

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
1 juin 2006 (01.06.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/056700 A2

(51) Classification internationale des brevets :
C12P 1/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/002939

(22) Date de dépôt international :
25 novembre 2005 (25.11.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0452774 26 novembre 2004 (26.11.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : UNI-
VERSITE DE CERGY-PONTOISE [FR/FR]; 33, boule-
vard du Port, F-95011 Cergy-Pontoise Cedex (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : LAR-
RETA-GARDE, Véronique [FR/FR]; 31 bis, rue de la
Madeleine, F-95290 L'Isle Adam (FR). GIRAUDIER,
Sébastien [FR/FR]; 1, Touleuses Brunes, F-95800 Cergy
(FR).

(74) Mandataire : BREESE DERAMBURE MAJEROW-
ICZ; 38, avenue de l'Opéra, F-75002 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: BIOMATERIAL WHICH CAN SUCCESSIVELY CARRY OUT A SOLUTION/GEL TRANSITION THEN A
GEL/SOLUTION TRANSITION

(54) Titre : BIOMATERIAU CAPABLE D'EFFECTUER SUCCESSIVEMENT UNE TRANSITION SOLUTION/GEL PUIS
UNE TRANSITION GEL/SOLUTION

(57) Abstract: The invention relates to a biomaterial which can successively carry out a solution/gel transition then a gel/solution
transition with given kinetics, said biomaterial comprising at least one monomer which may form polymers, at least one enzyme
which may decompose said polymers and, optionally, an enzyme which may form covalent bonds between said monomers. The
invention further relates to a method for production of said biomaterial.

(57) Abrégé : L'invention concerne un biomatériau capable d'effectuer successivement une transition solution/gel, puis gel/solution
selon une cinétique déterminée, lequel biomatériau comprend au moins un monomère capable de former des polymères, au moins
une enzyme capable dégrader lesdits polymères et, optionnellement une enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre
lesdits monomères. L'invention concerne également un procédé pour obtenir un tel biomatériau.

WO 2006/056700 A2

BIOMATÉRIAU CAPABLE D'EFFECTUER SUCCESSIVEMENT UNE TRANSITION
SOLUTION/GEL PUIS UNE TRANSITION GEL/SOLUTION

La présente invention concerne, pour le domaine de la
5 gélification, un biomatériau capable d'effectuer
successivement une transition contrôlée solution/gel puis
gel/solution et un procédé de préparation d'un tel
biomatériau.

Les gels sont utilisés du fait de leurs propriétés
10 particulières dans de nombreux domaines, notamment
alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique. Un gel est composé
d'au moins deux composants dont l'un, très fortement
majoritaire, correspond au solvant liquide et l'autre est un
composant que l'on peut qualifier de solide dispersé au sein
15 du solvant. À partir d'une solution ou d'une dispersion à
l'état liquide, la formation du gel est le résultat d'une
agrégation partielle des particules solides. On appelle cette
transformation la transition solution/gel.

Il est bien connu de l'art antérieur des compositions
20 pour obtenir des gels « physiques ». Un gel physique
correspond à un assemblage macromoléculaire constitué par des
monomères liés entre eux par des liaisons de faible énergie
(Van der Waals, liaisons hydrogènes, polaires, etc.). La
stabilité de cet assemblage est associée à une certaine plage
25 de conditions physico-chimiques (pH, concentration en
monomères, température, qualité du solvant, force ionique,
etc.). En dehors de cette plage, le gel redevient solution.
La transition solution/gel est donc réversible pour les gels
physiques. Ainsi, la charpente des gels physiques est très
30 sensible à l'environnement physico-chimique et un très faible
changement de qualité de solvant peut détruire complètement
l'édifice et induire ainsi une transition gel-solution. A
l'inverse, l'association polymérique conduisant au gel peut
se faire par un faible changement de qualité de solvant.

35 On connaît également dans l'art antérieur des gels
qualifiés de « chimique ». Un gel chimique correspond

également à un assemblage macromoléculaire, pour autant les monomères y sont associés par des liaisons de forte énergie (covalentes). La stabilité de cet assemblage est donc très grande. Pour autant, si ces gels chimiques présentent une
5 stabilité améliorée, le seul moyen d'effectuer une transition gel/solution consiste à détruire les liaisons covalentes du polymère. C'est pourquoi, la transition gel/solution de ce type de polymère est dite irréversible.

Une famille de gels chimiques correspond aux gels
10 catalysés enzymatiquement. Ce mode de gélification est surtout observé dans les grands processus biologiques. La coagulation sanguine, la cicatrisation, la formation de peau, l'assemblage des matrices extracellulaires sont des processus biologiques où le passage des protéines solubles à l'état de
15 gel est indispensable et ont en commun une famille d'enzymes : Les transglutaminases (Tgases), lesquelles sont indispensables aux processus de gélification. Cette famille de protéines est ubiquitaire et on la retrouve aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Il existe ainsi
20 8 Tgases différentes chez l'homme. Ces enzymes ont la propriété d'incorporer des groupes amines sur des chaînes latérales glutaminyl des protéines. Cette activité permet de lier les protéines de manière covalente. Les Tgases catalysent ainsi la polymérisation des protéines responsables
25 de la formation des réseaux gélifiés biologiques. Les Tgases permettent d'obtenir des gels à partir de nombreuses protéines dans l'industrie alimentaire, et notamment pour la fabrication du surimi ou le durcissement de nombreux dérivés carnés (Jambon, nourriture reconstituée, etc.). On peut
30 citer, à titre d'exemples de protéines polymérisables, la gélatine, la fibrine, la gliadine, la myosine, la globuline (7S et 11S), l'actine, la myoglobine, les protéines du petit lait, notamment les caséines et la lactaglobuline, les protéines du soja, du blé et notamment la gluténine, du jaune
35 et du blanc d'œuf, et notamment l'ovalbumine.

Un des gels protéiques les plus utilisés est le gel de gélatine. La gélatine est obtenue à partir du collagène qui est une protéine de structure ubiquitaire. Le collagène peut se trouver à l'état soluble sous forme de monomères ou de trimères associés en triples hélices. Ces triples hélices peuvent s'associer en fibrilles qui peuvent s'associer en fibres. La triple hélice de collagène est instable à la température du corps. La gélatine est obtenue par dénaturation du collagène. Les tissus contenant du collagène subissent ainsi un traitement acide ou alcalin, qui aboutit à la dénaturation de la triple hélice du collagène. La possibilité de faire des fibres est alors totalement perdue. Un traitement acide aboutit à la formation de gélatine de type A et un traitement alcalin à une gélatine de type B. La solution de gélatine est donc composée de chaînes isolées de collagène (monomères de collagènes). Les utilisations de la gélatine étant multiples, il est parfois nécessaire de créer des gels de gélatine dans des conditions où les gels physiques n'existent pas (hautes températures, pH extrême ou force ionique particulière). Pour former le réseau nécessaire au gel, les chaînes de gélatine sont alors pontées par des liens covalents et, notamment, par l'action des Tgases. Les gels ainsi obtenus sont des gels chimiques.

Aujourd'hui de nombreux domaines nécessitent l'utilisation de gels chimiques du fait de leur stabilité améliorée. Toutefois, leur « irréversibilité » limite leurs utilisations potentielles dans les domaines cosmétiques, alimentaires ou encore pharmaceutiques. Une plus grande maîtrise des propriétés mécaniques des différents gels chimiques constitue donc un enjeu essentiel pour étendre leur potentialité.

L'analyse du vivant a révélé l'existence de systèmes extrêmement dynamiques. Dans les tissus vivants, les cellules sont en interaction avec une structure appelée la matrice extracellulaire (MEC) qui est riche en protéines. Cette structure est principalement localisée sous les cellules

épithéliales et autour des tissus conjonctifs. Les cellules peuvent synthétiser différents composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène qui intervient dans l'élasticité ou la fibronectine qui intervient dans les mécanismes de l'adhérence. Parallèlement, la cellule produit également des protéases qui interviennent dans la dégradation de la matrice extracellulaire. La cellule intervient donc simultanément dans la construction et la dégradation de la matrice extracellulaire. La structure de la matrice extracellulaire n'est donc pas une structure irréversible et statique mais correspond à un équilibre dynamique résultant de la balance entre les activités de construction et de dégradation des protéines synthétisées par la cellule.

De la même manière, les caillots formés en réponse au mécanisme de coagulation constituent également des systèmes dynamiques. Ainsi, par la synthèse d'une cascade de facteurs enzymatiques, on assiste à la formation d'un caillot insoluble qui naît de la formation d'un réseau de protéines solubles. Ce caillot sera ensuite éliminé au cours de la réaction de cicatrisation.

Dans ces équilibres dynamiques, les réseaux de protéines s'associent pour devenir insolubles et former des gels, ce qui peut être assimilé à des transitions solution/gel. Dans le même temps, les réseaux protéiques sont également détruits par l'action de protéases, ce type de transition pouvant cette fois être assimilé à des transitions gel/solution. On assiste ainsi parfois à des transitions successives comme dans la coagulation où le caillot est formé en premier lieu, puis dégradé pour laisser place à d'autres réactions selon des mécanismes mal compris.

La transition solution/gel dans ces processus biologiques est le plus souvent associée à la famille des transglutaminases décrite précédemment. La transition opposée, à savoir gel/solution est de son côté associée à l'activité antagoniste d'enzymes de type protéolytique.

Une des familles les plus étudiées est celle des métalloprotéinases de la matrice (MMP). Elles forment une famille d'endopeptidases dépendantes du zinc qui dégradent la plupart des protéines de la matrice extracellulaire. Il existe toutefois un grand nombre de familles de protéases différentes. On peut citer, à titre d'exemple de familles de protéases, les sérines protéases, telles que la trypsine, la matriptase, les Cystéines et Aspartate protéases, telles que les cathepsines B et L et les cathepsines D et G, et la famille ADAM.

Un grand nombre des enzymes orchestrant ce type de réaction, comme les transglutaminases ou encore les métalloprotéases sont caractérisées par les biochimistes et les enzymologistes. La description de ces enzymes, et notamment des différentes constantes qui leur sont associées, est ainsi bien maîtrisée. Pour autant leur comportement, s'il est connu en solution et de façon isolée, ne l'est pas dans des milieux de type gel et en présence d'une activité antagoniste.

Le travail de modélisation des inventeurs et d'autres équipes a permis de mieux comprendre les paramètres intervenant dans cet équilibre dynamique existant *in vivo*. Les derniers travaux de modélisation et d'expérimentation réalisés par les inventeurs leur ont permis de développer un nouveau modèle de cet équilibre dynamique qui intègre avec plus de justesse les paramètres impliqués dans celui-ci.

De façon surprenante, les modélisations effectuées par les inventeurs ont mis en évidence qu'il était possible d'obtenir « *in vitro* » de tels équilibres dynamiques. Les inventeurs ont ainsi pu obtenir des gels protéiques qui sont capables d'effectuer successivement une transition solution/gel puis gel/solution dans des conditions déterminées, et notamment selon une cinétique déterminée.

En conséquence, un premier objet de l'invention porte sur un biomatériau qui comprend au moins un monomère capable

de former des polymères, de préférence par des liaisons de faible énergie, ou un mélange desdits monomères et de leurs polymères, et un premier type d'enzyme capable de dégrader lesdits polymères, le dit biomatériau se présentant soit sous la forme d'un gel, soit sous la forme d'une solution, et étant susceptible d'effectuer successivement une première transition solution/gel puis, sous l'action du premier type d'enzyme, une seconde transition gel/solution.

Un tel biomatériau permet ainsi de développer des produits présentant des propriétés jusqu'alors inconnues dans les domaines cosmétiques, alimentaires ou pharmaceutiques.

Dans le domaine cosmétique, le biomatériau selon l'invention peut ainsi permettre de réaliser de nouveaux cosmétiques, tels que des masques de beauté pouvant adopter la texture d'un gel durant le temps d'application nécessaire avant de repasser à l'état de solution pour permettre une élimination simplifiée et agréable pour l'utilisateur.

Dans le domaine agroalimentaire, le biomatériau selon l'invention peut ainsi permettre de réaliser de nouveaux produits aux textures inconnues, tels que des biscuits ou des friandises fourrés, dont la garniture peut prendre la forme d'un gel durant l'enrobage avant de repasser à l'état de solution plus ou moins visqueuse une fois l'enrobage terminé.

Dans le domaine pharmaceutique ou cosmétique, le biomatériau selon l'invention peut également permettre d'obtenir des gels, emprisonnant un principe actif, capables de relarguer ledit principe actif en repassant à l'état de solution avec une cinétique déterminée. L'utilisation d'enzymes capables de dégrader les protéines (i) polymérisées dans des conditions de température, de pH, de concentrations ioniques spécifiques (calcium, magnésium, ou autre) ou en présence de cofacteurs déterminés peut permettre d'adapter ce relargage à un environnement donné (intestin, estomac, etc.).

En conséquence, l'invention concerne également des compositions cosmétiques, pharmaceutiques ou alimentaires. Ces compositions peuvent en outre contenir d'autres agents, tels que des agents actifs pour les compositions cosmétiques ou pharmacologiques, ou des agents de formulation pour les compositions alimentaires.

Avantageusement, le monomère compris dans le biomatériau est une protéine ou un saccharide, lequel est d'origine naturelle ou synthétique.

10 Le premier type d'enzyme est présent dans le biomatériau sous une forme non-inactivée. Le premier type d'enzyme capable de dégrader les polymères peut être soit sous une forme active dans le biomatériau, soit sous une forme activable dans des conditions spécifiques, tel qu'un pH
15 donné, en présence d'une espèce ionique ou d'un cofacteur spécifique, de façon à obtenir la transition gel/solution dans des conditions spécifiques, telles que dans un organe particulier (estomac, intestin, cavité buccale, etc.) ou dans un environnement particulier.

20 Selon un premier mode de réalisation particulier du biomatériau de l'invention, le biomatériau comprend en outre un solvant approprié pour permettre la polymérisation du monomère et la dégradation du polymère formé par le premier type d'enzyme. De préférence, le solvant utilisé est un
25 solvant aqueux, tel que de l'eau ou des solutions tampons au pH souhaité (tampon phosphate ou tris).

Selon un second mode de réalisation particulier du biomatériau de l'invention, ledit biomatériau sous forme de gel a été lyophilisé selon des techniques connues de l'homme
30 du métier. Le biomatériau ne comprend alors pas de solvant. La deuxième transition gel/solution s'effectue alors seulement après que ledit biomatériau ait été mis en contact avec un solvant approprié. Ce mode de réalisation permet ainsi d'associer la durée de vie du gel, après sa
35 fabrication, à sa présence dans un environnement particulier

ou dans un organe spécifique (estomac, intestin, cavité buccale, etc.).

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le biomatériau comprend en outre au moins un second type
5 d'enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre lesdits monomères, le dit biomatériau est alors susceptible d'effectuer successivement une première transition solution/gel sous l'action du second type d'enzyme puis une
10 seconde transition gel/solution sous l'action du premier type d'enzyme.

Avantageusement, les deux types d'enzymes sont présents simultanément dans le biomatériau sous une forme non-inactivée.

Avantageusement encore, les enzymes sont réparties de
15 façon homogène dans le biomatériau.

Selon un troisième mode de réalisation particulier du biomatériau de l'invention, le biomatériau comprend un monomère de nature protéique. La quasi-totalité des protéines sont capables de former des gels physiques du fait de leurs
20 propriétés de polyélectrolytes. À titre d'exemple de protéines susceptibles de polymériser pour former des gels physiques et utilisables dans le procédé selon l'invention, on peut citer le collagène et ses dérivés, telle que la gélatine, la fibrine, la gliadine, la myosine, la globuline
25 (7S et 11S), l'actine, la myoglobine, les protéines du petit lait, notamment les caséines et la lactoglobuline, les protéines du soja, du blé et notamment la gluténine, du jaune et du blanc d'œuf, et notamment l'ovalbumine. De préférence,
30 les protéines polymérisables utilisées sont choisies parmi la fibrine et le collagène et ses dérivés, telles que les gélatine de type A et B. En présence d'enzyme capables d'effectuer des liaisons covalentes entre les monomères protéiques, il est possible d'utiliser des protéines ne polymérisant pas naturellement.

La concentration de protéines polymérisables, sous la forme de monomères ou d'un mélange desdits monomères et de leurs polymères, dans le biomatériau est fonction de la nature de la protéine utilisée. De préférence, la concentration en protéine polymérisable est comprise entre 0,1 et 30% en poids par rapport au poids total du biomatériau, de préférence entre 0,2 et 20%, préférentiellement encore entre 0,5 et 15%, et de manière particulièrement préférée entre 1 et 10%.

De nombreuses enzymes capables de dégrader des polymères protéiques (protéases) sont connues de l'homme du métier. A titre d'exemple de telles enzymes, on peut citer les métalloprotéinase, telle que les métalloprotéinases de la famille de type MMP ou des métalloprotéinases apparentées, telle que la thermolysine, les sérines protéases, telles que la trypsine et la matriptase, les Cystéines et Aspartate protéases, telles que les cathepsines B et L et les cathepsines D et G, et la famille ADAM. De préférence, l'enzyme capable de dégrader des polymères de protéines est une métalloprotéinase, préférentiellement une thermolysine, notamment bactérienne, et de manière particulièrement préférée une thermolysine isolée à partir de *Bacillus thermoproteolyticus rokko*.

La concentration en enzyme capable de dégrader des polymères protéiques dépend du monomère de protéine utilisée et de la concentration de celui-ci. Cette concentration d'enzyme peut être calculée simplement pour un type de monomère protéique donné et à une concentration donnée, selon le protocole décrit dans les exemples qui suivent. Ainsi, dans le cas de la thermolysine de *Bacillus thermoproteolyticus rokko* et pour un gel de gélatine de type A à 5%, la concentration en thermolysine est supérieure ou égale à 10^{-4} U/ml, de préférence supérieure ou égale à 10^{-3} U/ml.

De nombreuses protéines sont également capables d'effectuer des liaisons covalentes entre des protéines sont

connues de l'homme du métier. À titre d'exemple de telles protéines, on peut citer la famille des lysyl oxydases et la famille des transglutaminases telles que la sous-unité A du facteur XIII, les Tgases 1 à 7 de mammifères ou encore les
5 tgases bactériennes. De préférence, l'enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre des protéines est une transglutaminase, préférentiellement une transglutaminase bactérienne, et de manière particulièrement préférée une transglutaminase isolée à partir de *Streptoverticillium sp.*

10 Les concentrations en enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre des protéines et en enzyme capable de dégrader des polymères protéiques dépendent d'une part du rapport de la concentration d'enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre des protéines sur la concentration
15 en enzyme capable de dégrader des polymères protéiques, et d'autre part de la protéine polymérisable utilisée et de la concentration de celle-ci. Ces concentrations d'enzymes peuvent être calculées simplement selon le protocole décrit dans les exemples.

20 Le rapport des concentrations enzymatiques et les concentrations enzymatiques utilisées dépendront également du temps de gel (transition solution/gel) et de la durée de vie du gel souhaités.

Avantageusement, le rapport de la concentration d'enzyme
25 capable d'effectuer des liaisons covalentes entre des protéines sur la concentration en enzyme capable de dégrader des polymères protéiques est supérieur ou égal à 1, de préférence supérieur ou égal à 10, et de manière particulièrement préférée supérieur ou égal à 20.

30 Avantageusement encore, la concentration en enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre les protéines est supérieure à 0,001 U/ml, de préférence supérieure à 0,01 U/ml et de manière particulièrement préférée supérieure à 0,1 U/ml.

Avantageusement encore, et dans le cas d'une solution de gélatine de type A à 5% en présence de la transglutaminase de *Streptovorticillium sp* et de la thermolysine de *Bacillus thermoproteolyticus rokko*, le rapport de la concentration de transglutaminase en U/ml sur la concentration en thermolysine en U/ml est supérieure à 75, de préférence supérieure ou égale à 80. En outre, la concentration en transglutaminase est supérieure ou égale à 0,01 U/ml, de préférence supérieure ou égale à 0,1 U/ml et de manière particulièrement préférée supérieure ou égale à 0,4 U/ml.

Selon un quatrième mode de réalisation particulier de la présente invention, le biomatériau selon l'invention comprend un monomère de nature saccharidique. A titre d'exemple de saccharides utilisables pour le biomatériau selon l'invention, on peut citer les carraghénanes, les alginates, les pectines, le chitosan, la cellulose, la chitine, le glycogène ou encore l'amidon.

La concentration en saccharides polymérisables, sous forme de monomères ou d'un mélange desdits monomères et de leurs polymères, dans le biomatériau est fonction de la nature du saccharide utilisé. De préférence, la concentration en saccharide polymérisable est comprise entre 0,1 et 30% en poids par rapport au poids total du biomatériau, de préférence entre 0,2 et 20%, préférentiellement encore entre 0,5 et 15%, et de manière particulièrement préférée entre 1 et 10%.

De nombreuses enzymes capables de dégrader des polysaccharides sont connues de l'homme du métier. A titre d'exemple de telles enzymes, on peut citer les carraghénases pour les carraghénanes, les pectines lyases, les polygalacturonases et les pectines estérases pour les pectines, les alginates lyases pour les alginates, les cellulases pour la cellulose ou encore la phosphorylase pour le glycogène.

La concentration en enzyme capable de dégrader des polysaccharides dépend du monomère utilisé et de la concentration de celui-ci. Cette concentration d'enzyme peut être calculée simplement pour un type de monomère donné et à
5 une concentration donnée, selon le protocole décrit dans les exemples.

De nombreuses enzymes sont également capables d'effectuer des liaisons covalentes entre des saccharides sont connues de l'homme du métier. À titre d'exemple de
10 telles enzymes, on peut citer la famille des alginates épimérasés pour les alginates, des synthases pour la cellulose, ou encore la glycogène synthase pour le glycogène.

Les concentrations en enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre des saccharides et en enzyme
15 capable de dégrader des polysaccharides dépend d'une part du rapport de la concentration d'enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre des saccharides sur la concentration en enzyme capable de dégrader des polysaccharides et d'autre part du saccharide polymérisable
20 utilisé et de la concentration de celui-ci. Ces concentrations d'enzymes peuvent être calculées simplement selon le protocole décrit dans les exemples.

Comme précédemment, le rapport des concentrations enzymatiques et les concentrations enzymatiques utilisées
25 dépendront également du temps de gel (transition solution/gel) et de la durée de vie du gel souhaités.

Avantageusement, le rapport (concentration d'enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre des saccharides)/(concentration en enzyme capable de dégrader des polysaccharides) est supérieur ou égal à 1, de préférence supérieur ou égal à 10, et de manière particulièrement
30 préféré supérieur ou égal à 20.

Avantageusement encore, la concentration en enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre des

saccharides est supérieure à 0,001 U/ml, de préférence supérieure à 0,01 U/ml et de manière particulièrement préférée supérieure à 0,1 U/ml.

5 Selon un cinquième mode de réalisation particulier de l'invention, le biomatériau selon l'invention comprend un monomère de nature saccharidique et un monomère de nature protéique. Un tel composé permet d'obtenir un gel présentant des propriétés rhéologiques spécifiques et, potentiellement, un gel présentant une texture recherchée.

10 Le biomatériau peut également comprendre un ou plusieurs composants additionnels couramment utilisés dans les domaines cosmétiques, pharmaceutiques ou alimentaires.

15 Un deuxième objet de l'invention porte sur un procédé de préparation d'un biomatériau selon l'invention se présentant soit sous la forme d'un gel, soit sous la forme d'une solution, et étant susceptible d'effectuer successivement une transition solution/gel puis une seconde transition gel/solution, caractérisé en ce qu'il comprend le mélange dans un solvant approprié:

20 (i) d'au moins un monomère capable de former des polymères, de préférence par des liaisons de faible énergie;

(ii) d'un premier type d'enzyme capable de dégrader lesdits polymères.

25 La concentration en monomères capables de former des polymères, de préférence par des liaisons de faible énergie, et la concentration en enzyme capable de dégrader lesdits polymères pour obtenir un biomatériau qui présente le temps de gel et la durée de vie de gel souhaités sont déterminées
30 selon le protocole décrit dans les exemples.

À titre d'exemple, un biomatériau comprenant 5% de gélatine de type A, à titre de monomère capable de former des polymères par des liaisons de faible énergie, et de la

thermolysine isolée à partir de *Bacillus thermoproteolyticus rokko* et présentant un temps de gel de 68 minutes et une durée de vie du gel de 254 minutes peut être obtenu à 27°C en utilisant 0,0085 U/ml de thermolysine.

5 Selon un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention comprend en outre le mélange :

(iii) d'un second type d'enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre les monomères.

10 La concentration en monomères capables de former des polymères, optionnellement par des liaisons de faible énergie, la concentration en enzyme capable de dégrader lesdits polymères et la concentration en enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre lesdits monomères, pour obtenir un biomatériau qui présente le temps de gel et
15 la durée de vie de gel souhaités, sont déterminées selon le protocole décrit dans les exemples.

Le procédé est réalisé à une température à laquelle les deux types d'enzymes sont actives. Avantageusement, le procédé est réalisé à une température comprise entre 0 et
20 100°C, de préférence entre 5 et 75°C, par exemple entre 10 et 50°C ou entre 15 et 45°C, et de manière particulièrement préférée entre 20 et 40°C.

Avantageusement, la quantité de monomères capables de former des polymères est comprise entre 0,1 et 30% en poids
25 par rapport au poids total du biomatériau, de préférence entre 0,2 et 20%, préférentiellement encore entre 0,5 et 15%, et de manière particulièrement préférée entre 1 et 10%.

Avantageusement encore, le rapport de la concentration en enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre
30 les monomères sur la concentration d'enzymes capables de dégrader les polymères est supérieur ou égal à 1, de préférence supérieur ou égal à 10, et de manière particulièrement préférée supérieur ou égal à 20.

De préférence, la concentration en enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre les monomères est supérieure à 0,001 U/ml, de préférence supérieure à 0,01 U/ml et de manière particulièrement préférée supérieure à 0,1 U/ml.

Avantageusement, la concentration en monomères capables de former des polymères, la concentration en enzyme capable de dégrader lesdits polymères et, éventuellement, la concentration en enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre lesdits monomères sont choisies de sorte que la résolution des équations (I), (II), (III) et (IV) suivantes :

$$\frac{dg}{dt} = - \frac{V_p}{K_p + g} \times g + \frac{V_T}{K_T + s} \times s + V_H \quad \text{(I)}$$

$$\frac{ds}{dt} = \frac{V_p}{K_p + g} \times g - \frac{V_T}{K_T + s} \times s - \frac{V'_p}{K_p + s} \times s - V_H \quad \text{(II)}$$

$$\frac{df}{dt} = \frac{V'_p}{K_p + s} \times s \quad \text{(III)}$$

$$g_t + s_t + f_t = S_0 \quad \text{(IV)}$$

lesquelles équations décrivent respectivement l'évolution du nombre de monomères liés (dg) (I), l'évolution du nombre de monomères en solution (ds) (II) et l'évolution du nombre de monomères dégradés (df) en fonction du temps (dt) (III), et l'équation de conservation de masse (IV),

où :

- g correspond à la quantité de monomères sous forme liée,

- t correspond au temps,

5 - V_p correspond à la vitesse de l'enzyme capable de dégrader les polymères exprimée en quantité de monomères liés ramenés sous leur forme libre par ladite enzyme et par unité de temps,

- K_p représente la constante de Michaelis de l'enzyme capable de dégrader les polymères,

10 - s représente la quantité de monomères sous forme libre,

- V_T correspond à la vitesse de l'enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre les monomères exprimée en quantité de monomères sous forme libre liés par ladite enzyme et par unité de temps,

15 - K_T représente la constante de Michaelis de l'enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre les monomères,

20 - V_H représente la vitesse de liaison, par des liaisons de faible énergie et par unité de temps, de monomères sous forme libre, dans le cas de monomères capables de polymériser par de telles liaisons,

25 - V'_p correspond à la vitesse de l'enzyme capable de dégrader les monomères sous forme libre exprimée en quantité de monomères dégradés, lesquels ne peuvent plus polymériser, générés par ladite enzyme et par unité de temps,

- g_t correspond à la quantité de monomères sous forme liée au temps t ,

30 - s_t correspond à la quantité de monomères sous forme libre au temps t ,

- f_t correspond à la quantité de monomères dégradés qui ne sont plus capables de former des polymères au temps t ,

- S_0 correspond à la quantité initiale de monomères,

35 permet d'obtenir un temps de gel et la durée de gel souhaités.

Les inventeurs ont pu démontrer avec différents types d'enzymes, qu'il était possible d'obtenir des biomatériaux présentant une cinétique de transition solution/gel puis gel/solution déterminée.

5 Les constantes pour ces différentes enzymes sont bien connues de l'homme du métier. À titre d'exemple, on peut citer la base de données <http://www.brenda.uni-koeln.de/>. qui décrit de telles constantes enzymatiques. Dans tous les cas, l'homme du métier pourra déterminer simplement ces
10 différentes constantes pour des enzymes données selon des méthodes bien connues, telles que celles décrites dans <http://www.brenda.uni-koeln.de/> et dans PRICE and STEVEN, Fundamentals of Enzymology: The Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins, Oxford University Press.

15 Dans ces équations, V_P et V_T sont ainsi calculées selon les formules suivantes :

$V_P = k_{CAT-P} [P]$ et $V_T = k_{CAT-T} [T]$, où $[P]$ et $[T]$ représentent respectivement les concentrations en enzyme capable de dégrader les polymères et en enzyme capable d'effectuer des
20 liaisons covalentes entre les monomères, et k_{CAT-P} et k_{CAT-T} représentent les constantes catalytiques pour ces enzymes.

Dans tous les cas, l'homme du métier pourra déterminer simplement et sans expérimentation excessive en suivant les protocoles décrits dans les exemples les différentes
25 concentrations de monomères et d'enzyme pour obtenir un biomatériau présentant les cinétiques de transition successives solution/gel et gel/solution recherchées.

À titre d'exemple, un biomatériau comprenant 5% de gélatine de type A, à titre de monomère capable de former des
30 polymères par des liaisons de faible énergie, de la thermolysine isolée à partir de *Bacillus thermoproteolyticus rokko*, de la transglutaminase isolée à partir de *Streptovercillium sp* et présentant un temps de gel de 19 minutes et une durée de vie du gel de 743 minutes peut être

obtenu à 40°C en utilisant 1 U/ml de transglutaminase et 0,0125 U/ml de thermolysine.

À titre d'exemple encore, un biomatériau comprenant 5% de gélatine de type A, à titre de monomère capables de former des polymères par des liaisons de faible énergie, de la thermolysine isolée à partir de *Bacillus thermoproteolyticus rokko*, de la transglutaminase isolée à partir de *Streptovorticillium sp* et présentant un temps de gel de 2 minutes et une durée de vie du gel supérieure à 5000 minutes peut être obtenu à 27°C en utilisant 1 U/ml de transglutaminase et 0,0125 U/ml de thermolysine.

Avantageusement, le procédé selon l'invention comprend en outre une étape de lyophilisation du biomatériau sous forme de gel.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent, sans pour autant que ceux-ci ne constituent une quelconque limitation de l'invention.

Exemple 1 : Gel chimique :

1-1 : développement d'un modèle théorique :

Une étude de l'équilibre dynamique correspondant à la matrice extracellulaire a permis d'établir un modèle mathématique simplifié d'un tel système dynamique dans lequel on met en œuvre deux réactions enzymatiques antagonistes. L'une est catalysée par une enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre les monomères solubles (s) pour obtenir un réseau de monomères liés (g). L'autre est catalysé par une enzyme (P) qui hydrolyse le réseau de monomères liés (g) en monomères solubles (s). Enfin, et dans certains cas, une troisième réaction aussi catalysée par l'enzyme (P) consiste en l'hydrolyse des monomères solubles en monomères dégradés (f) de taille trop faible pour participer au réseau ou qui ne peuvent plus servir de substrat à l'enzyme liant les monomères solubles (s) par des liaisons covalentes (T). Cette dernière réaction qui se traduit par une fuite de

monomères du cycle est également ajoutée au modèle. Le modèle peut être simplement représenté selon le schéma réactionnel suivant :

Schéma I :

5

Enzyme dégradant les chaînes de monomères liés (P)

Enzyme dégradant les chaînes de monomères liés (P)

10

Chaînes de monomères liés (g)

monomères en solution (s)

monomères dégradés (f)



15

Enzyme liant les monomères par des liaisons covalentes (T)

20 Ce mécanisme réactionnel peut être simplement décrit par les trois équations différentielles qui suivent, où les réactions enzymatiques sont assimilées à des réactions michaéliennes simples et par une quatrième équation de conservation de la masse.

25 L'équation différentielle permettant de décrire l'évolution du nombre de chaînes de monomères liés (g) en fonction du temps est la suivante:

$$\frac{dg}{dt} = - \frac{V_p}{K_p + g} \times g + \frac{V_T}{K_T + s} \times s$$

30

L'équation différentielle permettant de décrire l'évolution du nombre de monomères en solution (s) en fonction du temps est la suivante:

$$\frac{ds}{dt} = \frac{V_p}{K_p + g} \times g - \frac{V_T}{K_T + s} \times s - \frac{V'_p}{K_p + s} \times s$$

35

L'équation différentielle permettant de décrire l'évolution du nombre de monomères dégradés (f) en fonction du temps est la suivante:

5

$$\frac{df}{dt} = \frac{V'_P}{K_P + s} \times s$$

Enfin, l'équation de conservation de masse est la suivante:

10

$$g_t + s_t + f_t = S_0$$

Dans ces équations différentielles, V_P et V_T représentent les vitesses maximales pour les enzymes P et T respectivement, K_P et K_T représentent les constantes de Michaelis pour les enzymes P et T respectivement.

15

Dans ces équations, V_P et V_T sont calculées selon les équations suivantes :

20

$$V_P = k_{CAT-P} [P] \text{ et } V_T = k_{CAT-T} [T]$$

Dans la transposition de cette équation à un système *in vitro*, les différentes valeurs de $[P]$, $[T]$, V_P , V_T , K_P et K_T correspondent à des constantes.

25

Les concentrations en substrats sont calculées pour chaque enzyme à l'origine, elles sont ensuite déterminées au cours de la réaction à l'aide des différentes équations différentielles.

30

1-2 : modélisation de la formation d'un gel de gélatine en présence d'une transglutaminase et de thermolysine :

Ce modèle théorique a été appliqué à la formation d'un gel physique de protéine, et plus précisément de gélatine à 40°C en présence d'une transglutaminase bactérienne, qui lie

les monomères de gélatine par des liaisons covalentes, et d'une protéase : la thermolysine.

La concentration de gélatine utilisée est de 5%, soit 50 g.l⁻¹. A partir de la séquence peptidique de la gélatine, il est possible de déterminer simplement la concentration en chaînes latérales, à savoir 0,45 mol.l⁻¹.

Enzymes utilisées :

Les différentes constantes pour la protéase et la transglutaminase sont connues dans la littérature ou peuvent être déterminées simplement selon des techniques bien connues de l'homme du métier (SEGEL, Wiley Classics Library, Enzyme Kinetics, 1993).

1-Protéase :

1.1- Source : La protéase utilisée est une métalloprotéase bactérienne, la thermolysine, commercialisée par SIGMA (REF : P-1512). Cette enzyme est une protéase de type X issue de *Bacillus thermoproteolyticus rokko* qui est une souche bactérienne thermophile. Cette enzyme reconnaît spécifiquement les résidus Ile, Leu, Val, Phe, Met et Ala. Très stable à température ambiante, cette enzyme présente une masse molaire de 34 kDa pour 316 acides aminés.

2.2- Activité : Pour la thermolysine, sa constante de Michaelis (de dissociation) est connue pour différents substrats protéiques et peptidiques dans la littérature (MATSUBARA *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol.21, p :242-247, 1965). A partir de ces données, il est possible de déduire une valeur moyenne de K_p égale à 1 mM. La littérature décrit également les valeurs de k_{cat} de la thermolysine pour différents substrats (LIGNE *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, vol.1337, p :143-148, 1997). A partir de ces données, il est également possible de déterminer une valeur moyenne de k_{cat} égale à 1000 min⁻¹. La spécificité de la thermolysine étant connue, l'analyse de la séquence de la gélatine permet de déterminer que, dans le

5 système étudié, la concentration initiale en substrat pour la thermolysine est donc de $0,15 \times 0,45 = 0,68 \text{ mol.l}^{-1} = 68 \text{ mM}$ soit $68 K_p$. Cette concentration est proche d'une concentration saturante en substrat, le substrat n'est donc pas limitant dans la réaction de la thermolysine.

Les différentes constantes enzymatiques de cette enzyme ont également pu être mesurées en utilisant le N-(3-[2-furyl] acryloyl)-Glycine-Leucineamide (SIGMA) comme substrat, pour la formation de Furyl-acroyl-glycine et de Leucine-amide. La
10 disparition du substrat au cours de l'hydrolyse se traduit par une diminution de la densité optique mesurée à 345 nm.

2-Transglutaminase :

2.1- Source : La transglutaminase utilisée est produite par la société AJINOMOTO sous la dénomination ACTIVA WM®.
15 Cette enzyme bactérienne est produite dans le milieu de culture de *Streptoverticilium sp.* Cette enzyme correspond à une chaîne polypeptidique de 331 acides aminés pour un PM de 38,000 Da. Le résidu cystéine en position 64 correspond au site actif.

2.2- Activité : Cette enzyme reconnaît les résidus lysine et catalyse la formation de liaisons covalentes entre les chaînes latérales des résidus lysines et les chaînes latérales d'autres résidus. L'activité de cette enzyme est optimale à une température de 50-55°C (100 U.g⁻¹ à 40°C), et
20 dans une large gamme de pH (activité de 4,5 à 9 avec un optimum entre 6 et 7).

L'activité de cette enzyme est mesurée d'après la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser la formation d'une micromole d'acide hydroxyamique pendant une minute à
30 40°C, à partir du N α -CBZ-Gln-Gly (SIGMA) et de l'hydroxylamine. Le protocole permettant de déterminer l'activité de cette enzyme est le suivant :

μl d'enzyme dans du tampon acétate à pH 6	400 μl
--	-------------------

NH ₂ OH 2M	25 μ l
N α -CBZ 0,1M	75 μ l
10 min à 37°C	
TCA 10% FeCl ₃ 3%	500 μ l
Centrifugation 400g 15 min	
DO 525 nm (blanc avec solution sans enzyme)	

L'activité est ensuite calculée par l'équation suivante :

$$\text{Activité (U/mL/min)} = [100 \times (\text{DO } 525 / 238)] / \text{Vol enzyme (ml)}$$

Différentes réactions sur ce substrat ont permis de déterminer une constante de dissociation K_T de 8 mM et un k_{cat} de 100 min⁻¹ en utilisant la gélatine comme substrat. La gélatine contient seulement 4% de lysine, la concentration initiale en substrat pour la transglutaminase est donc de 17 mM.

Modélisation :

À partir des différentes valeurs déterminées précédemment, il est possible de suivre le comportement de la fraction liée en fonction du temps en appliquant la méthode d'Euler d'approximation des équations différentielles (BRONSON, Equations Différentielles, Mc Graw-Hill ed, 1994). Dans cette première modélisation, le rapport des activités entre la transglutaminase et la protéase est de 10 (avec une concentration en transglutaminase de 1 U/ml). On pose en outre $g_0=0$ et $s_0=68$ mM. Les données de la littérature montre qu'un gel de gélatine est obtenu par action de la transglutaminase lorsque 18% des liaisons théoriques sont effectivement réalisées (FUCHSBAUER et al., *Biomaterials*, vol.17, p :1481-1488, 1999).

Les différentes modélisations effectuées montrent que la variation de V'_p par rapport à V_p est de faible importance et que la cinétique d'apparition des protéines liées montre une forte augmentation initiale jusque des valeurs proches de 100%, puis une décroissance très lente qui dépend de la vitesse d'apparition des petits fragments. Un exemple de modélisation de l'évolution de la fraction liée en fonction du temps, avec un rapport V'_p / V_p de 0,1, est présenté dans la figure 1.

10 **1-3 : formation d'un gel de gélatine en présence d'une transglutaminase seule :**

Pour valider ce modèle théorique, les inventeurs ont d'abord effectué une première série d'expériences dans laquelle la formation d'un gel de gélatine a été suivie en présence de différentes quantités de transglutaminase uniquement.

Protéines polymérisables utilisées :

La gélatine de type A utilisée (G2500) est extraite à partir de peau de porc selon un protocole acide (SIGMA). Les concentrations de gélatine dans la solution sont exprimées en pourcentage (poids/volume). Ainsi, une solution de 1% de gélatine correspond à une solution de 1g de gélatine dans 100ml de solution. Les concentrations de gélatine utilisées ont varié dans les expériences entre 2 et 10% et la température de gélification était de 40°C.

La transglutaminase utilisée correspond à la transglutaminase décrite précédemment (voir 1-2). Les concentrations de transglutaminase utilisées dans ces expériences ont varié entre 0,1 U/ml et 1 U/mL.

30 **Suivi des transitions solution/gel et gel/solution :**

La formation d'un gel est suivie à l'aide d'un rhéomètre AR1000 (TA INSTRUMENT) ou RS 150 (THERMORHEO). Ces rhéomètres ont été montés avec des géométries de type cônes/plan de 60

mm et de 2° d'angle. Un cône en acier est utilisé sur l'AR1000 et un cône en titane est utilisé sur le RS150.

Ces rhéomètres permettent d'effectuer une analyse oscillatoire, ou analyse dynamique, qui consiste à imposer à l'échantillon un cisaillement oscillatoire de pulsation donnée ω . Au cours de ce mouvement, la contrainte et le gradient de cisaillement évoluent sinusoïdalement au cours du temps, avec la même pulsation, mais avec un certain déphasage de l'une par rapport à l'autre. Les rhéomètres permettent de mesurer de nombreux paramètres permettant de suivre la gélification. Le module de cisaillement ($G^*_{(\omega)}$) est un nombre complexe qui exprime la composante visqueuse et élastique de l'échantillon et répondant à la formule suivante :

$$G^*_{(\omega)} = G'_{(\omega)} + i G''_{(\omega)}$$

G'est appelé module de conservation (Storage Modulus) et G'' est appelé module de perte (Loss Modulus). Ces deux modules sont exprimés en Pascals (Pa). Dans un liquide newtonien, le module de conservation est nul, seul le module de perte existe, c'est pourquoi le module de perte est parfois également qualifié de module visqueux. En revanche, seul le module de conservation existe dans un solide élastique, c'est pourquoi il est parfois qualifié de module élastique. On peut relier le module de cisaillement avec les modules de perte et de conservation selon les formules suivantes :

$$G' = G^* \cos \delta \quad \text{et} \quad G'' = G^* \sin \delta$$

Dans lesquelles δ représente le déphasage entre la contrainte et la déformation de cisaillement. A partir de ces formules, on peut déduire la relation suivante :

$$\text{Tan } \delta = G'' / G'$$

Tan δ devient alors une valeur pertinente permettant de caractériser la gélification de l'échantillon. Lorsque l'échantillon est liquide $G'' > G'$ et Tan $\delta > 1$. A l'inverse,

l'échantillon est gélifié lorsque $G'' < G'$ et $\tan \delta < 1$. Le temps mis pour atteindre la valeur $\tan \delta = 1$ représente « le temps de gel ». Dans les différentes expériences qui suivent, le rapport des modules G'' / G' pour différentes solutions est exprimé en fonction du temps, avec la valeur de $G'' / G' = 1$ correspondant au « point de gel ».

Résultats :

L'évolution des propriétés viscoélastiques, suivies à l'aide d'un rhéomètre, d'une solution de gélatine à 5% à 40°C et en présence de différentes concentrations de transglutaminase (0,1, 0,15, 0,2, 0,5 et 1 U/ml) est présentée dans la figure 2. On observe que, dans toutes les conditions testées, l'échantillon est bien liquide au début de l'expérience ($G''/G' < 1$), puis qu'un gel se forme ($G''/G' > 1$) et évolue au cours du temps. Les expériences montrent en outre qu'après le point de gel et pour n'importe quelle concentration d'enzyme, le module G'' atteint un plateau autour de 1 Pa. Les valeurs du module G' sont donc dépendantes de la concentration en enzyme. Les variations du rapport G''/G' observées après le point de gel reflètent donc les variations de G' .

La figure 3 représente la vitesse de gélification (inverse du temps de gel) des solutions de gélatine à 5% à 40°C en fonction de la concentration en transglutaminase. Les résultats montrent que la courbe de gélification est conforme au modèle théorique, incluant uniquement l'étape avec la transglutaminase, et ceci jusqu'au point de gel où $G'' / G' = 1$.

La figure 4 représente la vitesse de réaction enzymatique en fonction de la concentration d'enzyme à 40°C, après le point de gel. Les résultats montrent qu'au-delà du point de gel la courbe de gélification n'est plus conforme au modèle théorique. On observe alors que les courbes ne sont plus extrapolables par régression linéaire, mais suivent un comportement en loi de puissance d'équation $y = 15x^{1,85}$ (courbe

en pointillés sur la figure) avec un R^2 de 0,98. Après le point de gel, la réaction enzymatique est dans un régime limité par la diffusion de l'enzyme dans le gel. L'impact de la diffusion se matérialise dans cette équation de vitesse par un coefficient de 1,85 qui affecte la concentration de transglutaminase.

La figure 5 montre l'évolution, en fonction du temps, de la quantité de transglutaminase active dans le gel en tenant compte de la diffusion pour 1 unité (■) et 0,4 unité (◆) d'enzyme en solution. Ces expériences ont donc permis de montrer qu'après la formation du gel, la valeur du coefficient de diffusion pour la transglutaminase évolue progressivement jusqu'à atteindre la valeur de 1,85. Cette évolution du coefficient de diffusion peut être déterminée simplement à partir de cette courbe et en fonction du temps.

Il semble donc que l'action enzymatique lors de la gélification suive deux régimes successifs. Le premier, de l'état liquide jusqu'aux alentours du point de gel, n'est pas limité par la diffusion et les règles d'enzymologie classique peuvent s'appliquer. La vitesse de réaction est alors une fonction linéaire de la concentration en enzyme. Le second, après le point de gel, est un milieu non conventionnel où la vitesse de diffusion de l'enzyme n'est plus négligeable et limite la vitesse de réaction apparente.

Des expériences effectuées sur des gels de gélatine de 2 et de 10% en présence de différentes concentrations de transglutaminase ont permis de confirmer un comportement similaire au cours de la gélification. Dans ces conditions, chaque type de gel bénéficie d'un coefficient de diffusion spécifique qui peut être déterminé simplement comme précédemment.

1-4 : nouvelle modélisation de la formation d'un gel de gélatine en présence d'une transglutaminase et de thermolysine:

Un gel de gélatine a été modélisé en utilisant les mêmes paramètres que ceux décrits précédemment (voir 1-2) et en utilisant rapport V_T/V_P de 10 et un rapport V'_P/V_P de 0,05. Toutefois, l'effet de contrainte diffusionnelle d'un gel de gélatine à 5% sur la vitesse de réaction de l'enzyme a été intégré dans les équations différentielles décrites précédemment (voir 1-2). Ainsi, la concentration en transglutaminase a été affectée d'un exposant de 1,85 dans les équations rendant compte de l'équilibre réactionnel dès lors que le point de gel est dépassé selon la formule suivante :

$$V_T = k_{\text{CAT-T}} [T_0]^{1,85}$$

Des études réalisées précédemment ont permis de montrer que la diffusion contrôlait l'hydrolyse des gels uniquement en présence de très faible concentration d'enzyme, à savoir inférieur à 1 nM (FADDA *et al.*, *Biophys. J.*, vol.85(5), p :2808-2817, 2003), mais pas à des concentrations plus importantes (BERRY *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, vol.1524, p :110-117, 2000 ; GIRAUDIER *et al.*, *Biomacromolecules*, vol.5(5), p :1662-1666, 2004). En conséquence, aucun coefficient n'a été appliqué à la concentration de thermolysine dans les équations.

La figure 6 représente le résultat d'une modélisation de l'évolution de la fraction liée en fonction du temps avec une limitation diffusionnelle et un rapport de V_T/V_P de 10 (concentration en transglutaminase de 1U/ml). On observe que, d'après cette modélisation, le milieu protéique effectue successivement une transition solution/gel, avec un premier passage du point de gel à 80 minutes, puis une transition gel/solution, avec un deuxième passage du point de gel à 330 minutes. Selon le modèle établi par les inventeurs, le milieu protéique susceptible d'être obtenu présente des propriétés nouvelles, avec une capacité à effectuer successivement une transition solution/gel puis gel/solution, avec un état de gel maintenu pendant une durée de 250 minutes.

Pour autant, l'effet diffusionnel a été considéré comme tout ou rien, à savoir sans limitation avant la transition de gélification et avec une limitation totale au delà de cette transition. Les expériences réalisées précédemment (voir 1-3) ont permis de montrer que les contraintes diffusionnelles augmentent au fur et à mesure que le réseau de lien covalent se développe dans le gel. Cet effet progressif a été pris en compte dans le modèle en utilisant la formule suivante :

$V_T = k_{CAT-T} [T_0]^\alpha$ où α varie en fonction du temps de façon hyperbolique de 1,1 à 1,85 (voir figure 5).

La figure 7 représente le résultat d'une modélisation de l'évolution de la fraction liée en fonction du temps avec une limitation diffusionnelle progressive et différents rapports V_T/V_P (concentration en transglutaminase de 1U/ml). Les résultats montrent là encore des transitions solution/gel, puis gel/solution pour les différents rapports V_T/V_P représentés. Pour le rapport V_T/V_P de 10, le milieu protéique atteint le point de gel en 15 minutes, le gel effectue ensuite une transition gel/solution après 165 minutes. Par rapport à la modélisation précédente, la prise en compte d'une limitation diffusionnelle progressive prédit l'obtention d'un gel pendant 150 minutes, au lieu de 250 minutes précédemment.

1-5 : formation d'un gel de gélatine en présence de transglutaminase et de thermolysine simultanément :

Pour valider le modèle théorique décrit précédemment (voir 1-4), différentes expériences ont été effectuées en utilisant de la gélatine et de la transglutaminase dans les mêmes conditions que celles utilisées précédemment (voir 1-3). En outre, une protéase, la thermolysine a également été associée à la solution de départ. La formation de gels a été suivie en fonction du temps et à 40°C en fonction des concentrations de transglutaminase et de thermolysine utilisées. Les résultats obtenus, en comparaison des

prédictions du modèle théorique, sont représentés dans le tableau I suivant :

Tableau I

Rapport Tgase / Thermo- -lysine	Tgase (en U/ml)	Thermolysine (en U/ml)	théorique			Expérimental		
			Formation d'un gel	Temps de gel (min)	Durée de vie du gel (min)	Formation d'un gel	Temps de gel (min)	Durée de vie du gel (min)
10	0,4	0,04	oui	35	270	non	-	-
10	1	0,1	oui	15	150	non	-	-
60	0,4	0,0067	oui	35	1600	non	-	-
60	1	0,0167	oui	15	875	non	-	-
75	0,4	0,0053	oui	35	2000	non	-	-
75	1	0,013	oui	15	1150	non	-	-
80	0,4	0,005	oui	40	3000	oui	56	> 4800
80	1	0,0125	oui	15	1200	oui	19	743

5 Les résultats montrent que, conformément au modèle théorique développé, il est possible d'obtenir expérimentalement à partir d'une solution de monomères polymérisables par des liaisons covalentes en présence de deux activités enzymatiques antagonistes (dans ce cas une solution de gélatine à 5% en présence de différentes concentrations de transglutaminase et de thermolysine) une transition solution/gel puis une transition gel/solution successivement.

15 Si un tel gel est obtenu dans toutes les simulations au bout d'un temps qui ne dépend que de l'activité Transglutaminase, les différentes expériences montrent qu'il existe un rapport V_T/V_P qui constitue une valeur seuil pour la première transition solution gel. Dans le cas d'une solution de gélatine à 5% en présence de transglutaminase et

de thermolysine, le rapport V_T/V_P critique pour obtenir cette première transition solution/gel est compris entre 75 et 80.

Les différentes expériences confirment en outre le temps de gel et la durée de vie du gel dépendent de la concentration en transglutaminase et en thermolysine respectivement.

La figure 7 montre l'évolution expérimentale des propriétés viscoélastiques de solutions de gélatine à 5% en présence de différentes concentrations de transglutaminase et de thermolysine à 40°C.

Au regard du modèle théorique développé, il est donc possible d'obtenir un biomatériau capable d'effectuer successivement une transition solution/gel puis gel/solution. Pour cela, il suffit de déterminer expérimentalement le rapport critique enzyme liant les monomères/ enzyme dégradant les monomères liés pour obtenir cette première transition solution/gel en fonction du monomère et des enzymes utilisés. Le modèle théorique permet ensuite d'adapter au moins les différentes concentrations enzymatiques de sorte d'obtenir un gel qui présente d'une part le temps de gel et d'autre part la durée de vie souhaités.

Des expériences complémentaires ont été réalisées, dans lesquelles la gélatine 5% est additionnée de 1% d'alginate ou d'oligoalginate. On obtient là encore une transition solution/gel puis gel/solution.

1-6 : formation d'un gel de gélatine en présence, simultanément, de transglutaminase et de différentes protéases :

Pour confirmer le modèle développé, différentes protéases ont été utilisées.

La trypsine, EC 3-4-21-4, est une sérine protéase qui hydrolyse les liaisons peptidiques en aval des lysines et arginines. La trypsine utilisée est d'origine pancréatique de

bovin et commercialisée par Sigma (T-1426). L'activité de cette enzyme est mesurée d'après la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser l'hydrolyse du p-Tosyl-Arginine-méthyl-Ester (Sigma T4626).

- 5 La collagénase (EC 3.4.24.3) hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques X-Gly des séquences Pro-X-Gly-Pro, que l'on retrouve notamment dans les chaînes α du collagène. La collagénase utilisée est obtenue à partir de *Clostridium histolyticum* Type IA et commercialisée par Sigma (C-9891).
- 10 L'activité de cette enzyme est mesurée d'après la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser l'hydrolyse du N-(3-[2-furyl]acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala ou FALGPA (Sigma F-5135).

15 Ces activités enzymatiques étant mesurées sur l'hydrolyse de peptides de synthèse portant un groupement chromophore, pour une meilleure comparaison, l'activité de la thermolysine a été mesurée sur l'hydrolyse de N-(3-[2-furyl]acryloyl)-Gly-Leu-amide (Sigma N-7383). C'est cette activité qui est reportée dans les tableaux avec plusieurs

20 protéases.

Pour les gels, la concentration de gélatine était de 7% et la température de gélification était de 40°C. La transglutaminase utilisée correspond à la transglutaminase décrite précédemment. Le suivi des gels avec le temps a été

25 effectué comme en 1-5. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau II suivant :

Tableau II

Rapport Tgase / Protéase	Tgase (en U/ml)	Protéase (en U/ml)	Expérimental		
			Formation d'un gel	Temps de gel (min)	Durée de vie du gel (min)
375	1,5	0,004 (16 nM)	oui	24	546

		thermolysine)			
48	1,5	0,031(31 nM trypsine)	oui	14	396
520	1,5	0,003(16 nM collagénase)	oui	8	492

Les résultats montrent donc que le modèle est généralisable à d'autres protéases.

Exemple 2 : Gel physique :

2-1 : développement d'un modèle théorique :

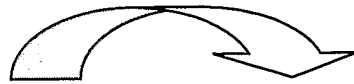
5 Ce modèle rend compte de l'équilibre dynamique observé dans le cas de la formation d'un gel physique uniquement et en présence d'une seule activité enzymatique. La gélification résulte alors uniquement de la formation de liaisons de faible énergie (Van der Waals, liaisons hydrogènes, hydrophobes, etc. ; H) entre des monomères en solution (s). Dans le cas de protéines par exemple, leurs propriétés de polyélectrolytes font qu'elles sont quasiment toutes capables de former des gels physiques. La dégradation des polymères correspondant aux chaînes de monomères liés (g) du gel est catalysée par une enzyme (P) qui les hydrolyse en monomères solubles (s). Enfin, il existe dans certains cas une troisième réaction aussi catalysée par l'enzyme (P) qui consiste en l'hydrolyse des monomères solubles en monomères dégradés (f) de taille trop faible pour participer au réseau ou ne pouvant plus former de liaisons avec d'autres monomères solubles. Cette dernière réaction qui se traduit par une fuite de monomères du cycle est également ajoutée au modèle. Le modèle peut être simplement représenté selon le schéma réactionnel suivant :

25

Schéma II :

Enzyme dégradant les chaînes de monomères liés (P)

5

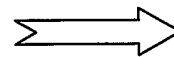


Enzyme dégradant les chaînes de monomères liés (P)

10

Chaînes de monomères liés (g)

monomères en solution (s)



Monomères dégradés (f)



Formation de liaisons non covalentes (ioniques, hydrophobes, etc.)(H)

15

Dans ce deuxième cas, le mécanisme réactionnel peut être simplement décrit par les trois équations différentielles qui suivent, où les réactions enzymatiques sont assimilées à des réactions michaéliennes simples et par une quatrième équation de conservation de la masse.

20

L'équation différentielle permettant de décrire l'évolution du nombre de chaînes de monomères liés (g) en fonction du temps est la suivante:

25

$$\frac{dg}{dt} = - \frac{V_p}{K_p + g} \times g + V_H$$

30

L'équation différentielle permettant de décrire l'évolution du nombre de monomères en solution (s) en fonction du temps est la suivante:

35

$$\frac{ds}{dt} = \frac{V_p}{K_p + g} \times g - \frac{V'_p}{K_p + s} \times s - V_H$$

L'équation différentielle permettant de décrire l'évolution du nombre de monomères dégradés (f) en fonction du temps est la suivante:

$$5 \quad \frac{df}{dt} = \frac{V'_p}{K_p + s} \times s$$

Enfin, l'équation de conservation de masse reste inchangée:

10

$$g_t + s_t + f_t = S_0$$

Dans ces équations différentielles, V_p représente la vitesse maximale pour l'enzyme dégradant les monomères et K_p représente la constante de Michaelis pour cette même enzyme.

15

Dans ces équations différentielles, V_p est calculée selon l'équation suivante :

$$V_p = k_{\text{cat-P}} [P_0]$$

20

En outre, V_H qui représente la vitesse de formation des liaisons de faible énergie, dépend du monomère utilisé.

Dans la transposition de cette équation à un système *in vitro*, les différentes valeurs de $[P]$, V_p , V_H et K_p correspondent à des constantes.

25

Les concentrations en substrats sont calculées à l'origine, elles sont ensuite déterminées au cours de la réaction à l'aide des différentes équations différentielles.

2-2 : modélisation de la formation d'un gel physique de gélatine à 27°C en présence de thermolysine :

30

Ce modèle théorique a été appliqué à la formation d'un gel physique de protéines, et plus précisément de gélatine à 27°C, et en présence de thermolysine. A cette température, la gélatine forme un gel par association partielle des monomères

en triples hélices. Ces triples hélices, stabilisées par des liaisons hydrogènes, apparaissent par abaissement de la température.

Gélatine :

5 1-Descriptif : La gélatine est obtenue à partir de collagène. Le collagène est synthétisé sous forme de précurseurs de grande taille : les chaînes α . La formation de procollagène s'accompagne d'un assemblage de trois chaînes α par des liaisons hydrogène et de
10 l'hydroxylation de certains résidus proline et lysine pour former de l'hydroxyproline et de l'hydroxylysine respectivement. Enfin, après sécrétion du procollagène dans le milieu extracellulaire, le procollagène est mûri par
15 clivage des propeptides pour former le collagène. Ce dernier est alors susceptible de s'associer avec d'autres molécules de collagène pour former des fibrilles de collagène, lesquelles s'aggrègent pour former des fibres de collagène. La stabilité de la triple hélice formée par l'association des trois chaînes α est fonction de l'organisme dont elle est
20 issue. La température de dénaturation (T_m) va ainsi de 41,5°C pour certains mammifères à 6°C pour certains poissons vivants dans les eaux de l'Arctique. La variation de T_m est corrélée au taux d'hydroxyproline dans la molécule (PERSIKOV *et al.*, *Biochemistry*, vol.39, p :14960-14967, 2000).

25 La gélatine est obtenue par un traitement acide ou alcalin des tissus contenant du collagène, ce qui aboutit à la dénaturation de la triple hélice du collagène (PEZRON, *Physical Networks.*, Londres Elsevier Applied Science, 1990). Dans cette étude, les gélatines utilisées correspondent à des
30 gélatines de type A obtenues par un traitement acide.

 Lorsque la solution de gélatine semi-diluée est refroidie en dessous de la température de dénaturation des chaînes de collagène, un gel se forme. Les chaînes s'associent alors pour former des portions de triples hélices
35 semblables à celles du collagène natif. Cette transition

conformationnelle permet la création d'un réseau tridimensionnel qui piège les molécules d'eau présentes. Le gel formé est alors un gel physique, les triples hélices ne sont stabilisées que par des liaisons hydrogènes (liaisons
5 faibles). Ces liaisons sont déstabilisées en augmentant la température ce qui provoque la dissolution du gel : ce phénomène de gélification est donc réversible.

Des études précédentes ont montré que l'élasticité de ce gel est liée uniquement à la concentration en hélices de
10 l'échantillon (JOLY-DUHAMEL *et al.*, *Langmuir*, vol.18, p :7158-7166 ,2002 ; JOLY-DUHAMEL *et al.*, *Langmuir*, vol.18, p :7208-7217 ,2002).

2- Concentration : La concentration en gélatine utilisée est la même que celle déterminée à l'exemple 1.

15 3- Vitesse de formation des hélices : La détermination de la vitesse de formation des triples hélices (V_H) a été effectuée en suivant le changement de conformation pelote/hélice par polarimétrie en fonction du temps ou de la température. En effet, la légère torsion résultant de la
20 formation de la triple hélice entraîne une légère rotation d'une lumière polarisée traversant l'échantillon. Cette étude a été effectuée à l'aide d'un polarimètre PERKIN ELMER 341 ou d'un polarimètre JASCO 1100. Les mesures ont été effectuées à 436 nm.

25 L'étude par polarimétrie de la cinétique de formation de gel de gélatine de type A (type A ou AP1) a permis de déterminer, pour chaque gélatine, l'évolution du pourcentage d'hélices en fonction du temps et à 27°C. La figure 9 montre l'évolution du pourcentage d'hélices de solutions à 5% des
30 deux gélatines de type A utilisées (type A et AP1) en fonction du temps et avec un refroidissement de 40°C à 27°C à une vitesse de 0,5°C/minutes.

Les résultats que les cinétiques d'apparition sont globalement identiques dans les deux échantillons. Au temps

de gel, le pourcentage d'hélices est identique pour les deux gélatines (6,4% à 40 minutes).

La vitesse de formation des hélices peut être calculée simplement à partir de la figure 9. La figure 10 montre également l'évolution du pourcentage d'hélices en fonction du temps et de la température pour un gel physique sans transglutaminase (carrés pleins) et pour un gel chimique obtenu en présence de transglutaminase (cercles vides). La vitesse d'apparition des hélices a été déterminée sur différents intervalles de temps et utilisée dans le modèle. Ainsi, pour la figure 10 et pour le gel physique, V_H est de $45 \cdot 10^{-5} \text{ M}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 10 minutes, $21 \cdot 10^{-5} \text{ M}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 10 minutes, $9 \cdot 10^{-5} \text{ M}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 20 minutes, puis de $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant les 90 minutes suivantes et enfin de $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}\cdot\text{min}^{-1}$.

Des expériences similaires ont été effectuées sur des gels de gélatine de 2 à 10%.

Enzymes :

La protéase utilisée correspond à la thermolysine utilisée à l'exemple 1. Les paramètres utilisés sont donc les mêmes que précédemment. Toutefois, il a été tenu compte de la sensibilité différente des deux enzymes à cette température :

- Pour TL ($V_{i40^\circ\text{C}} = 1,66V_{i27^\circ\text{C}}$),
- Pour TG ($V_{i40^\circ\text{C}} = 2,68V_{i27^\circ\text{C}}$).

25 Modélisation :

A partir des différentes valeurs déterminées précédemment, il est possible de suivre le comportement de la fraction liée en fonction du temps en appliquant la méthode d'approximation d'Euler pour résoudre les équations différentielles comme précédemment. Plusieurs expériences de modélisation ont été effectuées en utilisant différentes concentrations en thermolysine.

La figure 11 présente quelques exemples de modélisation de l'évolution du pourcentage de chaînes liées en présence de différentes concentrations de thermolysine à 27°C (le seuil de gel correspond à 6,4% d'hélice). Les résultats obtenus 5 montrent que pour certaines valeurs de V_p une transition est possible et que, dans tous les cas, la fuite due à l'hydrolyse de petits fragments mène à la dégradation du réseau et donc à la solubilisation du gel formé.

10 **2-3 : formation d'un gel physique de gélatine en présence de thermolysine :**

Pour valider ce modèle théorique, différentes expériences ont été effectuées selon le même protocole que celui décrit précédemment (voir 2-2) et en ajoutant différentes concentrations de thermolysine. Les résultats 15 obtenus, en comparaison des prédictions du modèle théorique, sont représentés dans le tableau III suivant :

Tableau III

Thermolysine (en U/ml)	théorique			Expérimental		
	Formation d'un gel	Temps de gel (min)	Durée de vie du gel (unités)	Formation d'un gel	Temps de gel (min)	Durée de vie du gel (min)
0,1	non					
0,02	non					
0,015	non					
0,0125	oui	110	5000			
0,01	oui	110	6000	non	-	-
0,004		110	20 000	oui	45	env. 4300
0,0085		110	9000	oui	68	254

Les résultats montrent là encore que, conformément au modèle théorique développé, il est possible d'obtenir 20 expérimentalement une transition solution/gel puis une

transition gel/solution successivement, et ceci à partir d'une solution de monomères capables de polymériser par la formation de liaisons de faible énergie et en présence d'une enzyme capable de dégrader les chaînes de polymères liés (dans ce cas, une solution de gélatine à 5% et à 27°C en présence de différentes concentrations de thermolysine).

On observe qu'à toutes les concentrations de thermolysine testées (de 0,001 à 0,1 U/ml), le gel, s'il s'est formé, finit par fondre, ce qui est en accord avec le modèle théorique développé.

Dans le cas d'une solution de gélatine à 5% à 27°C et en présence de thermolysine, la concentration en thermolysine critique pour obtenir une première transition solution/gel est de 0,01 unité.

Le temps de gel dépend alors également de la concentration en thermolysine utilisée.

La figure 12 montre l'évolution expérimentale des propriétés viscoélastiques de solution de gélatine à 5% en présence de différentes concentrations de thermolysine et à 27°C.

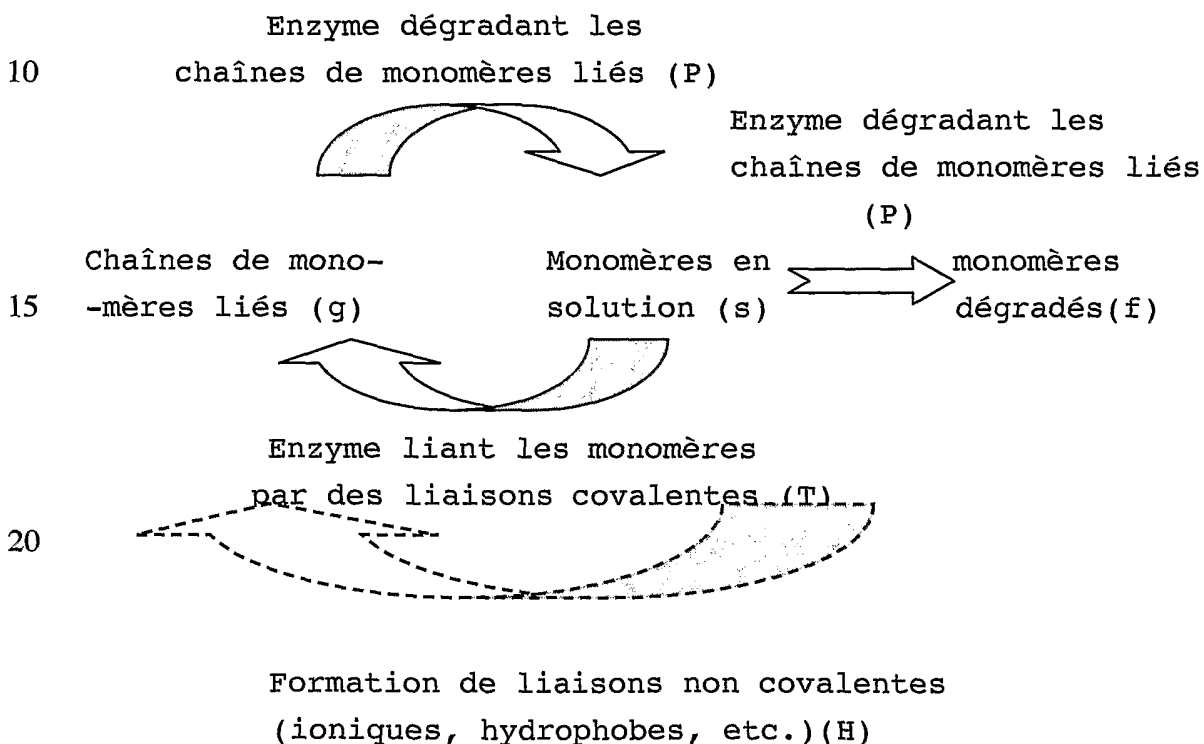
Au regard du modèle théorique développé, il est donc possible d'obtenir un biomatériau capable d'effectuer successivement une transition solution/gel puis gel/solution. Pour cela, il suffit de déterminer la concentration critique en enzyme capable de dégrader les chaînes de monomères liées par des interactions de faible énergie. Le modèle théorique permet ensuite d'adapter la concentration enzymatique pour obtenir un gel qui présente d'une part le temps de gel et d'autre part la durée de vie souhaités.

Exemple 3 : Gel mixte :

3-1. développement d'un modèle théorique :

Ce modèle intègre correspond à l'équilibre dynamique obtenu par la formation d'un gel mixte (physique et chimique) en présence de deux activités enzymatiques antagonistes. Le modèle peut être simplement représenté selon le schéma réactionnel suivant (intégrant les données des schémas I et II):

Schéma III :



Dans ce troisième cas, le mécanisme réactionnel peut être simplement décrit par les trois équations différentielles qui suivent, où les réactions enzymatiques sont assimilées à des réactions michaéliennes simples et par une quatrième équation de conservation de la masse.

L'équation différentielle permettant de décrire l'évolution du nombre de chaînes de monomères liés (g) en fonction du temps est la suivante:

$$\frac{dg}{dt} = - \frac{V_p}{K_p + g} \times g + \frac{V_T}{K_T + s} \times s + V_H$$

L'équation différentielle permettant de décrire l'évolution du nombre de monomères en solution (s) en fonction du temps est la suivante:

5

$$\frac{ds}{dt} = \frac{V_p}{K_p + g} \times g - \frac{V_T}{K_T + s} \times s - \frac{V'_p}{K_p + s} \times s - V_H$$

L'équation différentielle permettant de décrire l'évolution du nombre de monomères dégradés (f) en fonction du temps est la suivante:

10

$$\frac{df}{dt} = \frac{V'_p}{K_p + s} \times s$$

15

Enfin, l'équation de conservation de masse est la suivante:

$$g_t + s_t + f_t = S_0$$

20

Dans ces équations différentielles, V_H représente la vitesse de formation des liaisons de faible énergie et dépend du monomère utilisé, V_p et V_T représentent les vitesses maximales pour l'enzyme P et T respectivement, K_p et K_T représentent les constantes de Michaelis pour l'enzyme P et T respectivement.

25

Dans la transposition de cette équation à un système *in vitro*, les différentes valeurs de [P], [T], V_p , V_T , K_p et K_T correspondent à des constantes.

30

3-2 : modélisation de la formation d'un gel mixte de gélatine à 27°C en présence de transglutaminase et de thermolysine :

Ce modèle théorique a été appliqué à la formation d'un gel mixte de protéine, et plus spécifiquement de gélatine à 27°C et en présence de transglutaminase et de thermolysine.

35

Gélatine :

La concentration en gélatine utilisée est la même qu'aux exemples 1 et 2. La vitesse de formation des hélices est la même que celle déterminée à l'exemple 2.

Enzymes :

5 La protéase utilisée correspond à la thermolysine utilisée dans les exemples 1 et 2.

La transglutaminase est la même que celle utilisée dans l'exemple 1. Les coefficients de diffusion ont été intégrés comme décrit à l'exemple 1 pour tenir compte de l'effet de la
10 diffusion sur l'activité de la transglutaminase.

Les paramètres utilisés pour ces deux enzymes sont donc les mêmes que ceux décrits précédemment.

Modélisation :

A partir des différentes valeurs déterminées
15 précédemment, il est possible de suivre le comportement de la fraction liée en fonction du temps en appliquant la méthode d'Euler d'approximation des équations différentielles comme précédemment. Plusieurs expériences de modélisation ont été effectuées en utilisant différentes concentrations en
20 transglutaminase et en thermolysine. Un coefficient de diffusion a été appliqué pour la transglutaminase comme décrit à l'exemple 1.

La figure 13 montre l'évolution de la fraction de monomères liés en fonction du temps et pour différents
25 rapports V_T/V_P (avec une concentration en transglutaminase de 1 U/ml).

Les résultats suggèrent d'une part que la gélification est plus rapide que dans les exemples précédents, et d'autre part que la fraction de monomères liés et la stabilité des
30 gels sont plus importantes que dans les gels physiques ou chimiques.

3-3 : formation d'un gel mixte de gélatine en présence de thermolysine :

Pour valider le modèle théorique décrit précédemment, une expérience a été effectuée sur un échantillon de gélatine à 5% et à 40°C, en présence des deux enzymes transglutaminase et thermolysine avec un rapport TransglutaminaseG/Thermolysine de 80 et une concentration de transglutaminase de 1 U/ml. La solution a été refroidie de 40°C à 27°C au rythme de 0,5°C par minute. L'évolution de la solution de gélatine est suivie simultanément en rhéologie et en polarimétrie comme décrit précédemment. Le résultat obtenu, en comparaison des prédictions du modèle théorique, est représenté dans le tableau IV suivant :

Tableau IV

Rapport Tgase sur Thermo- lysine	Tgase (en U/ml)	Thermo- lysine (en U/ml)	théorique			Expérimental		
			Formation d'un gel	Temps de gel (min)	Durée de vie du gel (min)	Formation d'un gel	Temps de gel (min)	Durée de vie du gel (min)
80	1	0,0125	oui	<5	15 000	Oui	2	> 5000
80	0,4	0,005	oui	15	> 17 000	nd		
50	1	0,02	oui	<5	5000	nd		
50	0,4	0,008	Oui	15	9000	nd		
10	1	0,1	Oui	<5	750	nd		
10	0,4	0,04	oui	15	1000	nd		

15 nd : non déterminé

Les résultats montrent que, conformément au modèle théorique développé, il est possible d'obtenir expérimentalement à partir d'une solution de monomères polymérisables par des liaisons de faible énergie et par des liaisons covalentes, et en présence de deux activités enzymatiques antagonistes (dans ce cas, une solution de

gélatine à 5%, à 27°C et en présence de différentes concentrations de transglutaminase et de thermolysine) une transition solution/gel puis une transition gel/solution successivement.

5 Conformément au modèle théorique développé, le temps de formation du gel est très rapide. En outre, la stabilité et la durée de vie du gel « mixte » obtenu est très importante au regard des gels physiques et également chimiques.

10 La figure 14 montre l'évolution simultanée des propriétés viscoélastiques et du pourcentage d'hélice d'une solution de gélatine à 5% en présence de transglutaminase et de thermolysine, avec un rapport Transglutaminase/thermolysine de 80 et une concentration en transglutaminase de 1U/ml, et à 27°C.

15 Au regard du modèle théorique développé, qui est basé sur les deux modèles théoriques précédents, il est possible d'obtenir un biomatériau capable d'effectuer successivement une transition solution/gel puis gel/solution. Pour cela, il suffit de déterminer expérimentalement le rapport critique
20 enzyme liant les monomères/ enzyme dégradant les monomères liés comme dans l'exemple 1 pour obtenir une première transition solution/gel en fonction du monomères et des enzymes utilisés. Le modèle théorique permet ensuite d'adapter les différentes concentrations enzymatiques de
25 sorte d'obtenir un gel qui présente d'une part le temps de gel et d'autre part la durée de vie souhaités.

3-4 : formation d'un gel physique de gélatine en présence de différentes protéases :

30 Pour confirmer les résultats obtenus au 3-3, des expériences ont été effectuées sur des échantillons de gélatine à 7% et à 40°C, en présence de transglutaminase et de différentes protéases avec une concentration de transglutaminase de 1,5 U/ml. La solution a été refroidie de 40°C à 27°C au rythme de 0,5°C par minute. L'évolution de la

solution de gélatine est suivie simultanément en rhéologie et en polarimétrie comme décrit précédemment. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau V suivant :

Tableau IV

Rapport Tgase sur Protéase	Tgase (en U/ml)	Protéase (en U/ml)	Expérimental		
			Formation d'un gel	Temps de gel (min)	Durée de vie du gel (min)
115	1,5	0,013 Thermolysine	Oui	46	404
14	1,5	0,11 Trypsine	Oui	48	> 1500
3750	1,5	0,0004 collagénase)	Oui	26	475

5

Les résultats montrent là encore que le modèle développé est généralisable à d'autres enzymes.

REVENDICATIONS

1. Biomatériau du type comprenant au moins un monomère capable de former des polymères, de préférence par des liaisons de faible énergie, ou un mélange desdits monomères et de leurs polymères et un premier type d'enzyme capable de dégrader lesdits polymères, ledit biomatériau se présentant soit sous la forme d'un gel, soit sous la forme d'une solution et étant susceptible d'effectuer successivement une transition solution/gel puis, sous l'action du premier type d'enzyme, une seconde transition gel/solution.

2. Biomatériau selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un second type d'enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre lesdits monomères et en ce que ledit biomatériau est susceptible d'effectuer successivement une première transition solution/gel sous l'action du second type d'enzyme puis une deuxième transition gel/solution sous l'action du premier type d'enzyme.

3. Biomatériau selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les deux types d'enzymes sont présents simultanément sous une forme non-inactivée.

4. Biomatériau selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit monomère est une protéine ou un saccharide.

5. Biomatériau selon la revendication 3, caractérisé en ce que la protéine capable de former des polymères est choisie dans le groupe comprenant la fibrine, la gliadine, la myosine, la globuline (7S et 11S), l'actine, la myoglobine, le collagène et ses dérivés, les protéines du petit lait, les protéines du soja et du blé, et les protéines du jaune et du blanc d'œuf.

6. Biomatériau selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le premier type d'enzyme capable

de dégrader l'espèce protéique polymérisable et ses polymères est choisie dans le groupe comprenant les enzymes de la famille des métalloprotéinases, la famille des sérines protéases, la famille des Cystéines et Aspartate protéases, et la famille ADAM.

7. Biomatériau selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'enzyme capable de dégrader l'espèce protéique polymérisable et ses polymères est une métalloprotéinase, de préférence une thermolysine bactérienne.

8. Biomatériau selon l'une quelconque des revendications 2 à 7, caractérisé en ce que le second type d'enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre les monomères de protéines est choisi dans le groupe comprenant la famille des lysyl oxydases et la famille des transglutaminases.

9. Biomatériau selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le saccharide capable de former des polymères est choisi dans le groupe comprenant les carraghénanes, les alginates, les pectines, le chitosan, la cellulose, la chitine, le glycogène et l'amidon.

10. Biomatériau selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le rapport de la concentration du second type d'enzyme sur la concentration du premier type d'enzyme est supérieur ou égal à 1, de préférence supérieur ou égal à 10.

11. Biomatériau selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un solvant approprié, de préférence un solvant aqueux.

12. Biomatériau selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il se trouve sous la forme d'un gel lyophilisé.

13. Procédé de préparation d'un biomatériau selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend le mélange dans un solvant approprié:

(i) d'au moins un monomère capable de former des polymères, de préférence par des liaisons de faible énergie;

5 (ii) d'un premier type d'enzyme capable de dégrader lesdits polymères.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comprend en outre le mélange dans un solvant approprié :

10 (iii) d'un second type d'enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre lesdits monomères.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 ou 14, caractérisé en ce que le solvant approprié est un solvant aqueux.

15 16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que la quantité de monomères capables de former des polymères est comprise entre 0,1 et 30% en poids par rapport au poids total du biomatériau.

20 17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 16, caractérisé en ce que le rapport de la concentration en enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre les monomères sur la concentration d'enzymes capables de dégrader les polymères est supérieur ou égal à 1, de préférence supérieur ou égal à 10.

25 18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, caractérisé en ce que la concentration en enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre les monomères est supérieure à 0,001 U/ml, de préférence supérieure à 0,01 U/ml.

30 19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 18, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de lyophilisation du biomatériau sous forme de gel.

20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 19, caractérisé en ce que la concentration en monomères capables de former des polymères, la concentration en enzyme capable de dégrader lesdits polymères et, optionnellement, la concentration en enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre lesdits monomères sont choisies de manière à obtenir un biomatériau qui présente le temps de gel et la durée de vie de gel souhaités.

21. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que la concentration en monomères capables de former des polymères, la concentration en enzyme capable de dégrader lesdits polymères et éventuellement la concentration en enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre lesdits monomères sont choisies de sorte que la résolution des équations (I), (II), (III) et (IV) suivantes :

$$\frac{dg}{dt} = - \frac{V_p}{K_p + g} \times g + \frac{V_T}{K_T + s} \times s + V_H \quad \text{(I)}$$

$$\frac{ds}{dt} = \frac{V_p}{K_p + g} \times g - \frac{V_T}{K_T + s} \times s - \frac{V'_p}{K_p + s} \times s - V_H \quad \text{(II)}$$

$$\frac{df}{dt} = \frac{V'_p}{K_p + s} \times s \quad \text{(III)}$$

$$g_t + s_t + f_t = S_0 \quad \text{(IV)}$$

lesquelles équations décrivent respectivement l'évolution du nombre de monomères liés (dg) (I), l'évolution du nombre de monomères en solution (ds) (II) et l'évolution du nombre de monomères dégradés (df) en fonction du temps (dt) (III), et l'équation de conservation de masse (IV),

où :

- g correspond à la quantité de monomères sous forme liée,

- t correspond au temps,

5 - V_p correspond à la vitesse de l'enzyme capable de dégrader les polymères exprimée en quantité de monomères liés ramenés sous leur forme libre par ladite enzyme et par unité de temps,

10 - K_p représente la constante de Michaelis de l'enzyme capable de dégrader les polymères,

- s représente la quantité de monomères sous forme libre,

15 - V_T correspond à la vitesse de l'enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre les monomères exprimée en quantité de monomères sous forme libre liés par ladite enzyme et par unité de temps,

- K_T représente la constante de Michaelis de l'enzyme capable d'effectuer des liaisons covalentes entre les monomères,

20 - V_H représente la vitesse de liaison, par des liaisons de faible énergie et par unité de temps, de monomères sous forme libre, dans le cas de monomères capables de polymériser par de telles liaisons,

25 - V'_p correspond à la vitesse de l'enzyme capable de dégrader les monomères sous forme libre exprimée en quantité de monomères dégradés, lesquels ne peuvent plus polymériser, générés par ladite enzyme et par unité de temps,

- g_t correspond à la quantité de monomères sous forme liée au temps t ,

30 - s_t correspond à la quantité de monomères sous forme libre au temps t ,

- f_t correspond à la quantité de monomères dégradés qui ne sont plus capables de former des polymères au temps t ,

35 - S_0 correspond à la quantité initiale de monomères,

permet d'obtenir un temps de gel et la durée de gel souhaités.

% de chaînes liées

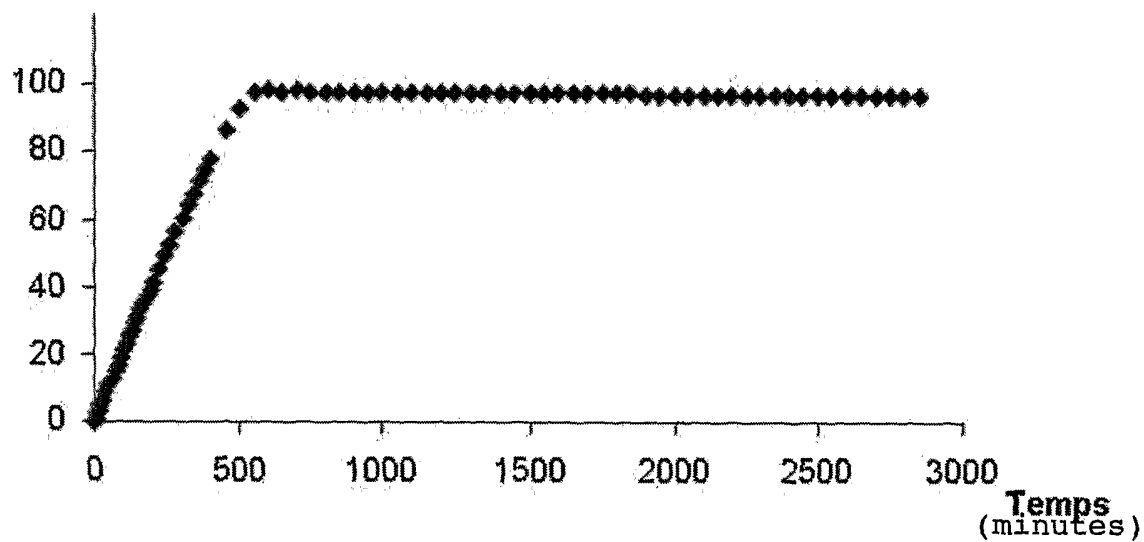


Figure 1

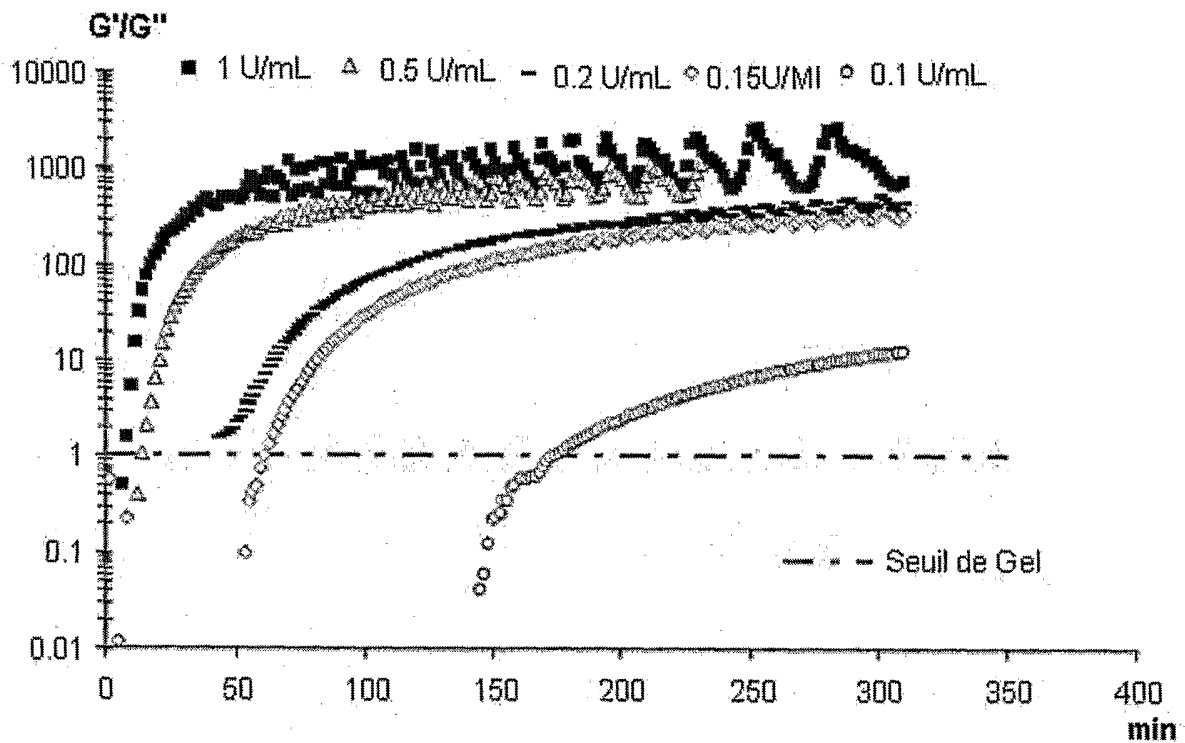


Figure 2

3/14

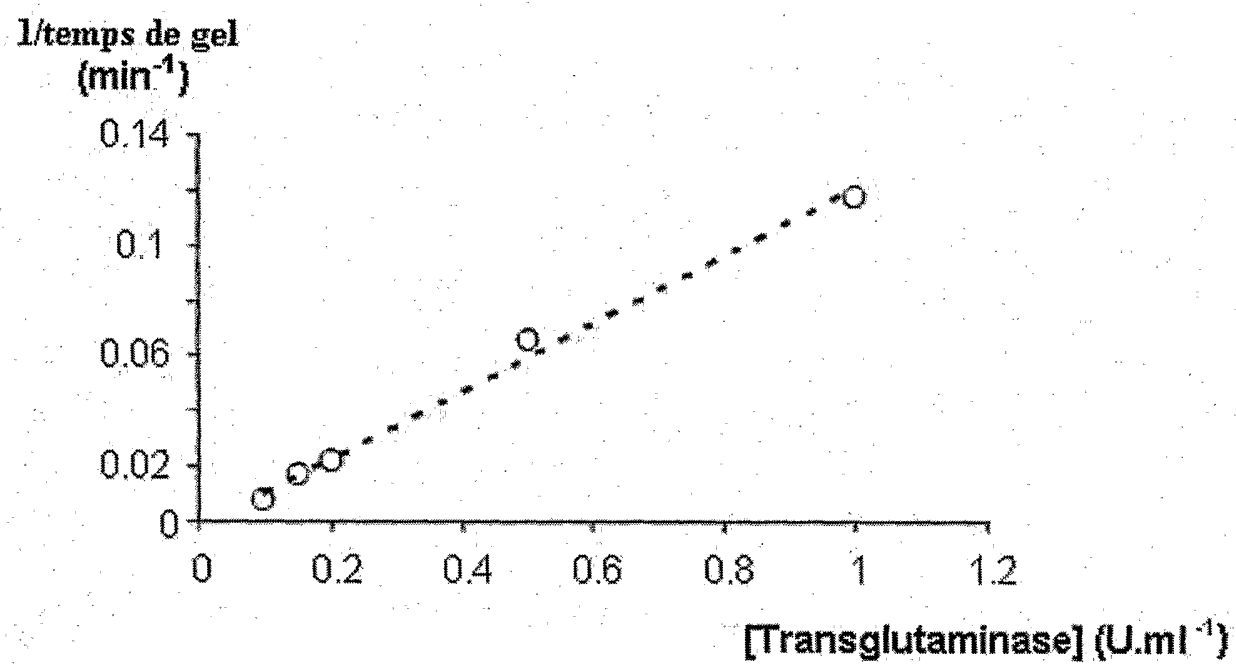


Figure 3

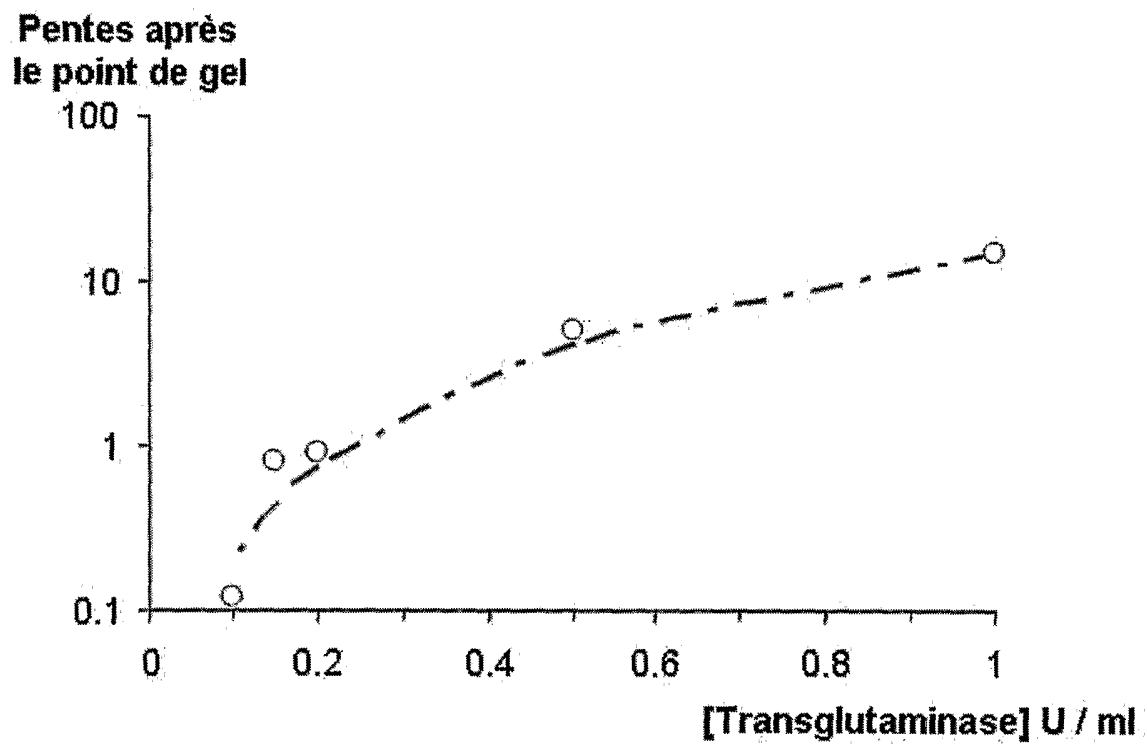


Figure 4

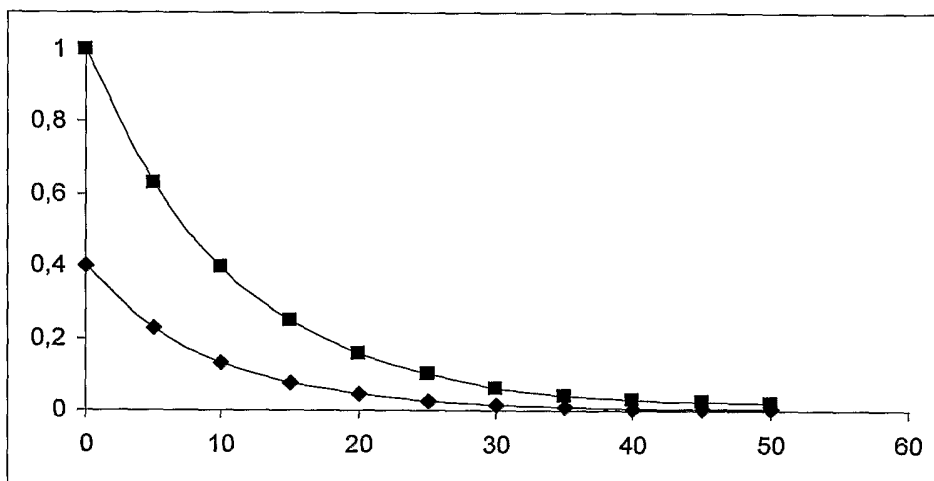


Figure 5

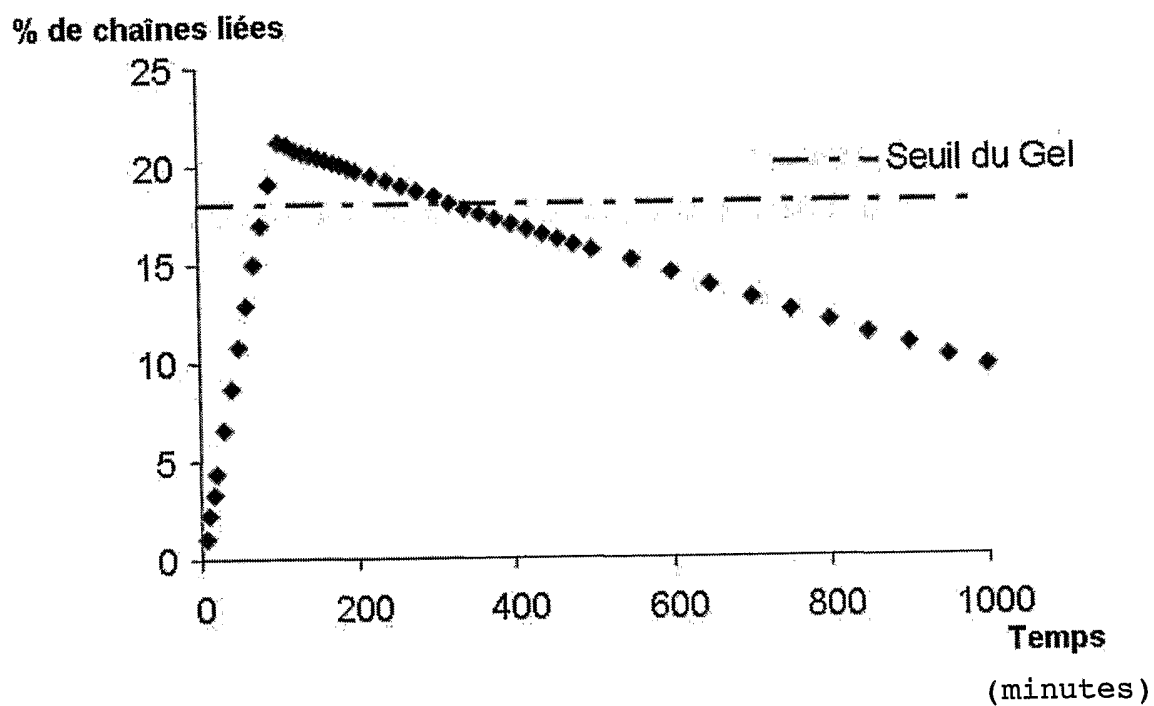


Figure 6

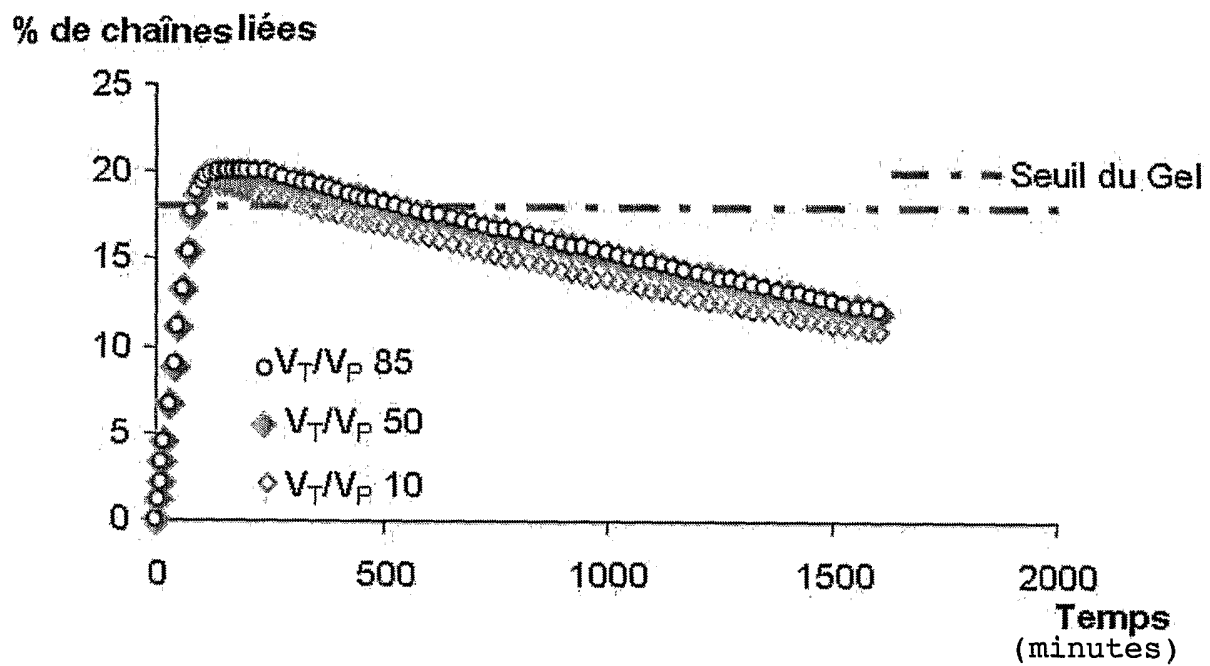


Figure 7

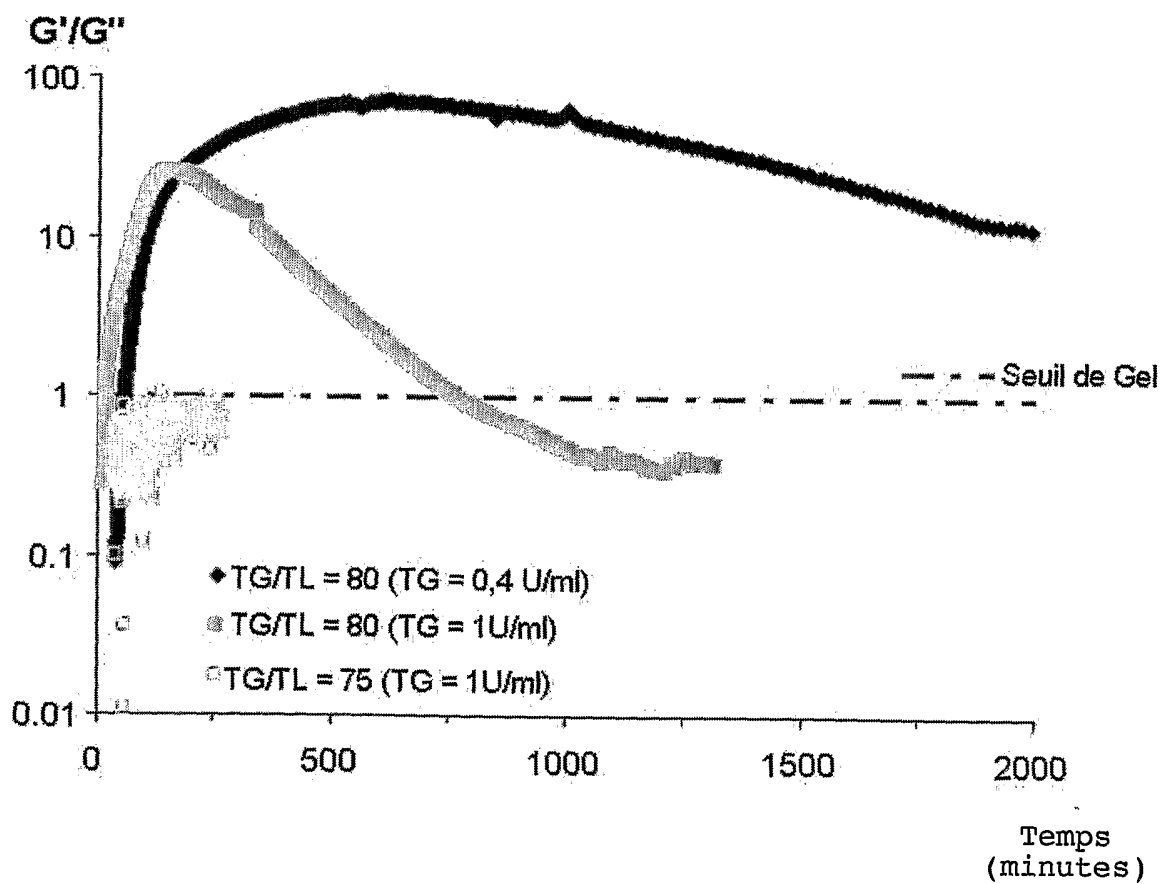


Figure 8

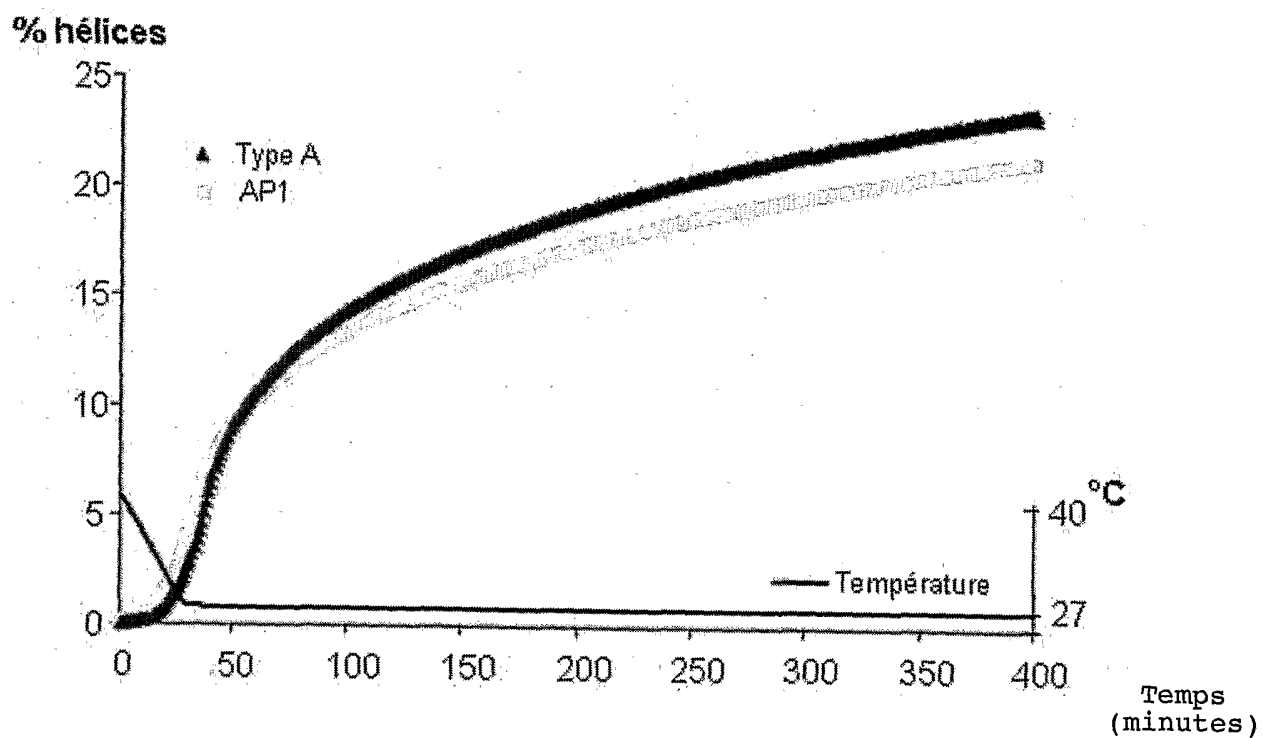


Figure 9

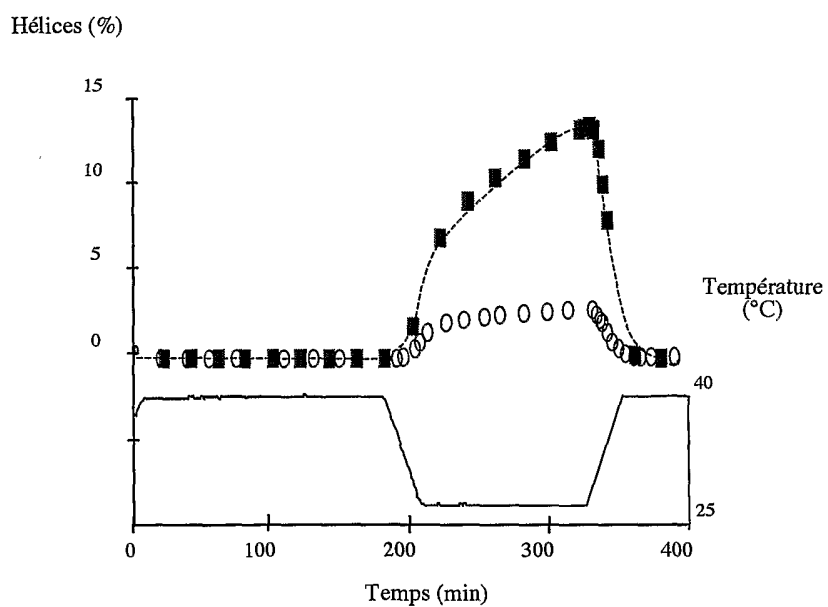


Figure 10

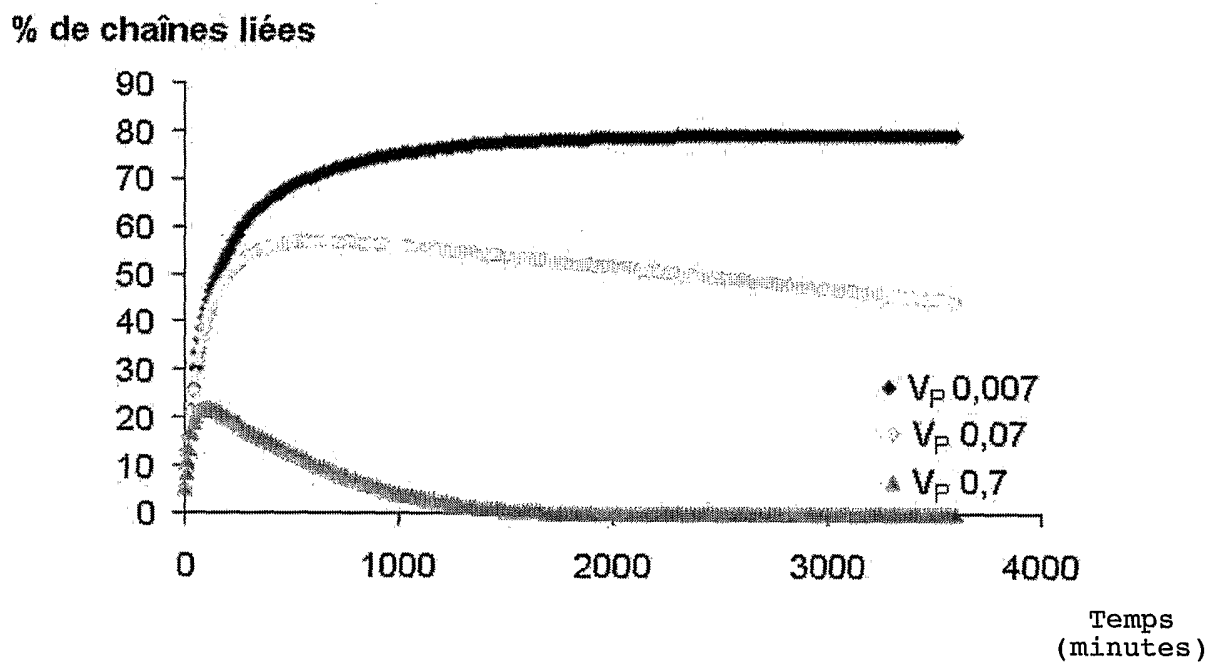


Figure 11

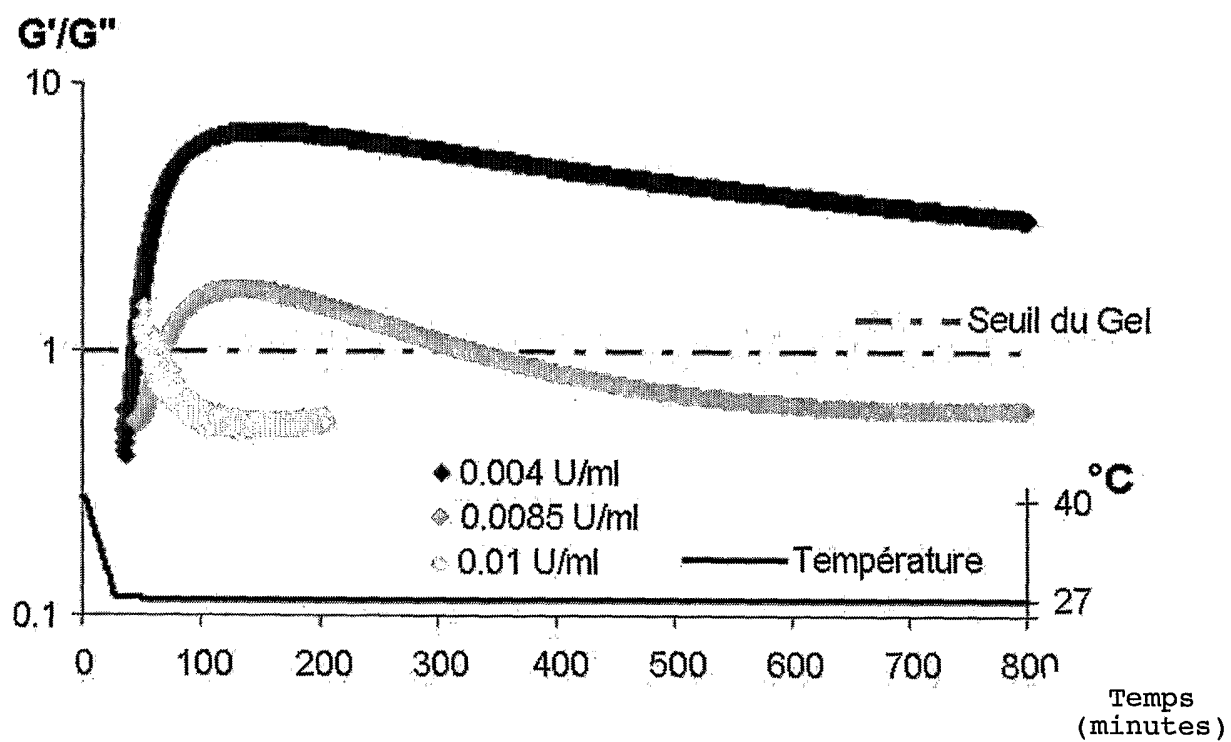


Figure 12

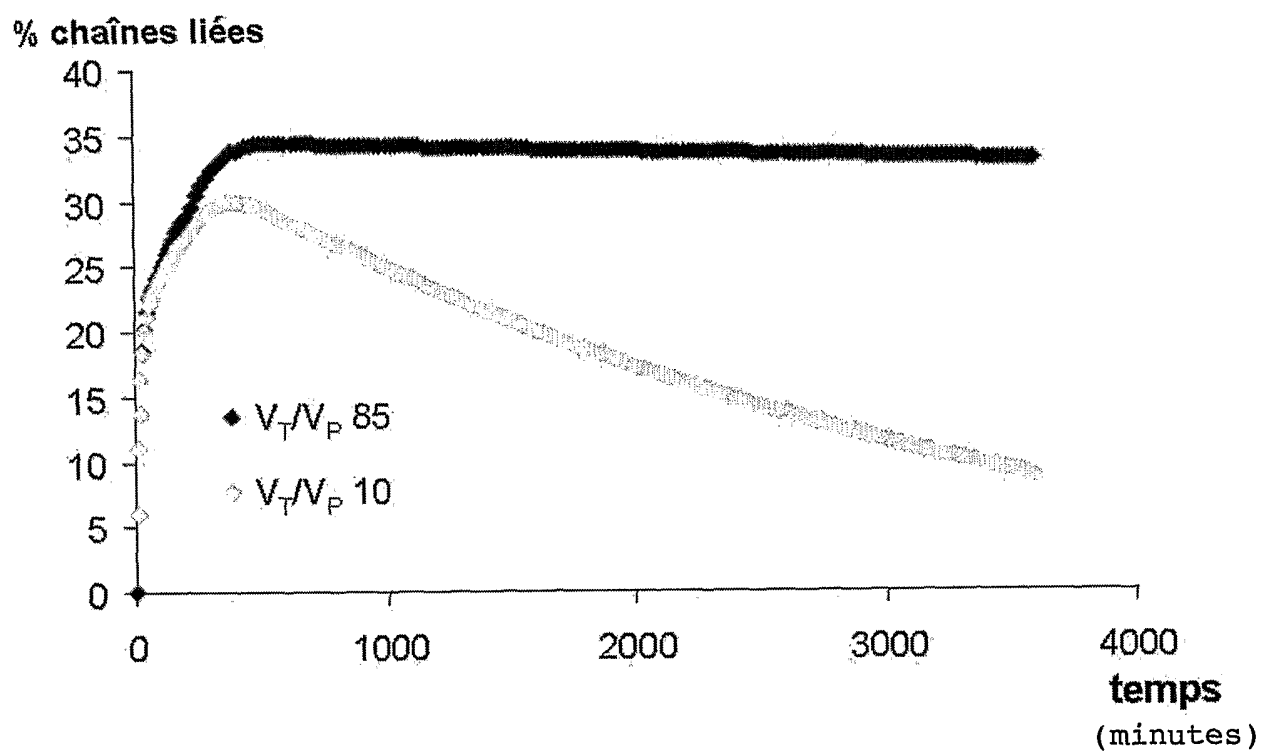


Figure 13

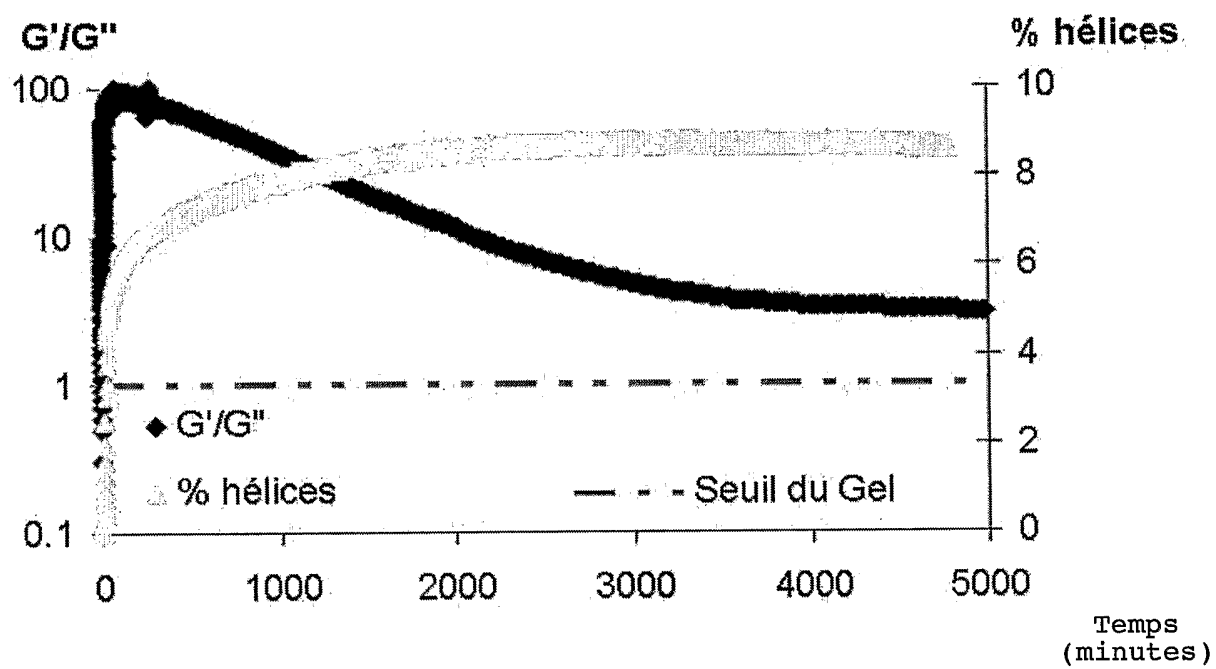


Figure 14