



HAL
open science

De l'imagerie des parchemins à la physico-chimie du collagène

Jérémie Mathurin, Laurianne Robinet, Alexandre Dazzi, Ariane Deniset-Besseau, Gervaise Mosser, Margaux Schmeltz, Gael Latour, Marie-Claire Schanne-Klein

► To cite this version:

Jérémie Mathurin, Laurianne Robinet, Alexandre Dazzi, Ariane Deniset-Besseau, Gervaise Mosser, et al.. De l'imagerie des parchemins à la physico-chimie du collagène. Stéphane Blanc; Mokrane Bouzeghoub; Martina Knoop. L'Interdisciplinarité - Voyages au delà des disciplines, CNRS Edition, 2023, 978-2-271-13983-2. hal-04310092

HAL Id: hal-04310092

<https://hal.science/hal-04310092v1>

Submitted on 27 Nov 2023

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

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

DE L'IMAGERIE DES PARCHEMINS À LA PHYSICO- CHIMIE DU COLLAGÈNE

Jérémie Mathurin, Laurianne Robinet, Alexandre Dazzi, Ariane Deniset-Besseau, Gervaise Mosser, Margaux Schmeltz, Gaël Latour et Marie-Claire Schanne-Klein

Le collagène forme une famille de protéines dont la structure est constituée de domaines en triple hélice. Il s'agit d'un composant essentiel de la peau, bien évidemment, mais aussi des tendons, des artères, de la cornée, des os et des cartilages, des poumons, etc. Chez les collagènes de type « fibrillaire », majoritaires, les triples hélices s'alignent pour former des structures nommées fibrilles, d'un diamètre de quelques nanomètres au micromètre, qui elles-mêmes s'organisent de manière différente selon les tissus. Cette structuration de l'échelle nanométrique à l'échelle millimétrique donne à chaque tissu ses propriétés spécifiques, comme la résistance des tendons ou la transparence de la cornée, fournissant un envi-

ronnement adéquat indispensable au bon fonctionnement des différents types cellulaires. Cette structure multi-échelle peut être affectée lors de pathologies ou de traumatismes, ce qui entraîne des remodelages tissulaires souvent irréversibles. Par exemple, les fibroses correspondent à une accumulation pathologique de collagène qui rigidifie un organe (foie, rein, poumon...) et l'empêche peu à peu de fonctionner. À l'inverse, le collagène peut être dégradé, par exemple lors de l'invasion de cellules cancéreuses.

Le collagène est aussi un composant essentiel de certains objets du patrimoine, notamment de ceux provenant de peaux animales: les cuirs, les parchemins (figure 1) et les spécimens naturalisés. Les

Le collagène est un élément du corps humain essentiel à la peau, mais aussi aux tendons, artères, poumons, etc. Sa structure fibrillaire multi-échelle donne à chaque tissu ses propriétés spécifiques mais peut subir des remodelages irréversibles lors de pathologies. Le collagène est également présent dans les objets du patrimoine issus de peaux animales tels que les cuirs et les parchemins, dont la conservation est conditionnée par son état d'altération. Pour analyser celui-ci aux échelles nanométriques et micrométriques, des chercheurs en physique, chimie et sciences de la conservation travaillent ensemble avec des outils de microscopie et de spectroscopie.

microscopie
physique
patrimoine
spectroscopie
chimie

conservateurs, les restaurateurs et les scientifiques du patrimoine sont confrontés à des problématiques de conservation et de restauration de ces objets précieux sur le plan historique. Ils doivent pour cela évaluer l'état d'altération du collagène constituant ces objets et l'impact de l'environnement sur sa conservation, ce qui est assez proche de certaines des problématiques biomédicales évoquées ci-dessus, aussi surprenant que cela puisse sembler!

Que ce soit dans un but biomédical ou pour les sciences du patrimoine, il est donc essentiel de pouvoir caractériser la structure multi-échelle du collagène. Nous allons voir que les techniques d'imagerie non invasives des physiciens permettent de visualiser le collagène à l'échelle micrométrique au sein d'un tissu ou d'un objet du patrimoine, tandis que les outils spectroscopiques des chimistes permettent d'analyser l'état d'altération du collagène à l'échelle nanométrique. Enfin, ces analyses nécessitent une connaissance de ces matériaux spécifiques, de leur mode de préparation et de conservation. Il s'agit donc d'une activité de recherche à la croisée de la physique, de la chimie et des sciences de la conservation.

Visualiser le collagène dans un tissu intact

Toute technique d'imagerie présente un compromis entre résolution spatiale* et profondeur d'imagerie. Par exemple, la microscopie électronique* permet de distinguer des objets d'une taille nanométrique, mais elle se limite à la visualisation d'échantillons très minces ou de la surface d'échantillons épais, tandis que l'imagerie ultrasonore* présente une bonne profondeur de pénétration (une dizaine de centimètres), mais seulement avec une résolution de l'ordre du millimètre. L'imagerie optique* se situe dans une gamme intermédiaire et permet une résolution de l'ordre du micromètre sur une profondeur pouvant atteindre le millimètre. C'est donc un outil adapté à l'imagerie des structures cellulaires et tissulaires. Dans notre cas, l'objectif est de visualiser la structure du collagène dans un tissu biologique, c'est-à-dire de développer

une imagerie tridimensionnelle (3D) du collagène sans aucun marquage. Ceci exclut les techniques dites « histologiques », qui sont basées sur la coloration de coupes minces de tissus, utilisées en hôpital, ainsi que les techniques 3D non spécifiques du collagène, telles que la tomographie optique cohérente* (OCT), utilisée en ophtalmologie.

La technique de référence pour l'imagerie structurale du collagène est aujourd'hui la microscopie par génération de seconde harmonique (ou SHG pour Second Harmonic Generation). Cette technique fait partie des microscopies multiphotoniques basées sur des processus excités par plusieurs photons* simultanément. Ces processus nécessitent une forte intensité lumineuse et ne se produisent donc qu'au niveau du volume focal du microscope, là où l'intensité de la lumière est la plus forte. Ce sectionnement optique intrinsèque permet une imagerie 3D par balayage du faisceau lumineux d'excitation, mais surtout, présente l'avantage d'être peu sensible à la diffusion* et donc de faciliter la pénétration dans les tissus biologiques jusqu'à quelques centaines de micromètres. Ceci est aussi favorisé par l'utilisation d'une source lumineuse d'excitation dans le proche infrarouge (700-1200 nanomètres), moins diffusée

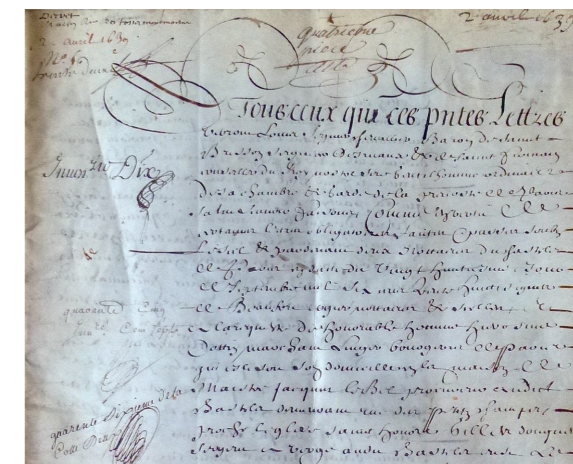


Figure 1. Décret sur parchemin daté de 1639.

et absorbée que les excitations bleues utilisées en microscopie classique.

Un avantage décisif de la microscopie multiphotonique est son caractère multimodal : les différents signaux multiphotoniques connus des physiciens permettent de visualiser en parallèle les différentes composantes d'un tissu biologique. Par exemple, les signaux de fluorescence permettent d'imager sans marquage les cellules ou les fibres élastiques grâce à leur fluorescence intrinsèque. Le signal SHG, quant à lui, est spécifique des milieux denses et non centro-symétriques. À l'échelle moléculaire, il est généré au niveau des liaisons peptidiques* qui forment le squelette des protéines et présentent un environnement électronique non centro-symétrique. Toutefois, seule une protéine de structure fibrillaire comme le collagène reste non centro-symétrique à l'échelle supé-

rieure micrométrique. La forte densité des fibrilles de collagène permet, de plus, de détecter leur signal SHG pour un diamètre aussi petit que 30 nm ! *A contrario*, le signal SHG est nul quand le collagène ne présente pas de structure fibrillaire, comme le collagène de la membrane entre le derme et l'épiderme. C'est aussi le cas pour le collagène dénaturé, qui a perdu sa structure en fibrille et en triple hélice pour former de la gélatine, gel peu dense et centro-symétrique de simples hélices. Le signal SHG permet donc de détecter le collagène sous sa forme fibrillaire dans les tissus biologiques.

C'est aussi l'outil idéal pour déterminer l'état de conservation des parchemins qui sont constitués de peaux animales grattées et séchées sous tension, c'est-à-dire essentiellement de fibres de collagène étirées parallèlement à la surface. Cet état de conservation est, pour

l'instant, soit estimé qualitativement, un aspect cassant et translucide indiquant un parchemin très dégradé, soit mesuré par des techniques calorimétriques qui nécessitent un prélèvement. Les scientifiques du patrimoine sont donc en demande de techniques non invasives et, dans l'idéal, quantitatives pour pouvoir intervenir avant que la dégradation ne soit irréversible, c'est-à-dire avant que le collagène ne soit dénaturé en gélatine.

Nous avons étudié des parchemins avec un objectif à air (sans contact) sur notre microscope multiphotonique. Les signaux SHG mettent en évidence, comme attendu, des fibres de collagène sur les zones préservées alors qu'aucun signal SHG n'est observé sur des zones dégradées (figure 2). De plus, et de façon assez inattendue, ces zones dégradées présentent un signal de fluorescence. Cependant les parchemins sont des milieux complexes et l'origine de cette fluorescence reste ambiguë. Pour déterminer de manière rigoureuse s'il s'agit d'une signature de la gélatine, il est nécessaire de mener des analyses chimiques sur des échantillons modèles provenant de collagène purifié.

Cartographier les liaisons chimiques à l'échelle nanométrique

La spectroscopie infrarouge* (IR) est classiquement utilisée pour analyser la composition chimique d'un échantillon. Le domaine IR correspond en effet aux énergies (exprimées en cm^{-1} *) caractéristiques de chaque liaison chimique présente dans une molécule. Le spectre d'absorption* IR est donc considéré comme l'empreinte digitale d'une molécule. Cependant, l'acquisition de spectres IR sur des parchemins dégradés de façon hétérogène ne montre aucune différence entre les zones conservées et dégradées. En effet, du fait de la résolution de l'IR, ces spectres sont moyennés sur une zone d'environ 10 micromètres de diamètre où collagène, gélatine et autres constituants endogènes ou exogènes coexistent. Il est alors nécessaire d'acquérir ces spectres d'absorption IR sur une zone bien plus restreinte, de l'ordre du micromètre,

pour pouvoir isoler le spectre d'une fibrille de collagène ou d'un amas de gélatine.

L'association de la spectroscopie IR à la microscopie par force atomique* (ou AFM pour *Atomic Force Microscopy*) permet de relever ce défi. Cette technique hybride, appelée AFMIR, permet à la fois d'imager la morphologie de la surface d'un échantillon à l'échelle nanométrique et de l'analyser chimiquement. L'imagerie morphologique est réalisée grâce au système de micro-levier de l'AFM, comportant une pointe nanométrique qui se déplace sur la surface et peut donc en mesurer le relief. L'analyse chimique, quant à elle, se base sur l'effet photothermique. La source laser IR illumine la surface et excite les vibrations moléculaires des groupements chimiques présents au sein de l'échantillon. Ceci induit une légère augmentation de la température (quelques degrés) et donc du volume de l'échantillon. Cette dilatation est aussitôt détectée par la pointe de l'AFM en contact avec la surface. Comme l'amplitude de la dilatation est proportionnelle à l'absorption IR de l'échantillon, il est possible de remonter à l'absorption locale de l'échantillon et d'obtenir une cartographie chimique à l'échelle nanométrique.

Identifier la signature du collagène dégradé

L'analyse combinée par AFMIR et microscopie multiphoton a d'abord été appliquée à des fibrilles de collagène et à de la gélatine obtenues à partir de collagène purifié. Pour cela, nous avons extrait des triples hélices de collagène de tendons de queues de rat et les avons solubilisées dans une solution acide. Puis nous avons augmenté le pH afin d'induire la formation de fibrilles à pH neutre. Ces échantillons émettent un signal SHG caractéristique du collagène fibrillaire en microscopie multiphotonique et ils présentent un pic d'absorption dans l'IR caractéristique des liaisons peptidiques, au niveau de la bande dite « amide I », (bande à 1660 cm^{-1}). Dans un deuxième temps, le collagène est dénaturé en chauffant la solution à 45°C pendant 30 minutes pour obtenir de la gélatine. Celle-ci présente un signal de fluorescence et la même bande amide I

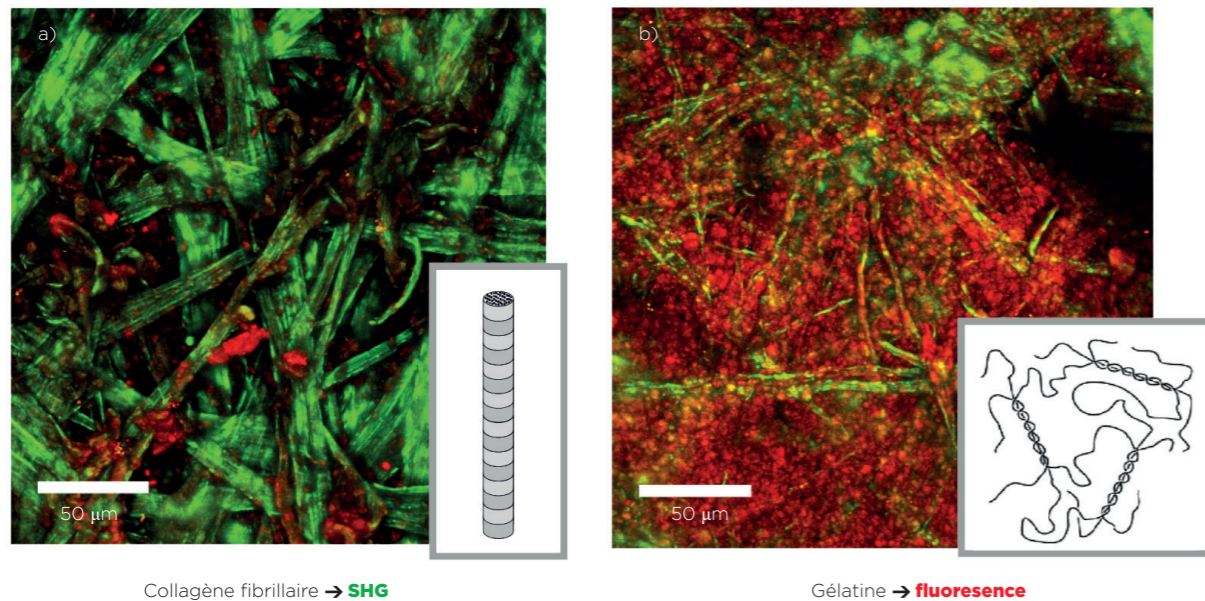


Figure 2. Imagerie multiphotonique en fausses couleurs de parchemins en (a) bon et (b) mauvais état de conservation. Les signaux SHG (en vert) sont spécifiques du collagène organisé sous forme fibrillaire, tandis que des signaux de fluorescence (en rouge) sont observés sur la gélatine dans les zones dégradées, ainsi que sur des résidus de graisse ou d'élastine dans les zones bien conservées.

que le collagène, mais élargie, ainsi qu'un nouveau pic d'absorption à 1740 cm^{-1} . Ces expériences montrent ainsi que la gélatine se caractérise à la fois par un signal de fluorescence et par un pic à 1740 cm^{-1} .

Des expériences d'imagerie corrélative sont ensuite conduites sur des échantillons de parchemins préservés ou dégradés. Des zones identiques sont imagées par les deux techniques afin de permettre une corrélation rigoureuse des signaux (figure 3). Cette étape est délicate en raison des résolutions et des champs de vue très différents pour chacune des deux techniques. Le protocole expérimental nécessite de débiter par l'imagerie multiphotonique sur une zone de taille millimétrique, puis de continuer avec l'AFMIR sur quelques micromètres de large. La fibrille de collagène prélevée

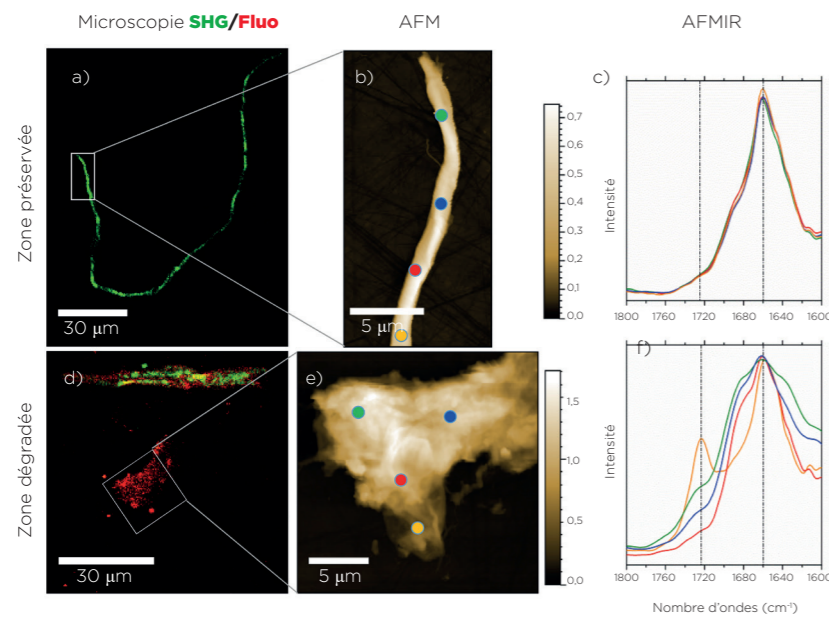


Figure 3. Corrélation des imageries multiphotoniques et IR sous pointe AFM (AFMIR) sur des zones préservée (A-C) et dégradée de parchemins (D-E). La fibre préservée de parchemins présente un signal SHG en vert (A) et un pic à 1660 cm^{-1} en AFMIR (C) sur les zones notées en couleur sur l'image topographique AFM (B). La zone dégradée de parchemins présente un signal de fluorescence en rouge (D) et un nouveau pic (ou épaulement) à 1720 cm^{-1} en AFMIR (F) sur les zones notées en couleur sur l'image topographique AFM (E). Adapté de G. LATOUR *et al.*, *Sci. Rep.* 6, 2016.

sur un parchemin préservé présente, comme dans les expériences précédentes, à la fois un signal SHG en microscopie multiphotonique et une bande amide I en AFMIR; tandis que l'échantillon prélevé sur une zone dégradée a, lui, perdu sa morphologie fibreuse et présente un signal de fluorescence et un épaulement à 1720 cm^{-1} sur la bande amide I. Ce résultat prouve sans ambiguïté que les signaux de fluorescence observés sur les parchemins dégradés proviennent bien de la gélatine.

Analyse de parchemins historiques

La microscopie multiphotonique peut donc être utilisée pour cartographier l'état de conservation du collagène de façon non-invasive dans les parchemins historiques. Nous avons ainsi étudié la « Mappa Mundi » d'Albi, l'une des deux plus anciennes cartes du monde, datant du VIII^e siècle, et démontré, fort heureusement, son excellent état de conservation. Nous avons aussi étudié des parchemins médiévaux de l'important fond historique de la médiathèque de Chartres, partiellement détruit lors d'un bombardement en 1944. Nous avons montré que l'état de conservation du collagène peut être très hétérogène au sein d'un même parchemin, d'où l'intérêt de notre outil de cartographie, et confirmé que les travaux de restauration réalisés récemment sur ces manuscrits médiévaux n'avaient pas altéré la structure du parchemin.

Beaucoup de questions restent cependant en suspens. Quel est le groupement chimique responsable de la fluorescence de la gélatine? Toutes les gélatines sont-elles fluorescentes ou est-ce limité à certaines conditions physico-chimiques de l'environnement? Réciproquement, certains types de dégradation induisent-ils un autre type de fluorescence? Pour explorer ces questions, des expériences de dénaturation thermique sous pointe AFM sont en cours dans différentes conditions de pH, solvant, etc. pour corréler microscopie multiphoton et AFMIR sur exactement le même échantillon avant et après dénaturation. Des expériences sont aussi nécessaires sur des parchemins intacts pour comprendre comment les conditions d'humidité et de température jouent sur les mécanismes d'hydrolyse* ou d'oxydation* lors de leur dégradation. Enfin, il ne faut pas oublier que cette expertise sur la dégradation du collagène acquise grâce aux sciences du patrimoine concerne une technique de microscopie initialement développée pour la biologie. Celle-ci pourrait donc être utilisée dans plusieurs problématiques de biologie: ingénierie tissulaire, cicatrisation, etc. La boucle sera ainsi bouclée!

cm⁻¹. Unité des nombres d'ondes qui correspondent à l'inverse de la longueur d'onde et permettent d'exprimer l'énergie d'une fréquence dans l'infrarouge.
Diffusion. Déviation dans diverses directions d'un faisceau lumineux lors de sa propagation dans un matériau.
Hydrolyse. Réaction chimique dans laquelle une liaison est rompue par l'action d'une molécule d'eau.
Imagerie optique. Technique utilisant la lumière pour éclairer un échantillon et en réaliser une image.
Imagerie ultrasonore ou échographie. Technique d'imagerie utilisant des ultrasons, utilisée classiquement en médecine, mais aussi en recherche scientifique.
Liaison peptidique. Liaison chimique fondamentale dans la formation des protéines et correspondant à une fonction amide.
Microscopie électronique. Microscopie à très fort grandissement qui utilise un faisceau d'électrons pour imager un échantillon.
Microscopie par force atomique (ou AFM pour Atomic Force Microscopy). Technique de visualisation très précise de la topographie d'un échantillon par balayage d'une pointe effilée à sa surface.

Oxydation. Réaction chimique au cours de laquelle une espèce chimique perd des électrons.
Photon. « Paquet » élémentaire de lumière en physique quantique.
Résolution spatiale. Distance caractérisant la capacité d'un système d'imagerie à distinguer les détails. Cette distance est définie comme la distance minimale pour que 2 points adjacents soient discernables. Elle peut être différente dans les directions latérales (dans le plan d'imagerie) et axiales (dans le sens de la profondeur).
Spectre d'absorption. Mesure de la capacité d'un matériau à absorber la lumière en fonction de la longueur d'onde de cette lumière.
Spectroscopie infrarouge. Technique de caractérisation chimique mesurant l'absorption du rayonnement infrarouge, qui varie selon les vibrations des liaisons chimiques présentes dans le matériau.
Tomographie optique cohérente. Technique d'imagerie optique permettant de réaliser des images tridimensionnelles d'un objet semi-transparent avec une résolution de l'ordre du micromètre.



- D. DÉBARRE *et al.* - *Microscopies multi-harmoniques pour l'imagerie structurale de tissus intacts*, *Médecine Sciences* 10, 2006.
- G. LATOUR, L. ROBINET, A. DAZZI, F. PORTIER, A. DENISET-BESSEAU et M.-C. SCHANNE-KLEIN - *Correlative Nonlinear Optical Microscopy and Infrared Nanoscopy Reveals Collagen Degradation in Altered Parchments*, *Sci. Rep.* 6, 2016.
- M.-C. SCHANNE-KLEIN - *L'imagerie multiphoton des peaux naturelles et synthétiques*, *Photoniques* 88, 2017.
- L. ROBINET *et al.* - *Analyse d'une carte du monde du VIII^e siècle : la Mappa Mundi d'Albi*, Support tracé 17, 2018.
- L. ROBINET *et al.* - *Ces manuscrits que l'on croyait perdus - La renaissance des manuscrits de Chartres*, Support tracé 18, 2018.
- G. LATOUR et L. ROBINET - *La microscopie optique tridimensionnelle, de l'imagerie biomédicale à la caractérisation des objets du patrimoine*, in *Instrumentation portable : quels enjeux pour l'archéométrie ?* Éditions des archives contemporaines, Collection Sciences archéologiques, 2019.
- A. DAZZI et A. DENISET-BESSEAU - *AFM-IR : caractérisation chimique à l'échelle nanométrique*, *Techniques de l'ingénieur*, 2019.