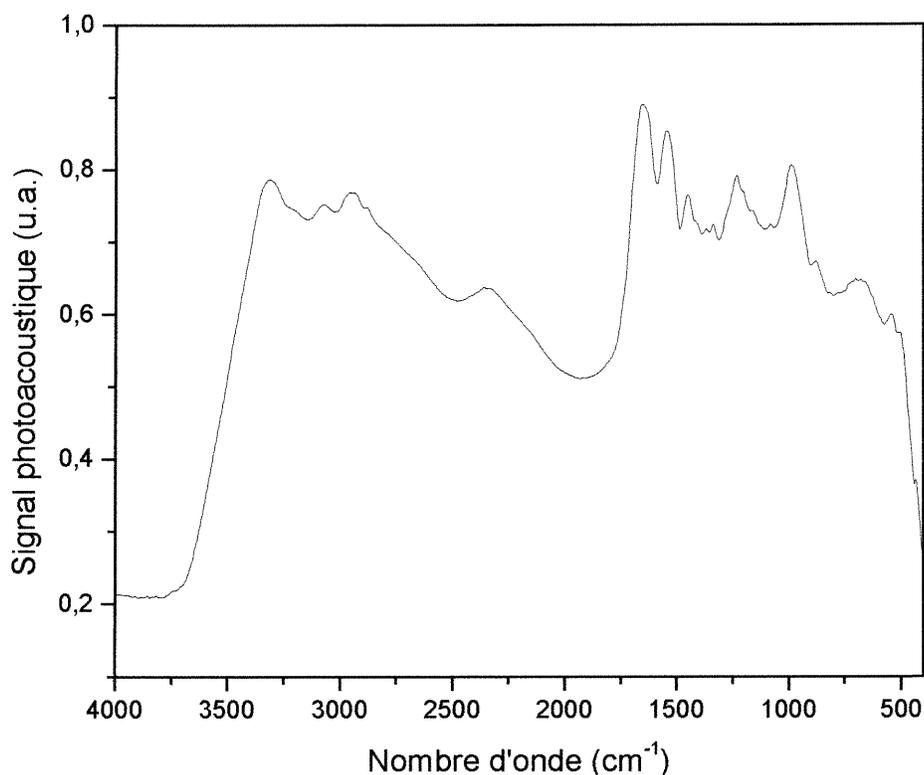


Figure 21 : Spectre photoacoustique infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, traité pendant 15 secondes à une solution d'acide phosphorique de pH de 0,7, puis rincé à l'acétone et mis sous vide.

Comme il est possible de constater, il existe beaucoup de particularités qui se retrouvent sur la figure 13 de la série d'échantillons non lyophilisés. La présence du signal dans la région de 987 cm^{-1} qui est attribuable au signal du phosphate en est un exemple frappant. Il y a également le signal de 2700 à 1600 cm^{-1} qui est attribué à l'étirement du groupement (P)O-H. Pour illustrer cette situation, un agrandissement d'une soustraction spectrale sur un domaine compris entre 2800 et 1800 cm^{-1} est présenté à la figure 22. Une particularité des spectres obtenus avec les échantillons lyophilisés, traités, puis rincés à l'acétone est la forme du signal dans le domaine des étirements OH et CH. Il semble que les bandes des étirements (P)O-H soient plus larges et donc contribuent à augmenter le signal sur un domaine allant jusqu'à 2800 cm^{-1} . Il est à noter que l'intensité générale dans le domaine de 3000 à 1600 cm^{-1} est

beaucoup plus importante dans le cas des échantillons lyophilisés malgré une exposition de 15 secondes comparativement à 60 secondes pour les échantillons non lyophilisés. Cette différence de signal est attribuable à l'aspect macroscopique des fibres qui sont moins denses pour les échantillons lyophilisés.

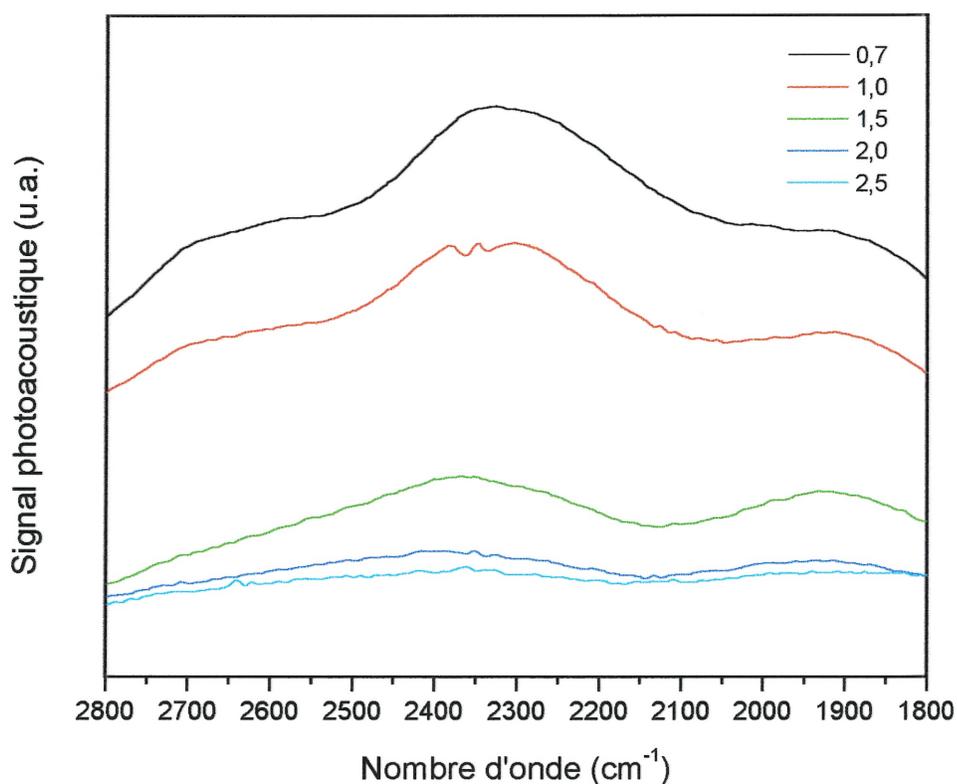


Figure 22 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution de H_3PO_4 à divers pH pendant 15 secondes, puis rincé à l'acétone pendant 30 secondes. La référence utilisée est le collagène lavé, lyophilisé, rincé à l'acétone. Les spectres sont normalisés à 1539 cm^{-1} .

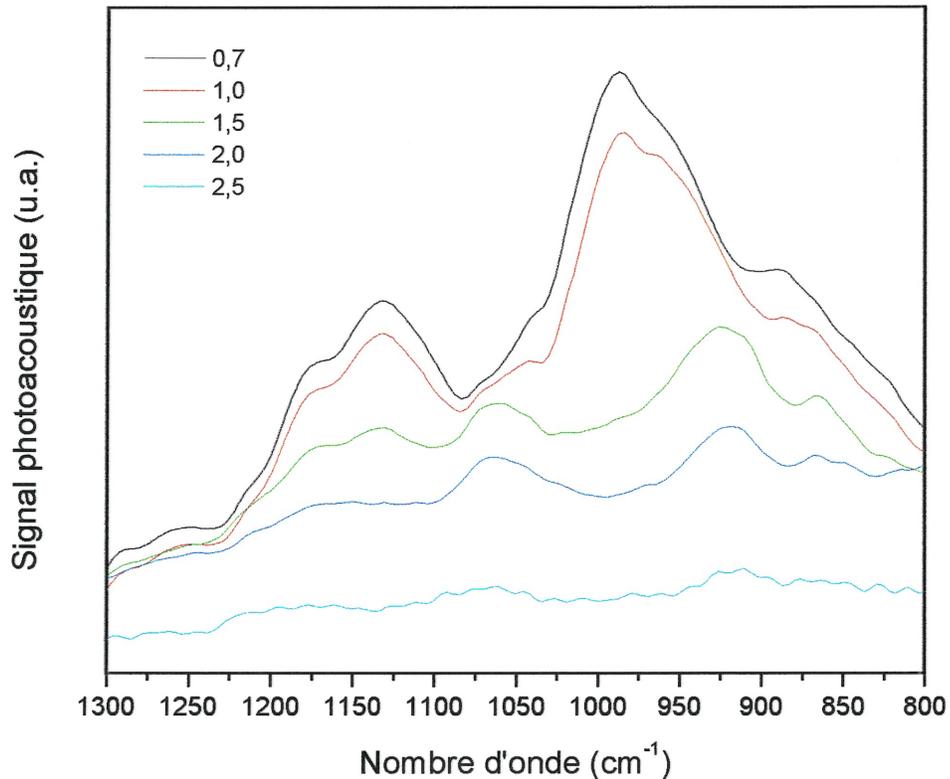


Figure 23 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution de H_3PO_4 à divers pH pendant 15 secondes, puis rincé à l'acétone pendant 30 secondes. La référence utilisée est le collagène lavé, lyophilisé, rincé à l'acétone. Les spectres sont normalisés à 1539 cm^{-1} .

Le signal dans la région de 950 cm^{-1} est une fois de plus modifié par la présence de phosphates. Tout comme dans le cas du collagène lavé non lyophilisé, le signal est relié au pH de la solution comme il est possible de l'observer à la figure 23. La soustraction spectrale permet de voir la contribution du phosphate introduit.

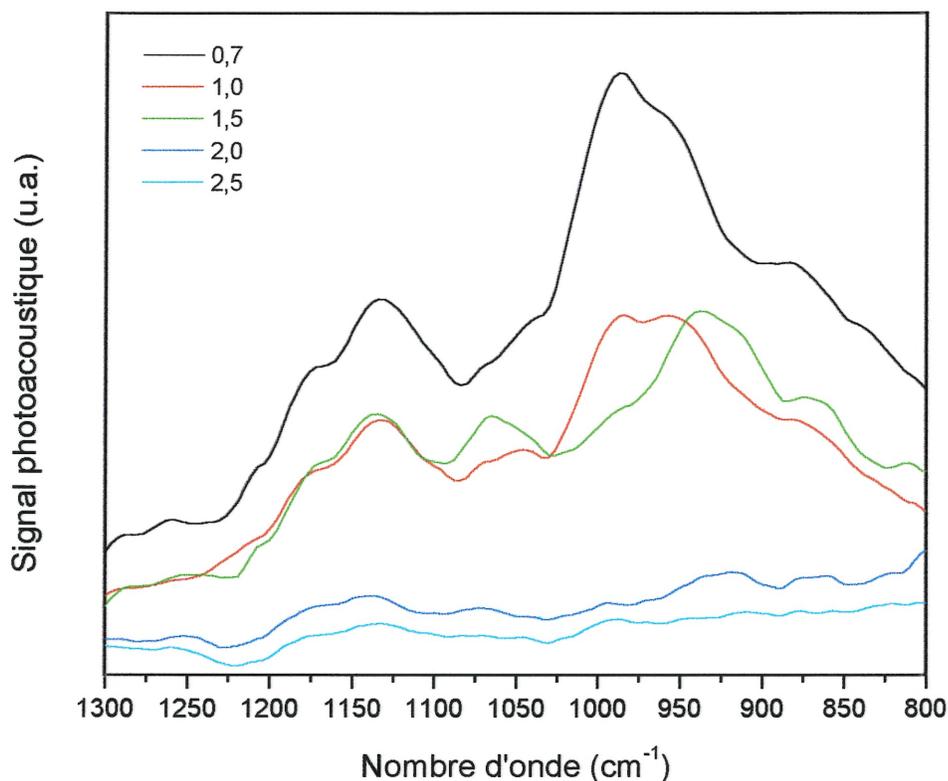


Figure 24 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, traité avec une solution de H_3PO_4 à divers pH pendant 15 secondes, puis rincé à l'acétone au bain à ultrasons pendant 10 minutes. La référence utilisée est le collagène lavé. Les spectres sont normalisés à 1539 cm^{-1} .

Afin de pouvoir comparer les spectres des échantillons non lyophilisés et ceux lyophilisés, la figure 24 présente la soustraction spectrale du domaine des phosphates pour les échantillons non lyophilisés pour un temps de traitement de 15 secondes. La figure 24 présente beaucoup de similitudes avec la figure 23. Le signal maximum est situé à 987 cm^{-1} et est attribué au H_3PO_4 . Or le signal pour les échantillons traités à des pH 1,5 et 2,0 n'est pas identique à ceux présentés à la figure 23. Les spectres de la figure 23 pour les pH 1,5 et 2,0 présentent deux bandes à 1060 et 925 cm^{-1} . Ces bandes sont assignées au signal du $H_2PO_4^-$ tel qu'indiqué précédemment. Or, dans le cas des échantillons non lyophilisés, la seconde bande était présente à 945 cm^{-1} , ce serait cette même

bande qui se serait déplacée à 925 cm^{-1} . Il y a donc une différence du point de vue de la présence des espèces de phosphate. Pour les échantillons non lyophilisés, il y a une forte présence de H_3PO_4 à un pH de 1,5 qui se traduit par un épaulement vers 987 cm^{-1} qui est visible sur la figure 24. Dans le cas des échantillons ayant été lyophilisés, le signal à 987 cm^{-1} est absent mais de plus, le signal à 925 cm^{-1} indique la présence de l'ion H_2PO_4^- .

Il faut se souvenir que les échantillons non lyophilisés ont été rincés pendant 10 minutes au bain à ultrasons. Il n'est pas possible de comparer les résultats obtenus dans les deux cas quantitativement en partie à cause de cet écart important en terme de temps de rinçage, mais également en raison de la façon de traiter les échantillons. Or, malgré ces grandes différences, il n'y a que très peu de différence en terme de quantité et de type d'espèce présente. En effet, il est possible d'observer qu'il y a beaucoup de similitudes entre les figures 23 et 24 : la présence des bandes dues au H_3PO_4 à pH 0,7, la présence de celles de H_2PO_4^- à pH 1,5 et les faibles variations aux pH supérieur ou égal à 2,0.

4.4. Influence du rinçage à l'eau sur le collagène lyophilisé, traité avec une solution de H_3PO_4

Dans le cas des échantillons lyophilisés, traités avec une solution de H_3PO_4 , et rincés à l'eau pendant 30 secondes, le signal du (P)O-H disparaît à des pH supérieurs à 1,0 comme il est possible de l'observer sur la figure 25. Ce signal témoigne de la sensibilité des ions phosphate à concurrencer pour les sites sur le collagène. Le signal de l'eau est inversement proportionnel au signal (P)O-H comme en témoigne la figure 26. L'acide phosphorique remplace effectivement l'eau dans la matrice de collagène, mais les interactions qui l'y retiennent ne peuvent contrer les forces d'hydratation. De plus, il s'avère que la principale contribution pour l'échantillon traité à un pH de 1,0 est à 941 cm^{-1} . La diminution de la bande à 987 cm^{-1} au profit de celle à 941 cm^{-1} indique que les molécules de H_3PO_4 qui sont adsorbées sur le collagène sont toujours en

équilibre avec l'eau, et que le pH est suffisamment élevé pour enlever leur proton. Dans le cas de l'échantillon traité à 0,7, aucun changement significatif n'est observé par rapport à celui rincé à l'acétone. Donc, la façon par laquelle le H_3PO_4 pénètre dans le collagène est différente aux pH 0,7 et pH 1,0.

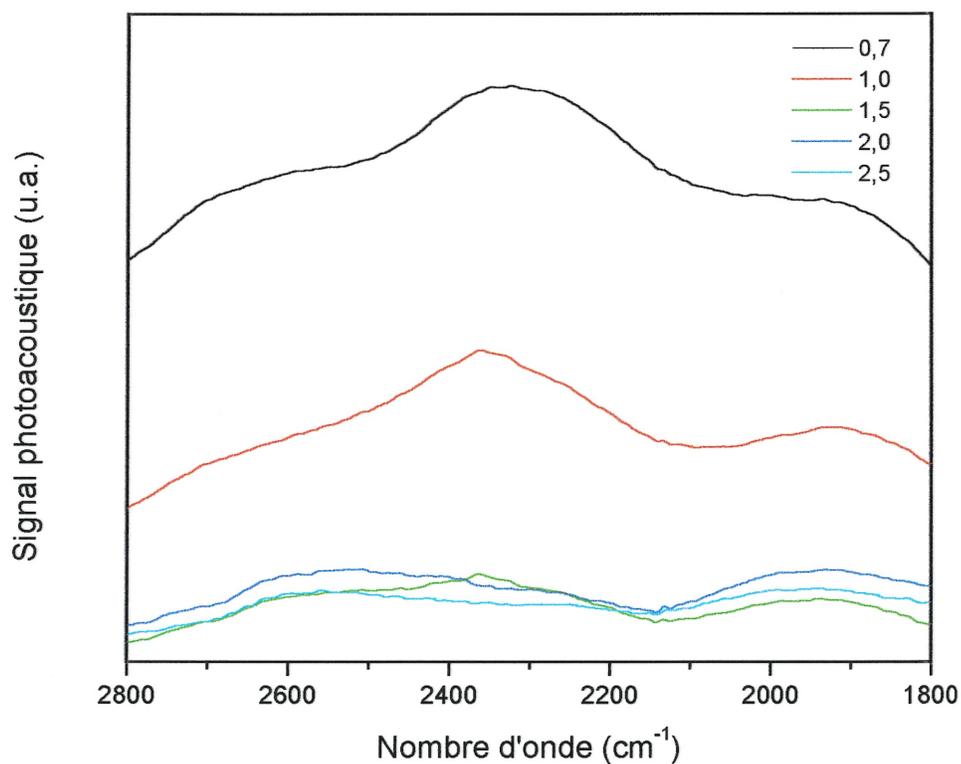


Figure 25 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution de H_3PO_4 à divers pH pendant 15 secondes, puis rincé à l'eau pendant 30 secondes. La référence utilisée est le collagène lavé, lyophilisé. Les spectres sont normalisés à 1539 cm^{-1} .

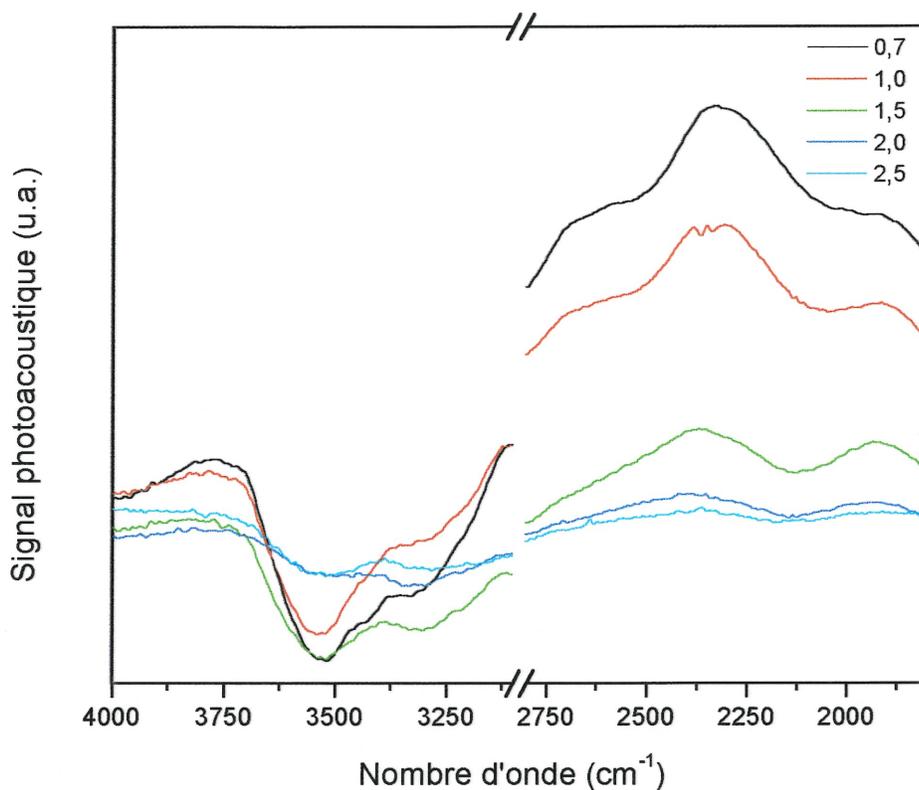


Figure 26 : Agrandissement de la soustraction spectrale du collagène lavé lyophilisé traité avec une solution de H_3PO_4 à divers pH pendant 15 secondes, puis rincé à l'acétone pendant 30 secondes par le collagène lavé lyophilisé rincé à l'acétone. Les spectres sont normalisés à 1539 cm^{-1} .

4.5. Influence du rinçage à l'eau de pH 1,0 sur le collagène lyophilisé, traité avec une solution de H_3PO_4

Les spectres de cette série d'échantillons présentent une faible bande à 987 cm^{-1} pour les échantillons de pH 0,7 à 2,0. Au-dessus de ces pH, il n'y a plus de contribution du signal phosphate. Le rinçage a été fait avec la solution de HCl de pH 1,0, il n'est pas surprenant de voir des contributions dues aux carbonyles et des diminutions de signaux dans le domaine des ions carboxylates qui ont été protonés. Il y a de plus des contributions des ions ammoniums.

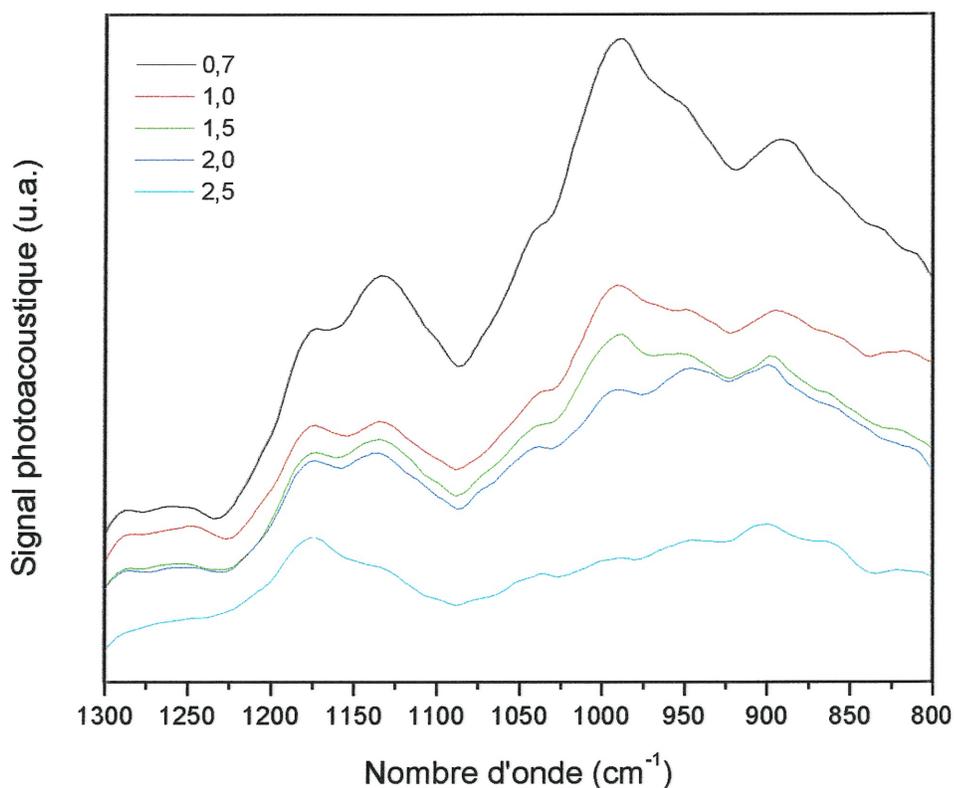


Figure 27 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution de H_3PO_4 à divers pH pendant 15 secondes, puis rincé à l'eau de pH 1,0. La référence utilisée est le collagène lavé, lyophilisé. Les spectres sont normalisés à 1539 cm^{-1} .

Il est possible de conclure que contrairement au cas où le collagène traité et rincé avec de l'acétone, le signal dû au phosphate est beaucoup moins important. Le pH de la solution utilisée a une influence sur le signal phosphate et dans le cas présent, diminue la quantité de phosphate sur l'échantillon. Cependant, les signaux phosphates sont issus des groupements H_3PO_4 plutôt que de groupements $H_2PO_4^-$. Cette situation est illustrée à la figure 27 où une grande partie du signal est centrée à 987 cm^{-1} . En comparant avec les échantillons rincés à l'acétone de la figure 23 il est clair qu'il y a une plus grande proportion du signal qui provient des molécules d'acide phosphorique suite au rinçage à la solution de pH 1,0 que simplement à l'acétone. Il y a

moins de phosphate sur le collagène dans ce cas, mais il est en grande partie protoné.

4.6. Influence du rinçage à l'eau de pH 9,0 sur le collagène lyophilisé, traité avec une solution de H_3PO_4

Il est possible de constater qu'il y a une décroissance rapide du signal dans le domaine des phosphates, relativement à la figure 23 qui illustre le rinçage à l'acétone. Dans le cas des échantillons rincés avec une solution d'hydroxyde de sodium, seul l'échantillon traité à un pH de 1,0 présente un signal phosphate de 930 à 920 cm^{-1} et la figure 28 présente cette situation. Cette bande indique la présence des espèces $H_2PO_4^-$ et donc que la base a pris un proton de l'acide qui se trouvait dans le milieu. Dans le cas de l'échantillon traité à pH 0,7, le signal du phosphate correspond à l'espèce H_3PO_4 et la bande est présente à 987 cm^{-1} . L'espèce H_3PO_4 est présente malgré le rinçage à un pH aussi élevé, le collagène traité avec la solution de pH 0,7 conserve le phosphate sous la forme complètement protonée. Le collagène ayant subi un traitement à un pH de 0,7 conserve le groupement phosphate sous sa forme protonée malgré les rinçages effectués.

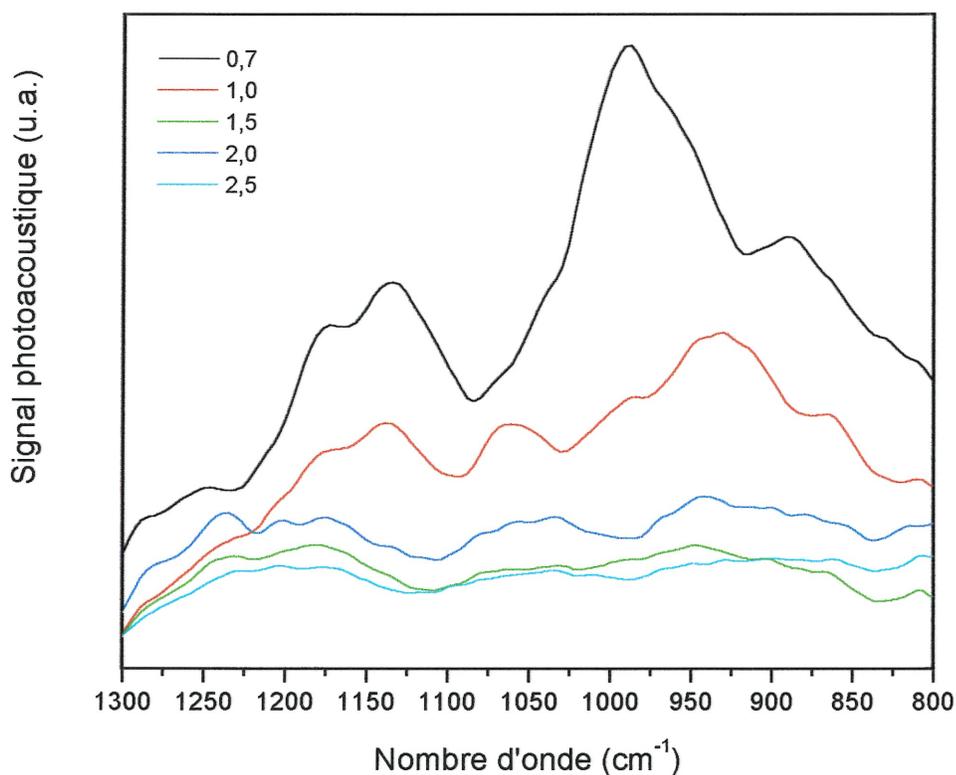


Figure 28 : Agrandissement de la soustraction spectrale infrarouge du collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution de H_3PO_4 à divers pH pendant 15 secondes, puis rincé à l'eau de pH 9,0. La référence utilisée est le collagène lavé, lyophilisé. Les spectres sont normalisés à 1539 cm^{-1} .

4.7. Conclusion partielle

L'utilisation de la lyophilisation conduit à une uniformisation des échantillons et les techniques de traitement et de rinçage minimisent l'incertitude temporelle. Le pH de la solution utilisée pour rincer le collagène influence le type de phosphate à la surface du collagène, pour les pH de 1,0 à 2,5. Le pH 0,7 est particulier, il y a une plus grande quantité d'acide phosphorique sur le collagène et il demeure protoné malgré le rinçage avec une solution de pH 9,0. Le mécanisme d'entrée des groupes phosphates et leur accessibilité aux solvants dépend du pH de la solution.

4.8.Références

1. Jean Curley-Joseph et Arthur Veis, *The Nature of Covalent Complexes of Phosphoproteins with Collagen in the Bovine Dentin Matrix*, J. Dent. Res., 1979. **58** (6), p. 1625-1633.
2. Anders Linde, Meera Bhowan et William T. Butler, *Non-Collageneous Proteins of Rat Dentin. Evidence that Phosphoprotein is not Covalently Bound to Collagen*, Biochim. Biophys. Acta, 1981. **667** , p. 341-350.
3. J. F. McClelland, *Photoacoustic Spectroscopy*, Analytical Chemistry, 1983. **55** (1), p. 89A-105A.
4. K. J. Payne et A. Veis, *Fourier Transform IR Spectroscopy of Collagen and Gelatin Solutions: Deconvolution of the Amide I Band for Conformational Studies*, Biopolymers, 1988. **27** , p. 1749-1760.

CHAPITRE 5

5. SPECTROSCOPIE RAMAN, RÉSULTATS ET DISCUSSION ; ÉCHANTILLONS DE COLLAGÈNE LAVÉ ET LYOPHILISÉ

5.1.Introduction

La spectroscopie Raman a été envisagée afin d'obtenir des informations supplémentaires, tels que la quantification des bandes phosphates et de déterminer avec justesse la contribution des espèces phosphates. De plus, la forme des spectres Raman comparativement à celle obtenue en infrarouge pourrait permettre d'observer nombre d'autres subtilités.

5.2.Collagène lavé et lyophilisé

Le spectre du collagène lavé, lyophilisé est présenté à la figure 29. Il est possible d'y observer les bandes caractéristiques du collagène entre 1750 et 750 cm^{-1} . La raison pour laquelle ce n'est que cette partie du spectre qui est présentée dans le cas du laser infrarouge c'est qu'en mode « extended », l'acquisition ne fonctionne pas dans le domaine des nombres d'ondes supérieurs à 2000 cm^{-1} . Les bandes qui désignent les vibrations NH et OH dans le domaine de 2700 cm^{-1} ne sont donc pas présentées, car le réseau de 1800 traits par millimètre utilisé avec la source infrarouge ne permettait pas de balayer un domaine aussi vaste. L'installation du réseau à 1200 traits par millimètre n'a pas été effectuée durant la période où ces mesures ont été prises. La mise en place de ce dernier réseau aurait permis d'étudier le spectre dans la totalité du domaine d'intérêt. Cependant, cette région a pu être observée en utilisant une source He-Ne. Le traitement de la ligne de base des spectres acquis a été effectué en quatre points avec le logiciel Grams/32®. Les bandes présentes sur la figure 29 correspondent aux bandes caractéristiques du collagène présentées au tableau 4[1-4]. De plus, l'allure générale du spectre du collagène ressemble à ceux retrouvés dans la littérature[3].

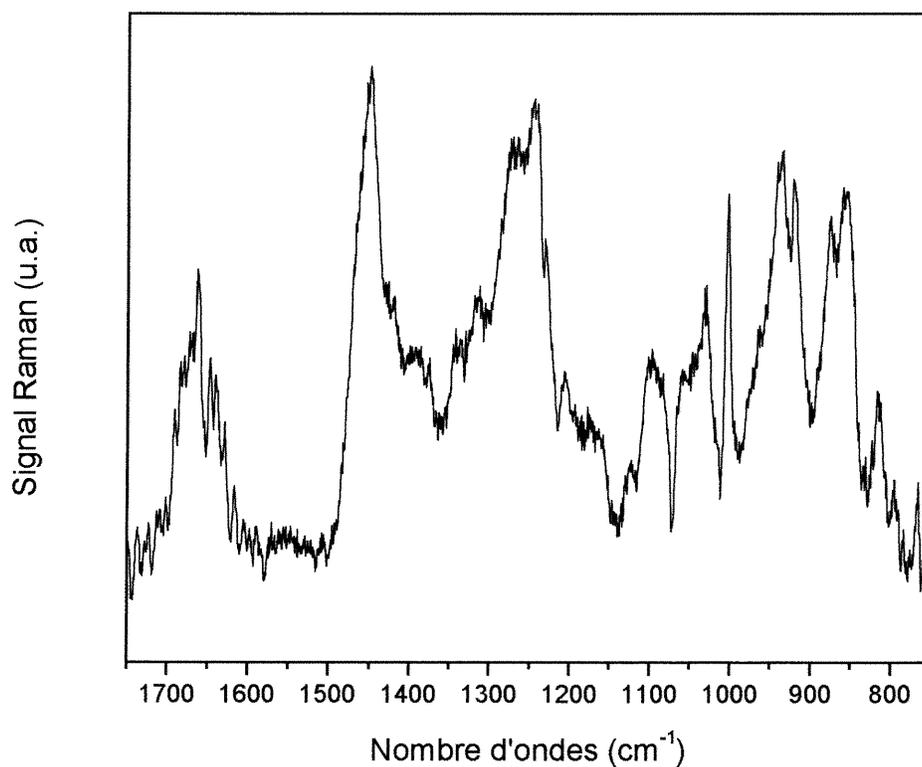


Figure 29 : Spectre Raman de 1750 à 750 cm^{-1} du collagène lavé, puis lyophilisé. La raie laser à 782 nm est utilisée.

désignation	(cm^{-1})
Amide I	1670
Amide I	1642
d(CH ₃ , CH ₂)	1464
d(CH ₃ , CH ₂)	1451
Amide III	1271
Amide III	1248
Phe	1006

Tableau 4 : Désignation des bandes amides caractéristiques du collagène de tendons d'Achille de bovins en spectroscopie Raman[2].

5.3.La fluorescence des échantillons organiques

Les spectres obtenus avec la source He-Ne montrent une forte contribution de la fluorescence. Il est possible de diminuer cette contribution en brûlant la fluorescence de l'échantillon en l'exposant au laser pendant une période de temps avant d'effectuer l'acquisition[4]. Cette technique fonctionne relativement bien pour le collagène, mais est très coûteuse en fait de temps. Pour illustrer cette situation, la figure 30 présente les spectres d'un même échantillon de collagène exposé à une source de 514 nm qui présente beaucoup de fluorescence. Six balayages de 30 secondes avec une puissance de 100 % contribuent à donner les spectres Raman illustrés. Il apparaît donc évident qu'une exposition prolongée contribue à diminuer la fluorescence. Pour contourner le problème de la fluorescence, les laser à 633 et 782 nm ont été utilisés. La contribution de la fluorescence avec la raie laser à 633 nm est moins importante que celle obtenue avec la raie laser à 514 nm, mais demeure bien au-delà de ce qui est obtenu avec la raie laser à 782 nm. Il n'a pas été possible d'avoir un spectre aussi peu fluorescent avec la raie laser à 633 nm qu'avec la raie laser à 782 nm, même après des expositions de 8 heures. Il s'avère quand même intéressant d'utiliser le laser He-Ne malgré la plus grande fluorescence. L'utilisation du laser infrarouge conduit en contre partie, à une intensité Raman moindre, cette intensité étant inversement proportionnelle à la longueur d'onde élevée à la puissance quatre, $I \propto \lambda^{-4}$ [4]. L'un des avantages à utiliser le laser infrarouge réside dans le fait que la correction nécessaire pour la ligne de base est moins importante que pour le laser He-Ne. Le choix du laser s'est arrêté sur l'infrarouge pour les raisons mentionnées précédemment, mais il aurait été envisageable d'utiliser le laser He-Ne, ce dernier ne présentant pas trop de fluorescence pour un signal plus intense.

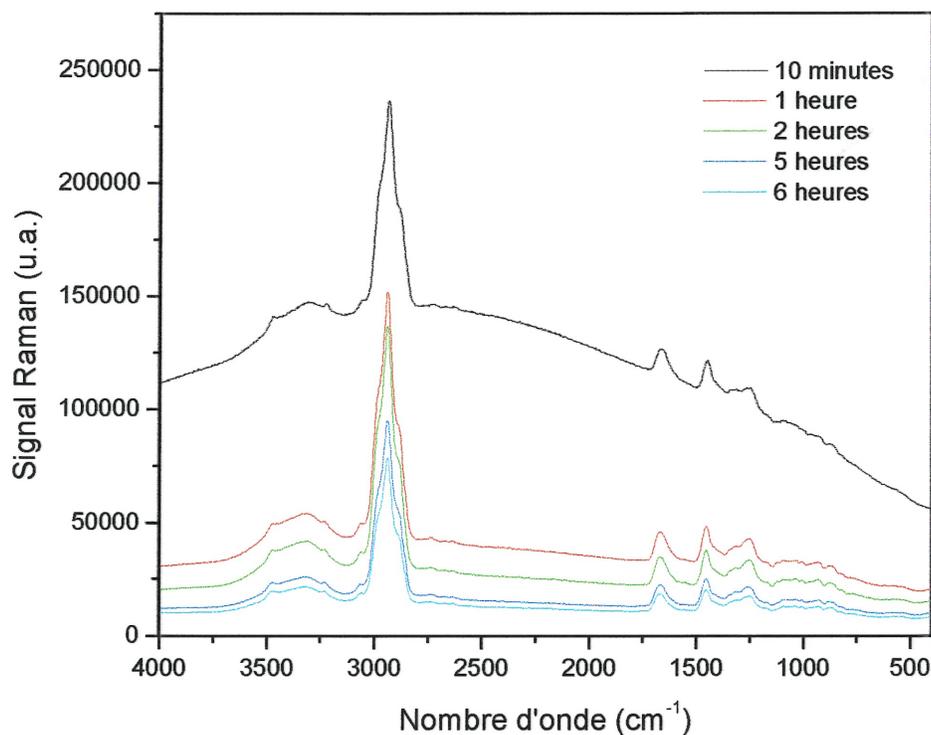


Figure 30 : Spectres Raman d'un échantillon de collagène lavé pour différents temps d'exposition. La raie laser à 514 nm est utilisée.

Le collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution d'acide phosphorique de pH 0,7 présente un spectre Raman sensiblement semblable à celui du collagène lavé, lyophilisé. Une différence marquante est observée dans le domaine de 900 cm^{-1} et il est possible de le constater sur la figure 31. La bande observée provient de la contribution de l'acide phosphorique dans la région de 900 cm^{-1} . Les spectres Raman ont été normalisés afin de pouvoir considérer l'intensité relative des signaux. La normalisation a été réalisée à 1006 cm^{-1} , cette bande correspond au signal de la phénylalanine qui n'est pas censée varier selon les traitements. Pour s'assurer que la contribution dans ce domaine provenait bien des phosphates, de brefs travaux furent entrepris afin de bien caractériser ces bandes.

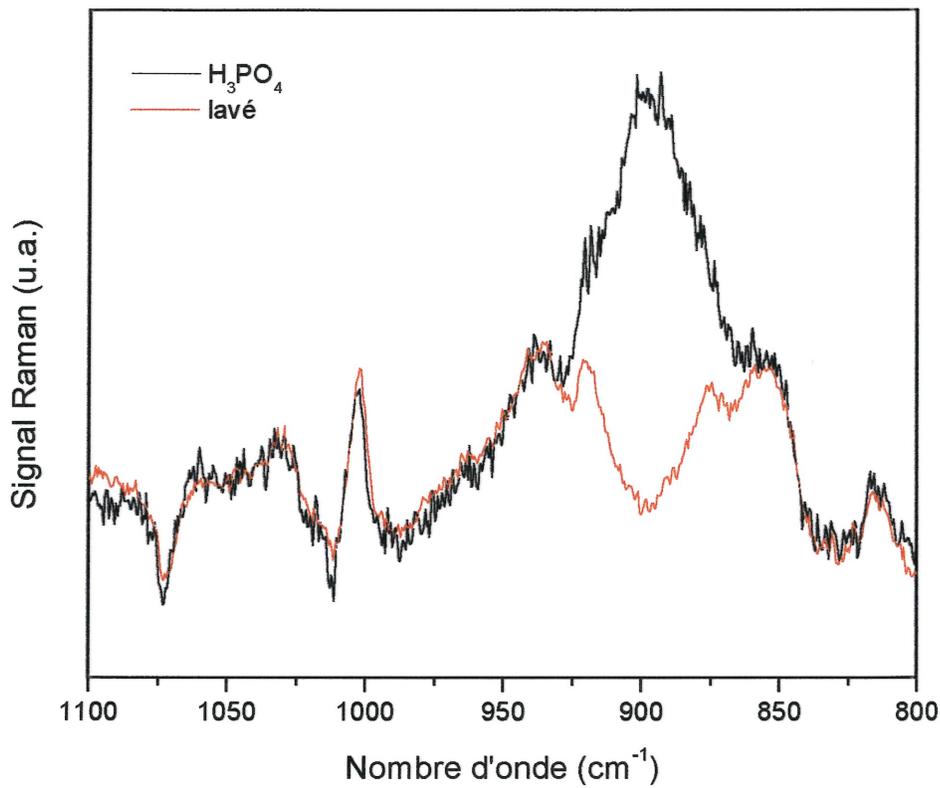


Figure 31 : Agrandissement du spectre Raman du collagène lavé et du collagène lavé, traité avec une solution de H_3PO_4 de pH 0,7 pendant 15 secondes. Les spectres sont normalisés à 1006 cm^{-1} . La raie laser à 782 nm est utilisée.

5.4. Spectres Raman de solutions d'acide phosphorique

Afin de confirmer que le signal observé à la figure 32 est bien celui de l'acide phosphorique complètement protoné, différentes solutions furent étudiées à divers pH afin de déterminer la provenance des signaux des échantillons de collagène. Des solutions de pH allant de 0,7 à 2,5 ont été préparées et les spectres Raman acquis. Afin de ne pas diminuer l'intensité du signal phosphate, le pH est augmenté par ajouts successifs d'hydroxyde de sodium et non par dilution de l'acide concentré.

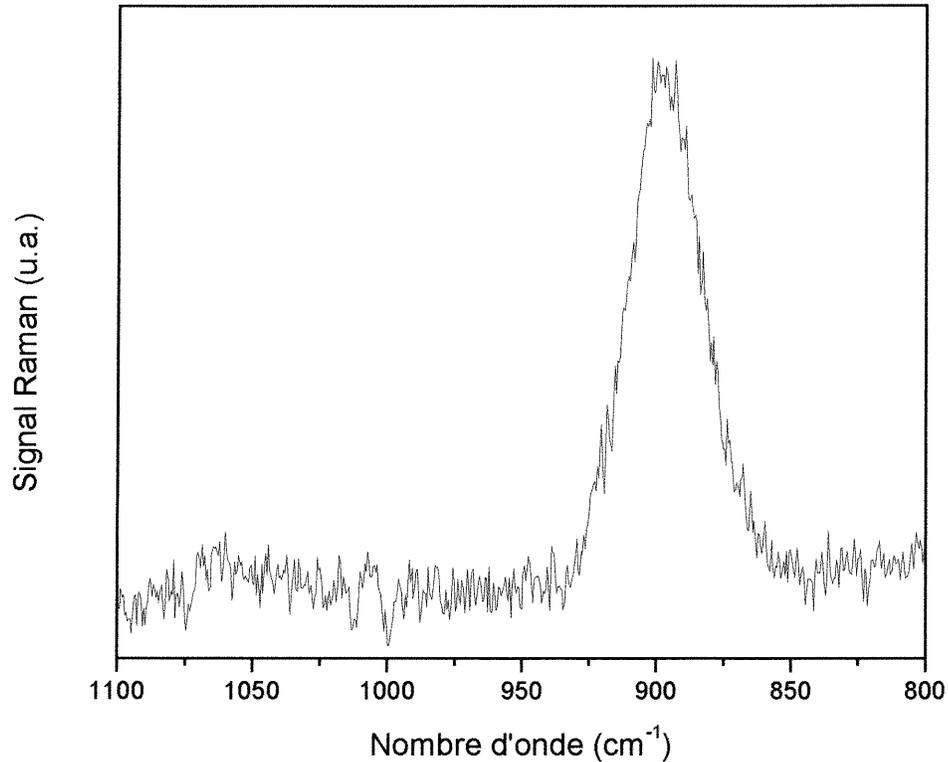


Figure 32 : Agrandissement de la soustraction spectrale Raman du collagène lavé, lyophilisé, traité 15 secondes avec une solution de H_3PO_4 de pH 0,7, puis rincé à l'acétone. La référence utilisée est le collagène lavé, lyophilisé. Les spectres sont normalisés à 1006 cm^{-1} . La raie laser à 782 nm est utilisée.

Il s'avère que le signal maximal pour la solution de pH 0,7 est présent à 892 cm^{-1} et pour illustrer cette situation, le spectre de cette solution est présenté à la figure 33. Une tendance peut être observée, alors que le pH augmente et se rapproche du premier pKa de l'acide phosphorique, le signal à 892 cm^{-1} se déplace vers 875 cm^{-1} et son intensité diminue comme en fait foi la figure 33. De plus, un signal à 1075 cm^{-1} gagne en intensité en augmentant le pH. Ce signal est attribué à l'ion H_2PO_4^- . La bande à 875 cm^{-1} est également assignée au H_2PO_4^- , alors que le signal à 892 cm^{-1} est attribué au H_3PO_4 .

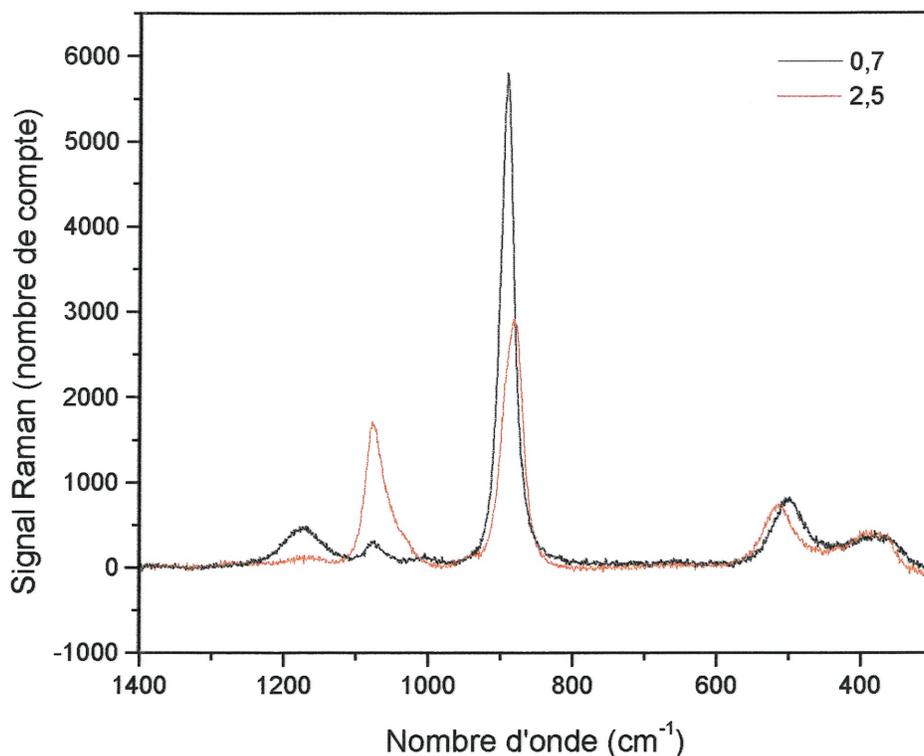


Figure 33 : Spectre Raman de solutions de H_3PO_4 de pH 0,7 et 2,5. Les spectres n'ont subi aucune normalisation. La raie laser à 782 nm est utilisée.

La figure 34 présente le spectre dont la simulation a été réalisée pour une solution d'acide phosphorique de pH 2,5 où il est possible d'observer chacune des contributions. Il est possible d'y observer que la contribution à 875 cm^{-1} est beaucoup plus importante que celle à 892 cm^{-1} , ce qui indique qu'il y a plus d'acide phosphorique sous la forme ionique que sous la forme protonée dans cette solution. La figure 35 présente le logarithme du rapport des aires des bandes à 875 et à 892 cm^{-1} en fonction du pH. Sur cette même figure, la courbe théorique prédite par l'équation d'Henderson-Hasselbach est tracée en posant un pKa de 2,16. L'équation de cette courbe se présente donc sous la forme bien connue, $\log \frac{[H_2PO_4^-]}{[H_3PO_4]} = pH - 2,16$. Il est possible d'observer que l'aire des deux bandes considérées est liée aux présences respectives des phosphates selon le pH comme le prévoit l'équation d'Henderson-Hasselbach.

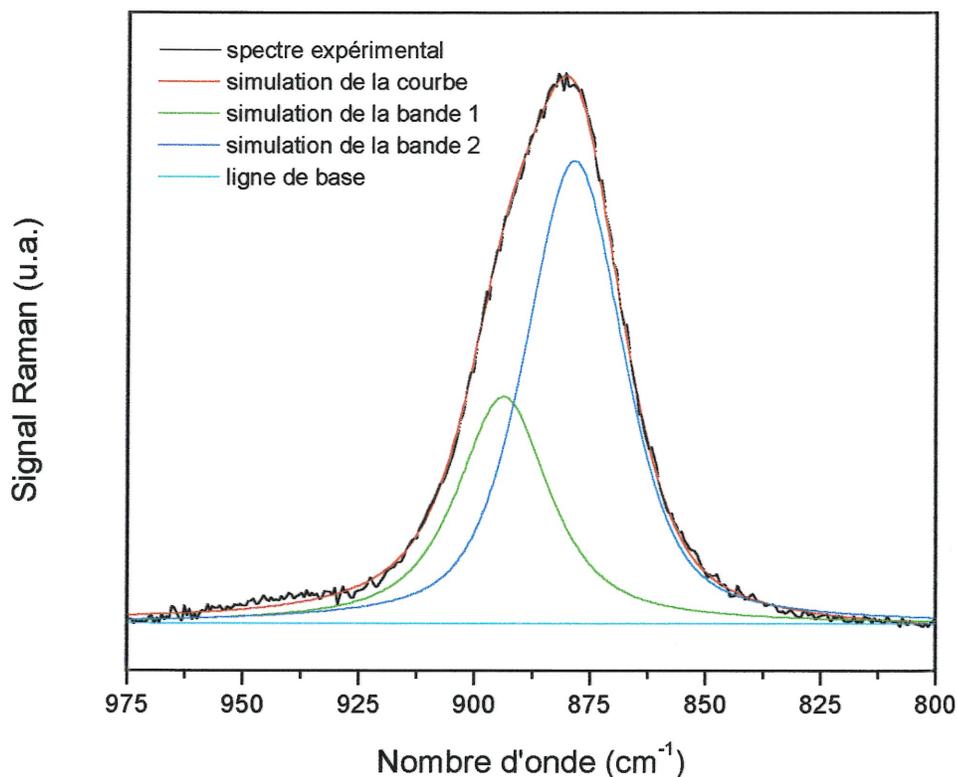


Figure 34 : Agrandissement d'un spectre Raman d'une solution de H_3PO_4 et de NaOH de pH 2,5 dont la simulation a été réalisée. La raie laser à 633 nm est utilisée.

La détermination expérimentale du pKa n'étant pas le but de la présente expérience, il n'y a pas eu davantage de solutions préparées afin d'augmenter le nombre de points expérimentaux. Cependant, la régression linéaire fut réalisée sur les quatre points expérimentaux et le résultat de la régression linéaire conduit à un pKa de $2,0 \pm 0,3$. L'accord entre les points expérimentaux et le comportement prédit pour l'acide avec un pKa de 2,16 renforce la validité de l'assignation des signaux Raman tels que décrit. Il est possible d'appliquer ces conclusions aux autres résultats obtenus pour le collagène.

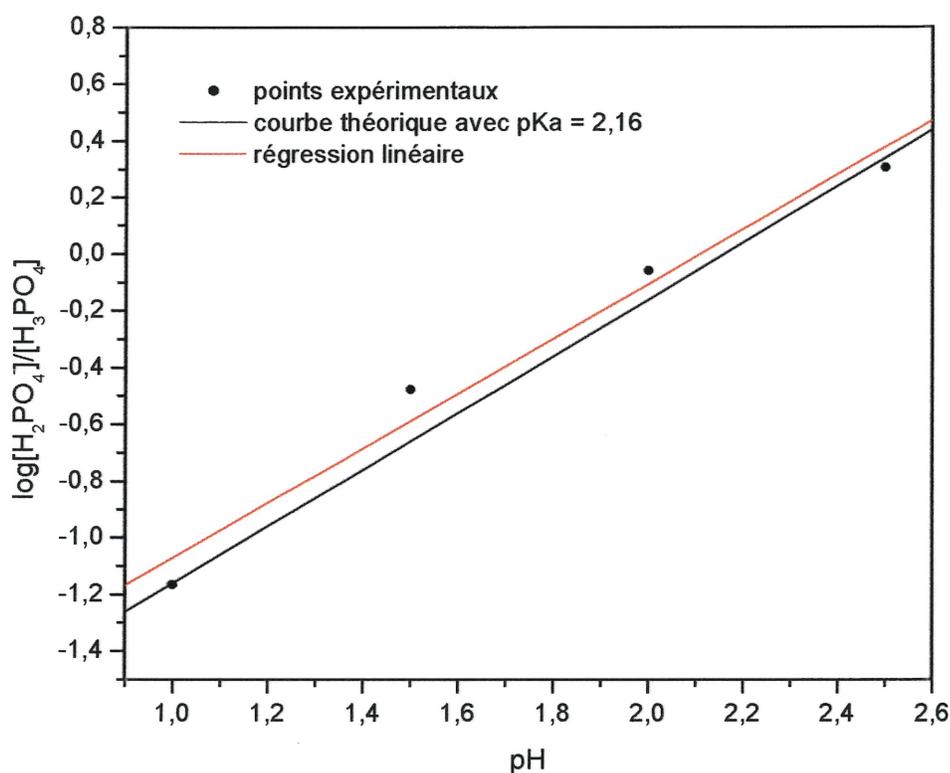


Figure 35 : Détermination du pKa₁ de l'acide phosphorique à partir de solutions par spectroscopie Raman. La raie laser à 633 nm est utilisée. L'équation de la régression linéaire est $Y = -2,0 + 1,0 X$.

5.5. Collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution de H₃PO₄, rincé à l'acétone

Ayant déterminé la contribution sur les spectres Raman des deux principales espèces de phosphate présentes, l'étude des spectres du collagène fut entreprise. Pour déterminer le type de phosphate lié au collagène, une soustraction du spectre du collagène traité avec la solution acide et rincé avec l'acétone par le spectre du collagène lyophilisé est effectuée en normalisant le signal à 1006 cm⁻¹. Le résultat de cette soustraction est présenté à la figure 32. Fort de l'expérience réalisée avec les solutions acides, il est possible d'attribuer la bande à 897 cm⁻¹ à l'acide phosphorique non dissocié. Le collagène lavé, lyophilisé, traité avec l'acide phosphorique, puis rincé à l'acétone possède en grande majorité l'espèce complètement protonée de l'acide. Le rinçage à

l'acétone ne parvient pas à enlever les molécules d'acides phosphoriques, leur signal étant relativement intense. De plus, le signal de la forme déprotonée n'étant pas présent, il faut conclure qu'il n'y a que l'espèce H_3PO_4 qui demeure liée au collagène.

5.6. Collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution de H_3PO_4 , rincé à l'eau

Le collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution d'acide phosphorique et rincé à l'eau présente également une contribution du signal phosphate comme l'indique la figure 36. En effectuant à nouveau une soustraction spectrale, il s'avère que le signal du phosphate est moins intense que le cas de l'échantillon rincé à l'acétone tel que présenté à la figure 37.

En faisant abstraction des pics à 1070 cm^{-1} et 1010 cm^{-1} , le constat est que le phosphate présente encore un signal qui indique que l'acide phosphorique est présent sous la forme H_3PO_4 . Il y a cependant une faible contribution qui ne peut être négligée à environ 1075 cm^{-1} qui se présente sous la forme d'un épaulement et qui est due au signal H_2PO_4^- . Cette hypothèse se confirme car si la bande à 892 cm^{-1} est simulée, il en résulte des contributions conjointes à 892 cm^{-1} et 875 cm^{-1} . Dans le cas du collagène traité avec l'acide phosphorique et rincé à l'eau, la figure 37 montre un épaulement à 875 cm^{-1} qui indique clairement qu'il y a présence de H_2PO_4^- . Il n'est pas possible d'attribuer un rapport présentant la quantité relative des espèces, la soustraction montrant une résolution jugée trop faible pour en faire l'intégration. Dans les conditions utilisées, il s'avère donc qu'il est possible d'observer le type de phosphate présent sur le collagène avec la spectroscopie Raman et qu'un temps d'acquisition plus important aurait permis d'avoir la résolution nécessaire à la détermination du rapport des espèces présentes. L'utilisation du laser infrarouge jumelé au réseau de 1200 traits par millimètre aurait certainement permis d'avoir un signal plus intense, procurant des spectres de meilleure résolution. Le réseau utilisé comportait 1800 traits par millimètre.

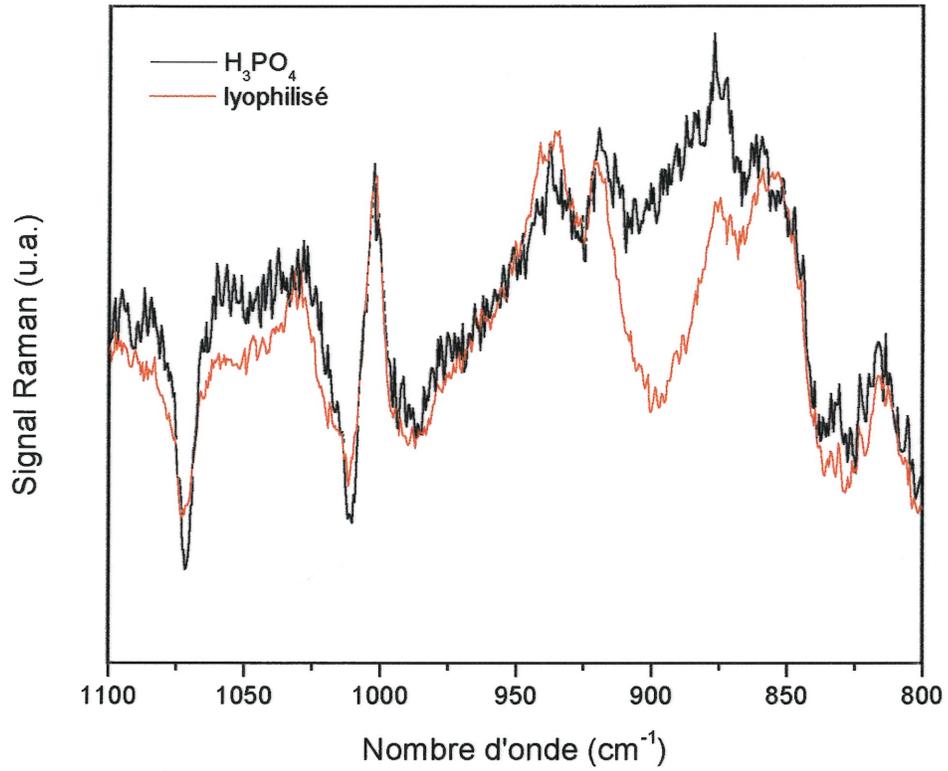


Figure 36 : Agrandissement du spectre Raman du collagène lavé, lyophilisé et du collagène lavé, lyophilisé, traité avec une solution de H_3PO_4 de pH 0,7 pendant 15 secondes, puis rincé à l'eau. Les spectres sont normalisés à 1006 cm^{-1} . La raie laser à 782 nm est utilisée.

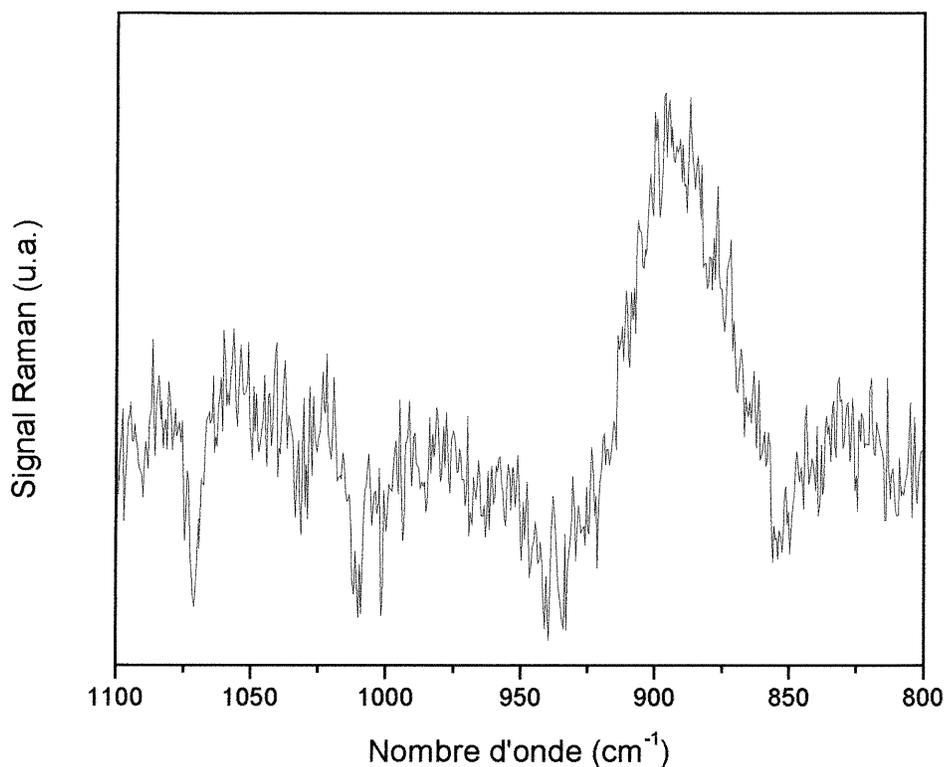


Figure 37 : Agrandissement de la soustraction spectrale du spectre Raman du collagène lavé, traité avec une solution de H_3PO_4 de pH 0,7 pendant 15 secondes, puis rincé à l'eau. La référence utilisée est le collagène lavé, lyophilisé. Les spectres sont normalisés à 1006 cm^{-1} . La raie laser à 782 nm est utilisée.

5.7. Conclusion partielle

La spectroscopie Raman a confirmé la présence de la molécule d'acide phosphorique lorsque le collagène est soumis pendant 15 secondes à une solution d'acide phosphorique, peu importe le type de rinçage qui suit. Les résultats obtenus avec la spectroscopie Raman concordent et confirment ceux obtenus en infrarouge dans les mêmes conditions. Il s'avère donc que malgré la charge positive portée par le collagène traité par des solutions acides, le H_3PO_4 est présent en plus grande quantité que le H_2PO_4^- pour le traitement à un pH de 0,7.

5.8.Références

1. S. Leikin, V. A. Parsegian, W.-H. Yang et G. E. Walrafen, *Raman spectral evidence for hydration forces between collagen triple helices*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997. **94** , p. 11312-11317.
2. Bruce G. Frushour et Jack L. Koenig, *Raman Scattering of Collagen, Gelatin, and Elastin*, Biopolymers, 1975. **14** , p. 379-391.
3. J. Xu, I. Stangel, I. S. Butler et D. F. R. Gilson, *An FT-Raman Spectroscopic Investigation of Dentin and Collagen Surfaces Modified by 2-Hydroxyethylmethacrylate*, J. Dent. Res., 1997. **76** (1), p. 596-601.
4. Anthony T. Tu, *Raman Spectroscopy in Biology, Principles and Applications*. 1982, New York: John Wiley & Sons. 448.

CHAPITRE 6

6. STRUCTURE DU COLLAGÈNE, INCIDENCE DES RÉSULTATS ET DISCUSSION

6.1. Interactions qui stabilisent le collagène

La grande stabilité de la triple hélice du collagène natif provient des acides iminés proline et hydroxyproline[1-4]. La stabilité due à ces deux acides iminés dépasse de loin celle induite par la présence d'eau[2]. De plus, les interactions électrostatiques intra et inter chaînes contribuent également à la stabilité de la molécule[5, 6]. Les chaînes latérales stabilisent la structure lorsqu'elles sont ionisées en faisant varier le pH[5]. Ainsi, les chaînes entretiennent des interactions électrostatiques qui augmentent la stabilité thermique du collagène. Il y a également les ponts hydrogène qui contribuent à la stabilité du collagène à leur façon et il en est question plus loin. Que le phosphate soit sous la forme ionique ou non, sa présence dans l'environnement de la triple hélice du collagène se veut stabilisante dans le cas où le collagène est chargé positivement suite aux traitements acides.

6.2. Influence des acides utilisés

L'utilisation de groupes phosphate pouvant former des ponts hydrogène et pouvant remplacer les molécules d'eau à l'endroit des fibres de collagène est donc envisagé. Les groupes phosphate peuvent stabiliser les fibres en formant des ponts hydrogène ou encore, dans le cas où le collagène est chargé, servir de contre ion négatif. Il a été possible d'observer la présence d'amines chlorhydriques tertiaires dans le cas du collagène traité avec l'acide chlorhydrique et la présence d'acide maléique dans le cas du collagène traité avec l'acide maléique. Dans le premier cas, des ions sont utilisés pour stabiliser la structure, dans le second, ce sont des ponts hydrogène qui sont responsables de la stabilisation des charges, aucun signe d'ions maléates n'étant observé. Dans le cas de l'acide phosphorique, il y a contribution de ces deux types d'interactions.

6.3.Emplacement des H_3PO_4 ou des $H_2PO_4^-$

Lorsque le collagène est soumis à une solution ou à un solvant polaire qui peut former des ponts hydrogène, les fibres gonflent et il y a donc possibilité pour les molécules de solvant de s'infiltrer dans celles-ci[7]. Une supposition s'impose, le fait de traiter le collagène avec une solution de H_3PO_4 doit contribuer au gonflement de ce dernier, et ce, en faisant abstraction de l'effet du pH. S'il convient de prendre en compte le pH, il est démontré que le collagène soumis à de faibles pH gonfle[8, 9]. Il s'en suit donc que le collagène gonflé soit par l'effet du pH ou de l'effet osmotique se dégonfle suite au rinçage à l'acétone ou à l'eau, emprisonnant les ions phosphates et les molécules d'acide phosphorique dans la matrice fibreuse. Le gonflement est caractérisé par un accroissement de la distance entre les fibrilles et entre les triples hélices. Il y a donc plus d'espace pour permettre à des espèces de s'infiltrer. Lors du gonflement, le collagène demeure fortement chargé et il importe donc que les phosphates servent de contre ions. D'après les résultats obtenus, non seulement les ions phosphates s'infiltrent, mais également des molécules d'acide phosphorique. La forte concentration de cette dernière espèce à des pH inférieurs à 1,5 est en grande partie responsable de leur présence. Une fois que le collagène est gonflé, les phosphates et les molécules d'acide phosphorique occupent certainement plusieurs positions afin de stabiliser la structure, mais il est difficile de cerner lesquelles. Il y a évidemment la grande quantité de charges positives des chaînes latérales. Ces dernières étaient stabilisées par les ions carboxyles chargés négativement avant le traitement. Suite au traitement, ces carboxyles sont protonés, laissant les charges positives sans ions pour les stabiliser. Cette situation entraîne une déstabilisation qui a été observée sur des peptides semblables au collagène[5]. Le gonflement à faibles pH provient entre autres de ce fait, il y aurait répulsion entre les chaînes, la stabilisation électrostatique étant rompue. Lors du rinçage à l'acétone, la charge est maintenue et le signal des groupements phosphate est plus intense que pour le rinçage à l'eau. La situation particulière du collagène traité avec une solution

de pH 0,7 provient à la fois de l'acidité de la solution, qui induit un gonflement, mais également de la grande quantité de molécules d'acide phosphorique présentes.

En considérant que l'influence de l'eau à la stabilisation du collagène arrive au second plan, il peut être considéré qu'elle soit remplacée. Les molécules d'eau sont mobiles et leur remplacement par les molécules de H_3PO_4 est véritablement une possibilité. D'abord en raison de l'équilibre qui doit être préservé, les phosphates peuvent échanger avec l'eau. Également en raison de la dimension du phosphate qui peut certainement former des ponts hydrogène entre deux structures éloignées les unes des autres dues à l'effet du pH qui gonfle le collagène. En somme, l'endroit où se logent ces molécules n'est pas déterminé et il importe que ces interactions soient ciblées.

6.4.Parallèle avec les phosphorynes

Les phosphates qui sont introduits dans la matrice de collagène ne sont pas liés de façon covalente, mais bien par des interactions ioniques et des ponts hydrogène. Il est connu que les phosphoprotéines présentes dans la dentine ne sont pas liées de façon covalente au collagène[10]. La présence du groupe phosphate en grande partie sert à former des ponts hydrogène avec plusieurs sites du collagène. L'ion $H_2PO_4^-$ pour sa part introduit une charge négative servant à stabiliser le collagène positif, son point isoélectrique étant de 4,5 à 6,5. La corrélation entre le pH et le type de phosphate présent est frappante. À faible pH, il y a uniquement des ions H_3PO_4 et le signal sur les spectres correspond bien à cette affirmation. Il y a présence d'ions $H_2PO_4^-$ que dans la mesure où ces derniers stabilisent les charges positives laissées vacantes sur les chaînes latérales. Il a été démontré que les molécules de phosphorynes se liaient électrostatiquement au collagène de façon non spécifique à des pH de 3,5 à 4,5[11]. À des pH supérieurs, il y a spécificité dans un domaine déterminé. Aux pH auxquels sont effectués ces travaux, ils ne permettent aucune spécificité, le collagène étant chargé positivement, la moindre charge négative

sert de contre ion et forme une double couche[12, 13]. La tête phosphate des phosphorynes a de grandes affinités pour le collagène et s'y lie de façon électrostatique à pH physiologique, ce qui explique la présence de telles protéines de façon naturelle dans les os et la dentine[14]. Le collagène utilisé provenant de tendons ne présente pas de phosphorynes à l'état natif, mais il possède les caractéristiques pour que ces dernières s'y lient.

6.5.Collagène et ponts hydrogène

Il a été établi qu'il y avait présence d'eau dans la structure du collagène. Ces molécules d'eau sont retenues essentiellement grâce aux ponts hydrogène. Il est proposé que les molécules d'eau ne participent pas à la stabilisation du collagène, mais plutôt qu'elles ne soient là que de façon passive, en échange constant avec le milieu[2]. Il a été établi que des solvants pouvaient inhiber la fibrillogenèse en compétitionnant avec l'eau pour les sites de ponts hydrogène[15]. De plus, il s'avère que le coût entropique pour maintenir plus de 500 molécules d'eau par triple hélice soit trop important pour justifier que l'eau joue un rôle stabilisant[1]. L'eau qui se trouve liée au collagène par des ponts hydrogène est donc très mobile et peut être remplacée par le phosphate. Cette hypothèse est très plausible en considérant que l'utilisation de solvants pouvant former des ponts hydrogène peuvent remplacer des molécules d'eau du collagène[7]. L'utilisation de ces solvants ne perturbe pas la triple hélice, mais l'arrangement de la superstructure[7]. De plus, le gonflement du collagène rend les molécules d'eau liées plus accessibles pour échanger avec le milieu. Il est possible que les groupements des chaînes latérales subissent un changement de conformation pour satisfaire les interactions avec les phosphates. Il existe plusieurs groupements sur les chaînes latérales du collagène pouvant être impliqués dans les ponts hydrogène. Il y a entre autres les acides aminés suivants qui peuvent former des ponts hydrogène : Arg, His, Lys, Hly, Asp, Glu, Ser, Thr, Tyr, 3-Hyp et 4-Hyp[16]. La figure 1 illustre bien le nombre important de ces groupements dans le collagène. Il a été proposé que les acides

carboxyliques des chaînes latérales soient responsables de la force d'adhésion d'une résine dentinaire une fois protonés[17]. Les résultats des expériences réalisées démontrent bien qu'il existe un pH critique qui se situe près de 2 auquel ces chaînes latérales sont protonées. De plus, la présence de H_3PO_4 même à des pH plus élevés démontre bien l'importance des ponts hydrogène au maintien d'une espèce sur le collagène chargé.

6.6.pKa des chaînes latérales

Une particularité émane du pH utilisé pour observer un changement spectroscopique dans le domaine des acides carboxyliques. En effet, les pKa des acides aspartique et glutamique sont près de 4. Il faut descendre à un pH d'au moins 1,5 pour observer un changement spectroscopique, ce qui suppose que les interactions sont fortes et qu'il faut véritablement forcer le gonflement des fibrilles pour avoir accès à la majorité des chaînes latérales. Une autre observation qui conduit à la conclusion que le collagène doit être soumis à de faibles pH pour pouvoir être protoné non seulement en surface, mais entre les fibrilles.

6.7.Conclusion partielle

Le traitement du collagène avec des solutions acides a pour conséquence de laisser des contre ions de l'acide ou l'acide lui-même adsorbés sur le collagène. Plus le pH est bas, plus il y a protonation, et donc gonflement, et par conséquent, adsorption des espèces sur le collagène. Les espèces adsorbées dépendent du pH et de leur concentration dans la solution. Le mécanisme d'adsorption dépend d'abord du pH de la solution. Le pH 0,7 représente une situation particulière où peu importe le rinçage que subit le collagène, le collagène demeure chargé positivement et le groupement phosphate est présent sous sa forme protonée.

6.8. Références

1. Steven K. Holmgren, Kimberley M. Taylor, Lynn E. Bretscher et Ronald T. Raines, *Code for collagen's stability deciphered*, Nature, 1998. **392** , p. 666-667.
2. Jürgen Engel et Darwin J. Prockop, *Does Bound Water Contribute to the Stability of Collagen?*, Matrix Biology, 1998. **17** , p. 679-680.
3. G. N. Ramachandran et C. Ramakrishnan, *Molecular Structure*, dans *Biochemistry of Collagen*, Editeur R.N. Ramachandran & A.H. Reddi, 1976, Plenum Press: New York. p. 45-84.
4. Darwin J. Prockop, Richard A. Berg, Kari I. Kivirikko et Jouni Uitto, *Intracellular Steps in the Biosynthesis of Collagen*, dans *Biochemistry of Collagen*, Editeur G.N. Ramachandran & A.H. Reddi, 1976, plenum Press: New York. p. 163-273.
5. Manju Grover Venugopal, John A. M. Ramshaw, Emory Braswell, Dan Zhu et Barbara Brodsky, *Electrostatic Interactions in Collagen-like Triple-Helical Peptides*, Biochemistry, 1994. **33** , p. 7948-7956.
6. Luigi Vitagliano, George Némethy, Adrina Zagari et Harold A. Scheraga, *Stabilization of the Triple-Helical Structure of Natural Collagen by Side-Chain Interactions*, Biochemistry, 1993. **32** , p. 7354-7359.
7. N. Kuznetsova, D. C. Rau, V. A. Parsegian et S. Leikin, *Solvent Hydrogen-Bond Network in Protein Self-Assembly: Solvation of Collagen Triple Helices in Nonaqueous Solvents*, Biophys. J., 1997. **72** , p. 353-362.
8. A. Ripamonti, N. Roveri, D. Braga, D. J. S. Hulmes, A. Miller et P. A. Timmins, *Effects of pH and Ionic Strength on the Structure of Collagen Fibrils*, Biopolymers, 1980. **19** , p. 965-975.
9. K. Agee, I. Tunnah, Y. Zhang, E. L. Pashley et D. H. Pashley, *Denaturing Effects of Acids and Additives on Rat Tail Tendon*, AADR Abstract 2411, 1997 , p. 10 pages.

10. Anders Linde, Meera Bhowan et William T. Butler, *Non-Collageneous Proteins of Rat Dentin. Evidence that Phosphoprotein is not Covalently Bound to Collagen*, Biochim. Biophys. Acta, 1981. **667** , p. 341-350.
11. Thomas Dahl, Boris Sabsay et Arthur Veis, *Type I Collagen-Phosphophoryn Interactions: Specificity of the Monomer-Monomer Binding*, J. Struc. Biol., 1998. **123** , p. 162-168.
12. Per-Olof J. Glantz, Thomas Arnebrant, Tommy Nylander et Robert E. Baier, *Bioadhesion - a phenomenon with multiple dimensions*, Acta Odontol. Scand., 1999. **57** , p. 238-241.
13. S. Leikin, V. A. Parsegian et D. C. Rau, *Hydration Forces*, Annu. Rev. Phys. Chem., 1993. **44** , p. 369-395.
14. T. Saito, A. L. Arsenault, M. Yamauchi, Y. Kuboki et M. A. Crenshaw, *Mineral Induction by Immobilized Phosphoproteins*, Bone, 1997. **21** (4), p. 305-311.
15. N. Kuznetsova, S. L. Chi et S. Leikin, *Sugars and Polyols Inhibit Fibrillogenesis of Type I Collagen by Disrupting Hydrogen-Bonded Water Bridges between the Helices*, Biochemistry, 1998. **37** , p. 11888-11895.
16. Serge N. Vinogradov et Robert H. Linnell, *Hydrogen Bonding*. 1971, New York: Van Nostrand Reinhold Company. 319.
17. Norihiro Nishiyama, Tetsuo Asakura, Kazuomi Suzuki, Tatsusako Sato et Kimiya Nemoto, *Adhesion mechanisms of resin to etched dentin primed with N-methacryloyl glycine studied by ¹³C-NMR*, J. Biomed. Mater. Res., 1998. **40** , p. 458-463.

CHAPITRE 7

7. CONCLUSION

7.1. Le collagène et l'acide chlorhydrique

Le collagène ayant été traité avec des solutions d'acide chlorhydrique présente des bandes caractéristiques de carbonyles d'acides carboxyliques. Cette constatation suppose la protonation des chaînes latérales du collagène. L'apparition de cette bande est proportionnelle à la disparition des bandes des ions carboxylates. De plus, il est observé que des amines tertiaires sont protonées en formant un complexe nommé amine chlorhydrique tertiaire en raison de l'apparition des bandes ammoniums. De plus, des dépendances en fonction du temps et du pH sont observées. Il n'est pas permis de croire que le collagène ait subi de dénaturation au cours de ces traitements.

7.2. Le collagène et l'acide maléique

L'analyse des résultats obtenus dans le cadre de l'utilisation de solutions d'acide maléique ne permet pas d'observer des bandes critiques sur le collagène. Or, il a été démontré que l'acide maléique présentait des signaux que pour la solution de pH 1,0 et que l'intensité du signal était proportionnelle au temps d'exposition.

7.3. Le collagène et l'acide phosphorique

7.3.1. Source de stabilisation

La présence des groupements phosphate H_3PO_4 et $H_2PO_4^-$ sur le collagène est favorisée par quelques facteurs. D'abord, le gonflement des fibres induit par le faible pH ouvre la voie à ces deux espèces. En vue d'obtenir des solutions de pH faibles, une plus grande quantité d'acide phosphorique est nécessaire, ce qui se traduit par une plus grande concentration des espèces présentes. Le traitement du collagène à de si faibles pH conduit ce dernier à porter une charge positive. Cette charge positive provient essentiellement des ions carboxylates

des chaînes latérales qui sont maintenant protonés et qui stabilisaient les ions ammoniums chargés positivement. D'où l'introduction de deux espèces phosphates, responsables de la stabilisation du collagène. Le H_2PO_4^- stabilise les charges positives des chaînes latérales alors que le H_3PO_4 forme des ponts hydrogène avec les chaînes latérales. Le temps d'exposition a une influence sur la quantité des groupements phosphate, mais non sur leur nature. Ainsi, pour les pH plus élevés que 1,5, il y a des contributions dues aux H_2PO_4^- alors que pour les pH inférieurs à 1,5, la principale contribution provient des H_3PO_4 . En accroissant le temps d'exposition, on augmente la quantité de chacune de ces espèces selon le pH du traitement.

7.3.2. *Effet des rinçages*

Le rinçage influence le type de phosphate qui demeure sur le collagène et il est possible de protoner ou de déprotoner l'acide phosphorique selon le rinçage effectué. Le rinçage à l'acétone n'enlève pratiquement pas d'acide phosphorique et de plus il est présent sous la forme protonée dans une grande proportion. Le signal du phosphate diminue en rinçant avec les solutions aqueuses. Il est évident qu'il existe des interactions suffisamment fortes entre le collagène et l'acide phosphorique pour empêcher le départ de ce dernier. Plusieurs interactions sont proposées, mais la formation de ponts hydrogène demeure la plus stabilisante. Plusieurs de ces interactions sont possibles pour une seule molécule d'acide phosphorique. Les interactions électrostatiques sont également mises à contribution afin de stabiliser la structure du collagène chargé positivement à faible pH. Dans ce cas, l'acide phosphorique peut stabiliser la charge par voie de ponts hydrogène alors qu'à pH plus élevé, la stabilisation observée est due à l'acide phosphorique ionisé et l'interaction est alors ionique.

7.3.3. *Particularité du pH 0,7*

Le traitement du collagène avec une solution d'acide phosphorique de pH 0,7 présente des propriétés spectroscopiques qui lui sont uniques. Le rinçage

avec une solution de pH 9,0 n'est pas arrivé à enlever le proton de l'acide. Ce fut l'unique cas. Le signal est demeuré constant peu importe le rinçage. De plus, le signal maximal est atteint dès les premières secondes de traitement avec la solution à pH 0,7, contrairement aux autres pH.

7.3.4. Influence de la préparation des échantillons

Le collagène a été traité en utilisant deux approches distinctes, d'abord le simple vide a été utilisé afin de retirer le solvant qui se trouvait dans les fibres. Il s'est avéré que le premier protocole utilisé ne permettait qu'un faible contrôle du temps d'exposition et ne permettait pas de récupérer l'échantillon en entier. En contre parti, l'utilisation de la lyophilisation a permis de traiter une quantité constante de collagène et de contrôler les temps de traitement et de rinçage à la seconde près. Une telle approche est jugée nécessaire si la finalité du projet est considérée; traiter des patients lors de restaurations dentinaires. Certains acides sont déjà utilisés, c'est pourquoi une approche permettant de reproduire le plus possible l'intervention clinique est nécessaire, et l'utilisation de la lyophilisation permet d'y arriver. L'aspect macroscopique du collagène n'est pas semblable à celui qui se retrouve dans la dentine, ce dernier étant entouré d'une matrice minérale, mais le traitement s'effectue à la surface du collagène lyophilisé. Il est donc convenu que cette approche tient compte davantage de l'aspect commercial qui pourrait découler du présent projet.

7.4. Spectroscopie photoacoustique

La spectroscopie photoacoustique a été la technique la plus utilisée au cours de ces travaux et a su démontrer son potentiel dans le domaine de l'étude de protéines. La possibilité d'introduire un échantillon de taille appréciable sans avoir à lui faire subir de manipulation mécanique dans le but de le soumettre à la caractérisation représente un point fort de la technique. On ne pourrait passer outre la qualité des spectres obtenus et leur reproductibilité sur une période de plus de deux ans. Le temps d'acquisition des spectres est de moins de 8

minutes et ils présentent très peu de bruit. La venue des spectromètres dits « Step-Scan » permettra une étude avec résolution en profondeur des échantillons, ce qui introduira une nouvelle variable dans la compréhension du mécanisme qui survient lors du traitement du collagène.

7.5.Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman permet de faire l'assignation de bandes que la spectroscopie photoacoustique ne permettait de faire. Ainsi, la quantification de la contribution des espèces phosphate a été réalisée grâce à la spectroscopie Raman. Une plus grande utilisation de cette technique permettra sans doute de comprendre précisément le mécanisme d'adsorption des espèces acides. La spectroscopie Raman combinée à la spectroscopie photoacoustique permettra de véritablement saisir l'impact des acides sur le collagène.

7.6.Aspect pratique

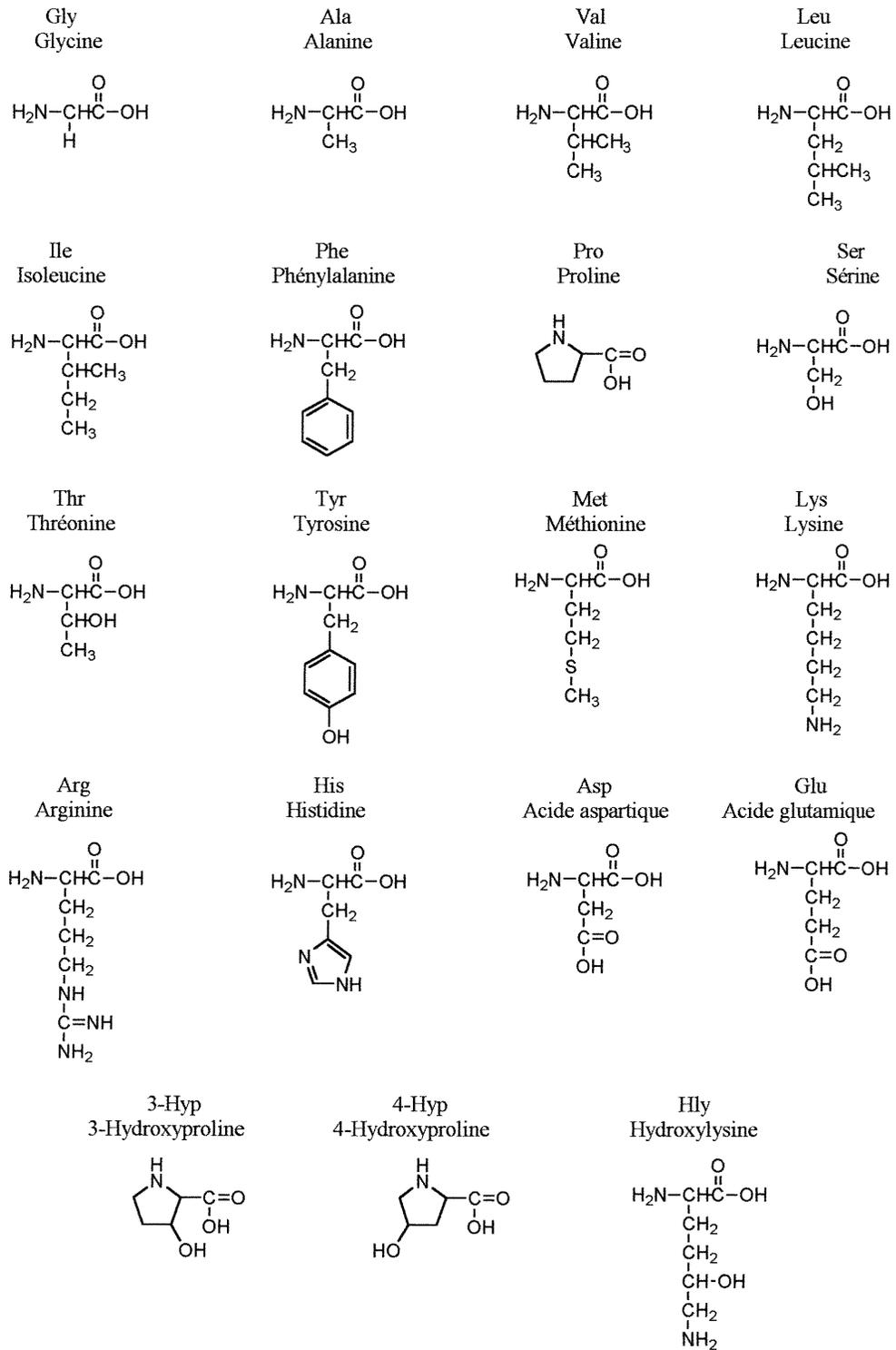
Le fait que l'acide phosphorique présente des caractéristiques particulières et plus encore à pH 0,7, n'est certainement pas étranger à son usage commercial en tant que déminéralisant. En effet, le choix des produits utilisés dans ces travaux est orienté vers la médecine dentaire. La médecine dentaire utilise des acides concentrés dont les pH sont de l'ordre de 1. L'acétone est utilisée comme solvant pour plusieurs matériaux de restauration. Ce que ces travaux négligent est l'effet tampon, la dentine étant composée d'hydroxyapatite de calcium. Lors de la déminéralisation en clinique, un grand nombre d'ions sont présents dans le milieu, contrairement à ce qui a été produit ici. Enfin, la dénaturation du collagène est possible en considérant le pH des solutions utilisées, mais elle ne fut pas observée dans ces travaux.

7.7.Voies à entreprendre

L'acide phosphorique constitue une espèce qui demeure liée au collagène malgré de nombreux rinçages. Son utilisation dans la promotion de l'adhésion

dentinaire est un aspect qui est suggéré et qui devrait être développé. En effet, l'adhésion chimique est recherchée et le groupement phosphate est de toute vraisemblance un groupement intéressant pour arriver à cette fin. Il semble occuper les sites où était positionnée l'eau, mais ne fait pas le chemin inverse si on rince à l'eau. Il existe donc un potentiel d'adhésion qui ne doit pas être négligé et sur lequel d'autres travaux devraient pouvoir déterminer la nature chimique de ces interactions.

Annexe A : Acides aminés



Structure chimique des principaux acides aminés du collagène de type I, les abréviations utilisées sont indiquées.

Annexe B : Choix de solvant pour laver le collagène ; étude PA-IRTF

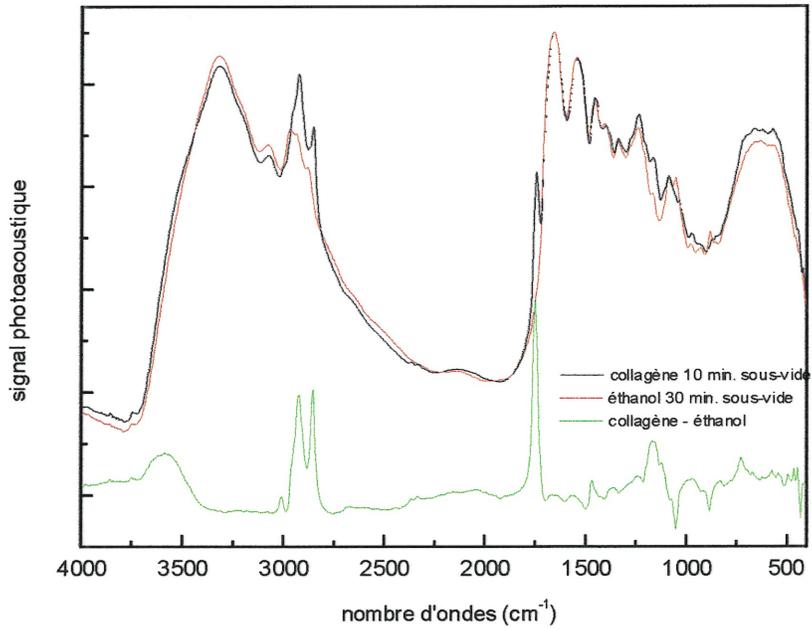


Figure a : Soustraction spectrale du collagène tel que reçu du fournisseur par le collagène traité à l'éthanol pendant 10 minutes au bain à ultrasons.

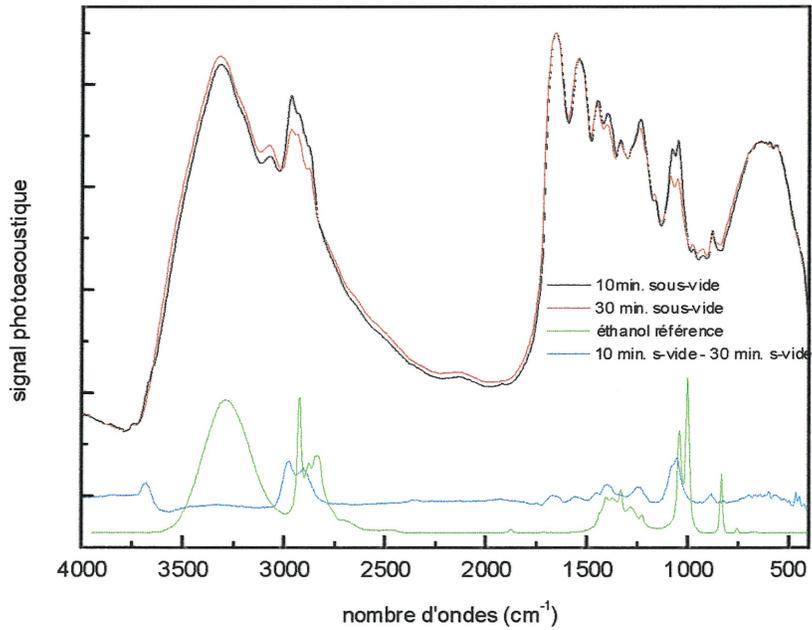


Figure b : Représentation spectrale de la disparition d'éthanol après 30 minutes sous-vide en utilisant le spectre à 10 minutes sous vide comme référence.

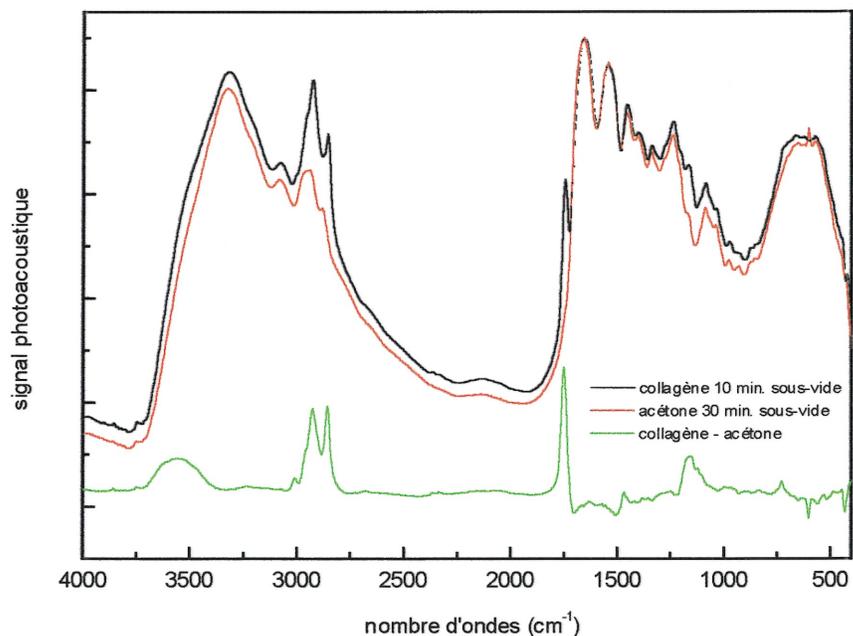


Figure c : Soustraction spectrale du collagène tel que reçu du fournisseur par le collagène traité à l'acétone pendant 10 minutes au bain à ultrasons.

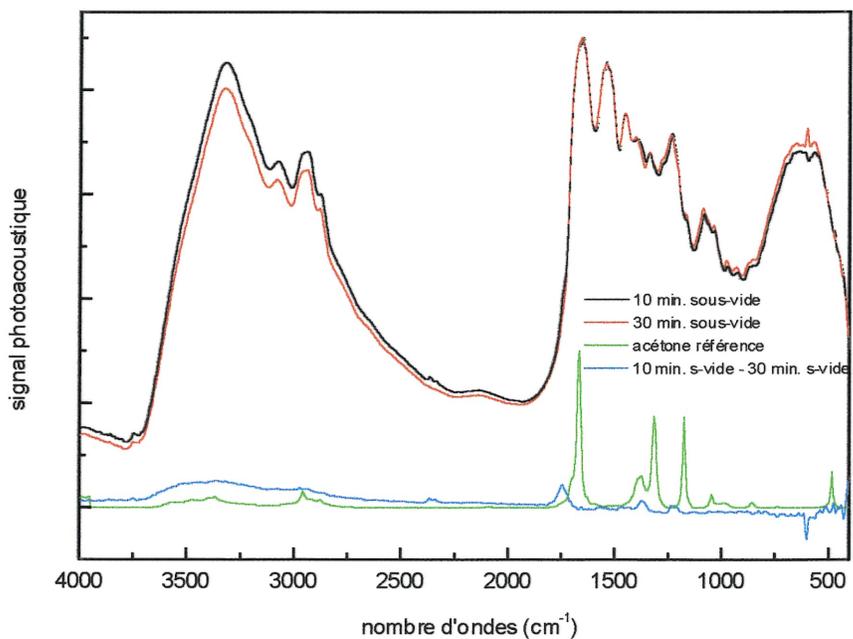


Figure d : Représentation spectrale de la disparition d'acétone après 30 minutes sous-vide en utilisant le spectre à 10 minutes sous vide comme référence.

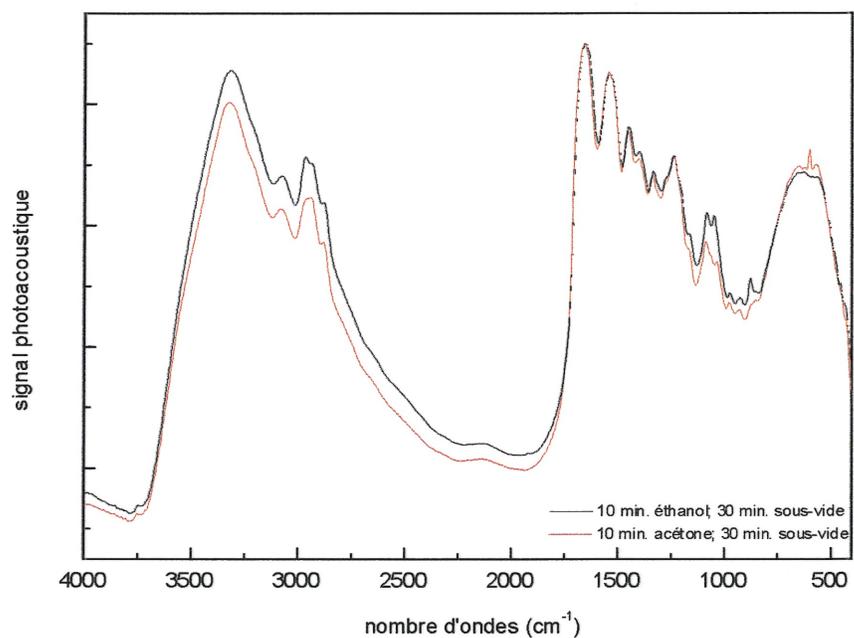


Figure e : Spectres du collagène rincé pendant 10 minutes au bain à ultrasons avec l'acétone et l'éthanol.

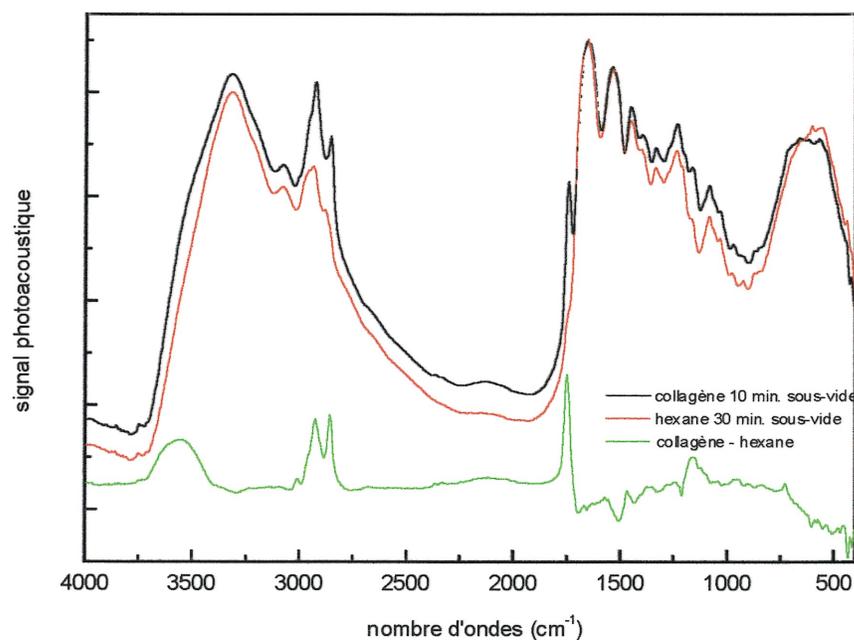


Figure f : Soustraction spectrale du collagène tel que reçu du fournisseur par le collagène traité à l'hexane pendant 10 minutes au bain à ultrasons.

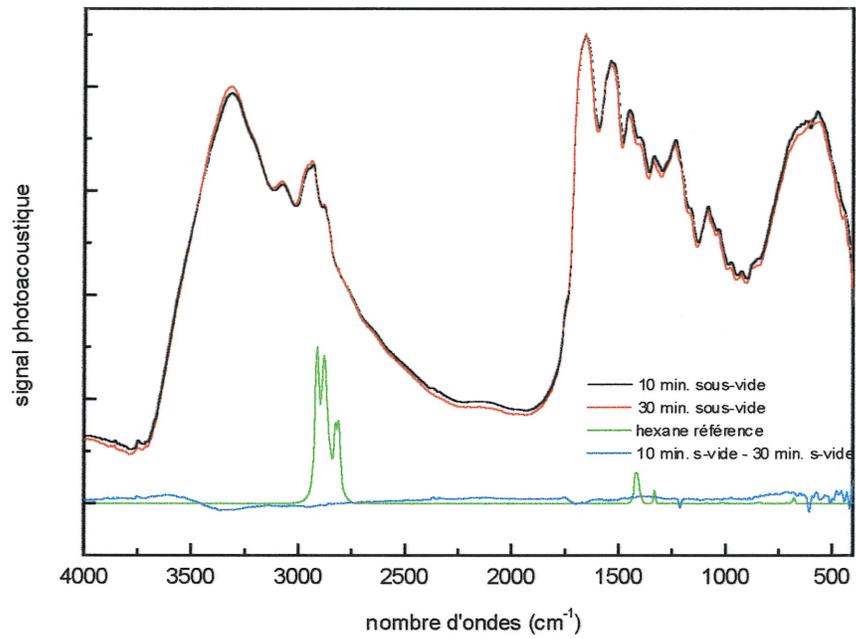


Figure g : Représentation spectrale de la disparition d'hexane après 30 minutes sous-vide en utilisant le spectre à 10 minutes sous vide comme référence

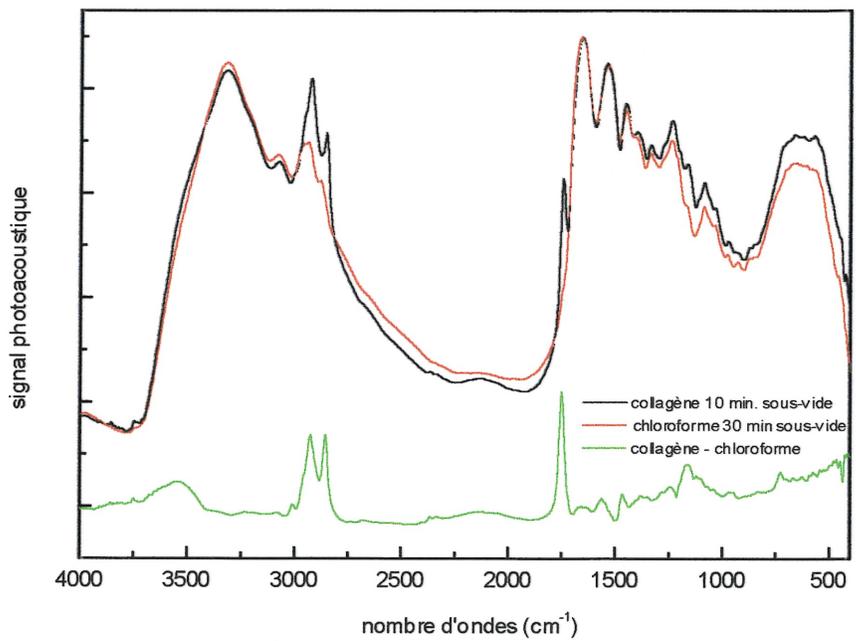


Figure h : Soustraction spectrale du collagène tel que reçu du fournisseur par le collagène traité au chloroforme pendant 10 minutes au bain à ultrasons.

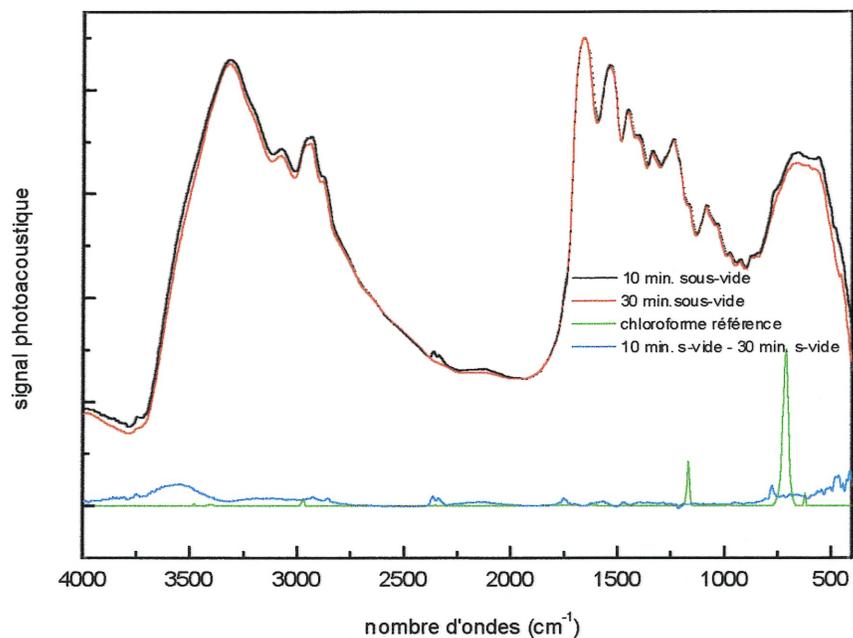


Figure i: Représentation spectrale de la disparition du chloroforme après 30 minutes sous-vide en utilisant le spectre à 10 minutes sous vide comme référence.

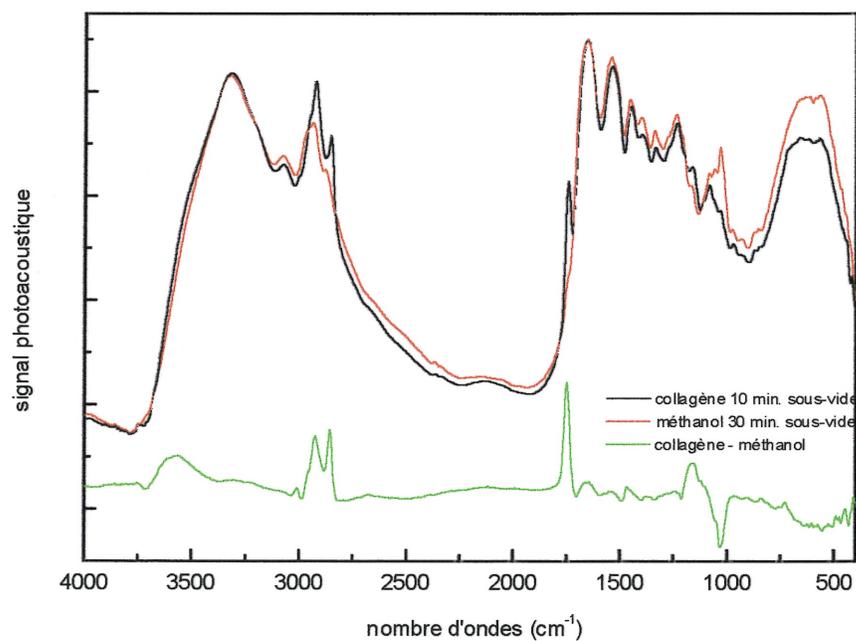


Figure j : Soustraction spectrale du collagène tel que reçu du fournisseur par le collagène traité au méthanol pendant 10 minutes au bain à ultrasons.

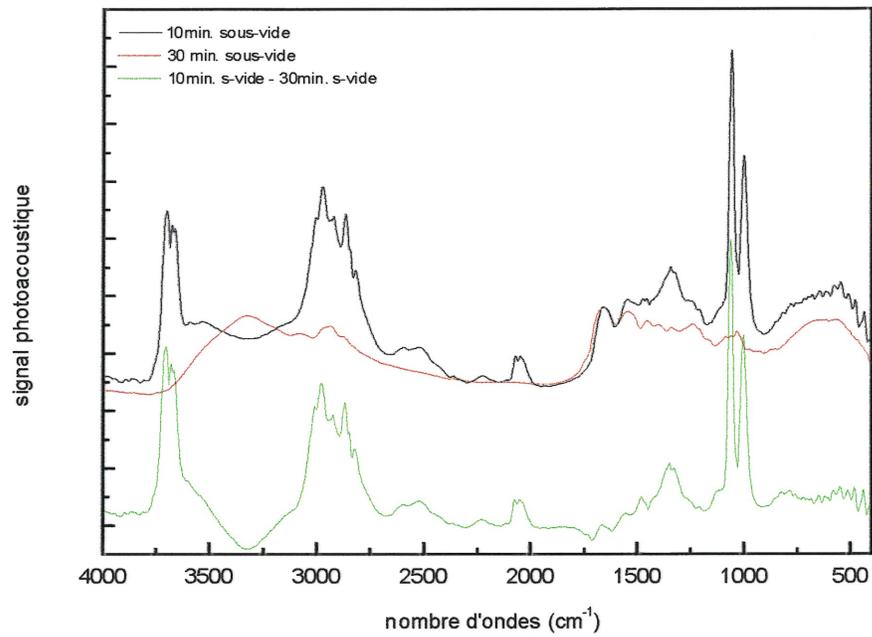


Figure k : Représentation spectrale de la disparition du méthanol après 30 minutes sous-vide en utilisant le spectre à 10 minutes sous vide comme référence.

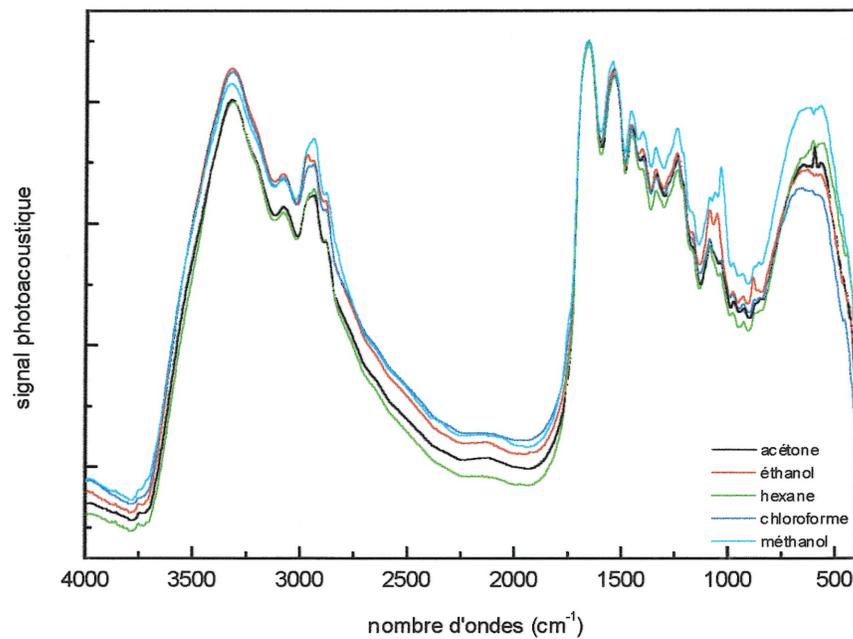


Figure l : Spectres du collagène traité par les solvants purs pendant 10 minutes au bain à ultrasons puis placé 30 minutes sous vide.

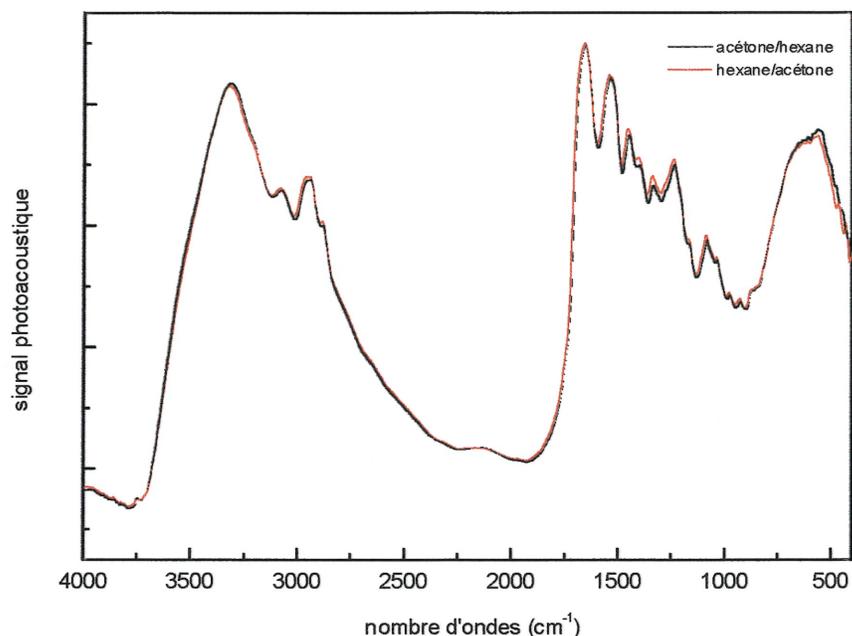


Figure m : Spectre du collagène traité successivement par deux solvants pendant 10 minutes puis placé 30 minutes sous vide.

L'expérience nous a permis de tirer quelques leçons utiles pour arriver à obtenir un collagène sans contaminants. D'abord, nous avons identifié la nature du signal de ce contaminant et nous avons pu constater la reproductibilité de ce signal pour l'ensemble des solvants utilisés. De ces solvants, certains interagissent fortement avec le collagène, c'est le cas de l'éthanol et du méthanol via des ponts hydrogène. Pour l'acétone, le chloroforme et l'hexane, il s'est avéré qu'ils avaient les propriétés appropriées pour déloger efficacement le contaminant. De plus, le traitement du collagène par combinaison de solvants s'est avéré encore plus satisfaisant pour éliminer le contaminant. La spectroscopie photoacoustique s'est avérée une méthode très utile et il semble que ce soit elle qui s'impose dans ce genre d'étude de surface.

Enfin, le collagène lavé par l'acétone est la technique qui permet d'enlever le contaminant le plus efficacement et qui ne laisse pas de trace solvant sur les spectres. C'est l'acétone qui sera utilisée pour laver le collagène.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier celui grâce à qui tout a été possible, mon directeur de recherche, le professeur Thomas H. Ellis. J'ai appris énormément en sa compagnie et je lui en serai toujours reconnaissant.

Je tiens à remercier le professeur Julian Zhu pour l'utilisation de certains de ses appareils au cours de mes travaux.

Je voudrais également remercier les professeurs Edward Sacher, Ivan Stangel et plus particulièrement Antonella Badia pour les discussions stimulantes que nous avons eues.

Je ne pourrais passer outre les membres présents et passés du groupe de recherche en compagnie desquels le travail a semblé plus facile. Je ne pourrai oublier les bons moments passés ensemble.

Je tiens finalement à rendre hommage à mes parents qui m'ont toujours encouragé et qui m'ont donné les moyens pour réussir dans mes études et dans la vie.