

EXTRACTION DU COLLAGÈNE À PARTIR DU BYSSUS DE LA MOULE *MYTILUS GALLPROVINCIALIS*

Jihene lassoued^{*1,2}, Emna Ben Slimane^{1,2}, Saloua sadok² et Nejla Bejaoui^{1,2}

¹Institut National Agronomique de Tunisie INAT, 43 Avenue Charles Nicolle, 1082 Tunis, Université de Carthage, Tunisia

²Laboratory of Blue Biotechnology & Aquatic Bioproducts (B³Aqua), Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM). Annexe La Goulette Port de pêche, La Goulette 2060, Tunisia

* lassoued_jihene.89@hotmail.fr

ملخص

استخراج الكولاجين من حزمة خيوط بلح البحر : يحتوي حزمة خيوط بلح البحر على الكولاجين الذي يمنحه خصائص ميكانيكية استثنائية تجمع بين الصلابة والمرونة والمتانة. التعقيد الجزيئي لحزمة خيوط بلح البحر يجعل استخراج الكولاجين صعباً وذات عوائد منخفضة. الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو توصيف الكولاجين المستخرج من بلح البحر. تم استخدام أربعة أنواع من المواد الكيميائية، إثنين ذات طابع مخلبي (HCl-EDTA) و إثنين من مغيري الطبيعة الكيميائية (Guanidine-HCl and Urea). في نهاية كل اختبار استخراج، تم إجراء توصيف للبنية الجزيئية للكولاجين باستخدام التحليل الطيفي للأشعة تحت الحمراء (FTIR) بالإضافة إلى تقييم الكتلة الجزيئية بواسطة الكهروتهجير (électrophorèse). يبدو أن المعالجة باستخدام حمض الهيدروكلوريك (HCl) هي الأقل فعالية من حيث الكمية المستخرجة. لا توجد فوارق ذات دلالة إحصائية بين عائد استخراج الكولاجين من حزمة خيوط بلح البحر معالجة باستخدام EDTA، Guanidine- HCl و Urea. تظهر نتائج FTIR للكولاجين المتحصل عليه من مختلف أنواع المعالجة اختلافات في الهياكل الجزيئية، فقط الاختبارات التي استخدمنا فيها EDTA و Guanidine-HCl جعلت من الممكن الحصول على التركيب الجزيئي النموذجي للكولاجين. سمح لنا ملف التعريف الكهربائي SDS-PAGE باستنتاج أنه لا يمكن اعتبار كولاجين حزمة خيوط بلح البحر من النوع الأول نظراً لأن شظايا الببتيد المقاومة للبيبسين جميعها ذات وزن جزيئي أقل من 65 كيلو دالتون.

الكلمات المفتاحية: الكولاجين ، حزمة خيوط، بلح البحر، استخراج ، المعالجة

RESUME

Le byssus de la moule renferme du collagène qui lui confère des propriétés mécaniques impressionnantes combinant rigidité, élasticité et ténacité élevées. La complexité moléculaire des filaments du byssus rend l'extraction du collagène difficile et avec de faibles rendements. Le but de cette étude est de caractériser le collagène extrait du byssus de moules à l'aide d'une méthode enzymatique. Des prétraitements spécifiques ont été utilisés pour améliorer le rendement d'extraction. Deux types d'agents chélateurs (HCl et EDTA) et deux types de dénaturants (Guanidine-HCl et Urée) ont été utilisés. À la fin de chaque essai d'extraction, une caractérisation de la structure moléculaire du collagène a été faite en utilisant la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ainsi qu'une évaluation de sa masse moléculaire par SDS-PAGE. Le prétraitement avec le HCl semble le moins performant en terme de rendement. Pas de différences significatives entre les rendements d'extraction du collagène du byssus traité par la Guanidine-HCl, l'EDTA et l'urée. les spectres de FTIR des différents collagènes obtenus par différents types de prétraitements montrent des différences dans la structure moléculaire du collagène obtenu, seuls les essais utilisant l'EDTA et la Guanidine-HCl ont permis d'obtenir la structure moléculaire typique du collagène. Le profil électrophorétique nous a permis de conclure que le collagène du byssus ne peut pas être considéré comme collagène de type I, puisque les fragments peptidiques résistants à la pepsine sont tous de poids moléculaire inférieur à 65KDa.

Mots clés : Collagène, Byssus, Extraction, Prétraitement

ABSTRACT

Extraction of collagen from byssus of Mussel *Mytilus gallprovincialis* Mussel byssus contains collagen which gives it impressive mechanical properties combining rigidity, elasticity and high toughness. The molecular complexity of the byssus threads makes the extraction of collagen difficult and with low yields. The aim of this study is to characterize the collagen extracted from the mussel byssus. Specific pretreatments were used to improve the extraction yield. Two types of chelating agents (HCl and EDTA) and two types of denaturing agent (Guanidine-HCl and Urea) were used. At the end of each extraction test, a characterization of the molecular structure of collagen was made using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) as well as an evaluation of its molecular mass by SDS-PAGE. The pretreatment with HCl seems the least efficient in terms of yield. No significant differences between the collagen extraction yields from the byssus treated with Guanidine- HCl, EDTA and Urea. The FTIR spectra of the different collagens obtained by different types of pretreatment show differences in the molecular structures of the collagen obtained, only the tests using EDTA and Guanidine-HCl made it possible to obtain the molecular structures typical of collagen. The electrophoresis profile allowed us to conclude that the collagen of byssus cannot be considered as type I collagen, since the peptide fragments resistant to pepsin are all of molecular weight less than 65KDa.

Keywords: Collagen, Byssus, Extraction, Pretreatment

INTRODUCTION

Le byssus est une structure filamenteuse secrétée par certains mollusques bivalves à travers laquelle ils s'adhèrent à leurs substrats. Le byssus est composé de filaments fins constitués de plus de 50% de collagène (Harrington et Waite, 2008; Suhre et al., 2014). Le collagène du byssus de la moule est connu d'avoir des propriétés fort intéressantes comprenant une température de fusion élevée et une certaine résistance aux dénaturants, aux acides et aux protéases (Qin et Waite, 1995). Il est clair alors que, d'un point de vue scientifique, environnemental et économique, la conduite de la recherche axée sur l'extraction du collagène du byssus de la moule est clairement justifiée. En effet, le collagène a été élu comme étant un matériel biologique clé dans les applications biomédicales en raison de leur biocompatibilité élevée (Silva et al., 2014). Vu les contraintes que représente le collagène extrait des mammifères, les sources de collagène marin commencent à avoir une application potentielle en ingénierie tissulaire et dans des applications biomédicales (Silva et al., 2014; Yang et al., 2014; Moon et al., 2015 ; Subhan et al., 2015). Le collagène provenant des déchets de poisson (peau, os et écailles) est la source la plus étudiée dans la conception des biomatériaux. Cependant, sa faible température de dénaturation et sa composition variable limitent son application (Silva et al., 2014; Subhan et al., 2015). Par conséquent, les études du collagène marin d'invertébrés sont actuellement en pleine expansion. Des échafaudages en collagène de méduses et d'éponges marines ont été développés, obtenant ainsi des matériaux de grande porosité, de structure poreuse interconnectée, de viabilité cellulaire élevée et sans cytotoxicité (Lee et al., 2007; Pallela et al., 2012; Hoyer et al., 2014). Ces résultats prometteurs ont entraîné une intensification des recherches sur d'autres espèces d'invertébrés connues d'avoir des structures riches en collagène comme le byssus de la moule. Le byssus est l'un des principaux coproduits générés par la mytiliculture, et peut par conséquent être considéré comme une source potentielle de collagène à haute valeur ajoutée. Cependant, la complexité du byssus comme matrice biologique demeure un défi à relever dans l'extraction du collagène qui le constitue. Dans ce contexte, nous avons essayé dans cette étude de mettre en place une procédure expérimentale pour extraire le collagène du byssus de moule. Les résultats de cette étude pourraient être utilisés pour élaborer des stratégies pour la réutilisation de ce coproduit comme une nouvelle source potentielle de collagène. Le collagène extrait du byssus de la moule peut être utilisé pour des applications alimentaires et pharmaceutiques en raison de sa biodégradabilité et de sa biocompatibilité dans les environnements

naturels. Une caractérisation des propriétés physico-chimiques de ce type de collagène sera nécessaire avant toute application industrielle.

MATERIEL ET METHODES

Extraction du collagène

L'extraction du collagène du byssus des moules a été faite en utilisant une méthode d'extraction classique (acide et enzymatique) inspirée des méthodes de Nagai et Suzuki (2000) et Duan et al. (2009). Une extraction acide commence par la solubilisation du collagène par une solution d'acide acétique. Le collagène appelé ASC «Acid Solubilized Collagen» est ensuite séparé par une centrifugation. Les résidus obtenus à la fin de l'extraction acide feront l'objet d'une extraction enzymatique par le biais de la pepsine. Le PSC «Pepsine Solubilized Collagen» est le collagène obtenu à la fin de l'extraction par une centrifugation. Les ASC et PSC subissent une précipitation par le NaCl pendant 12 à 24 heures sans agitation.

Essais d'optimisation d'extraction du collagène

Des prétraitements spécifiques ont été utilisés dans le but d'améliorer le rendement d'extraction du collagène du byssus. Ces prétraitements ont été suivis par des extractions acides couplées à des traitements étendus avec de la pepsine (Qin et Waite, 1995 ; Harrington et Waite, 2008 ; Vallejos et al., 2014, Rodriguez et al., 2017). La complexité de la structure moléculaire du byssus nous a conduit à employer deux types d'agents chélateurs (HCl et EDTA) dans le but d'éliminer les éléments métalliques qui réticulent la protéine et deux types de dénaturants (Guanidine-HCl et Urée) et ce, pour détruire les liaisons qui lient les groupes peptidiques et qui assurent la forme tridimensionnelle du collagène du byssus. Les extractions ont été renouvelées à 3 reprises à un intervalle de 3 jours. La dernière étape dans l'extraction du collagène est l'étape de dialyse suivie d'une lyophilisation.

Caractérisation du collagène produit

- Le rendement d'extraction

Le rendement d'extraction a été calculé à partir de la masse de byssus initiale et la masse finale du collagène lyophilisé comme suit :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \frac{\text{(Masse du collagène lyophilisé/ Masse initiale du byssus)} \times 100}{}$$

- FTIR

Les analyses FTIR des collagènes extraits du byssus de la moule ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 630 FTIR (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, USA) dans une plage de longueur d'ondes allant de 400 à 4000

cm⁻¹. Le collagène a été placé directement sur le spectromètre FTIR équipé d'un échantillon de diamant Agilent ATR (Attenued Total Reflexion).

- Electrophorèse

La détermination des profils électrophorétiques du collagène a été réalisée selon la méthode de Laemmli (1970). L'électrophorèse a été réalisée en utilisant un gel de séparation de 10% et un gel de concentration de 5%.

Analyses statistiques

Les données des expériences (réalisées au moins en triple) ont été présentées sous forme de moyenne ±

écart type. L'interprétation statistique des résultats a été réalisée avec des tests ANOVA à l'aide du logiciel SPSS 22.0 (SPSS 22.0 pour Windows, SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTATS ET DISCUSSION

Le rendement d'extraction obtenu en utilisant le protocole classique d'extraction de collagène était de 0,1%. L'analyse de FTIR a montré un profil typique du collagène avec la présence des différents amides (A, B, I, II et III) qui le caractérisent (Figure 1).

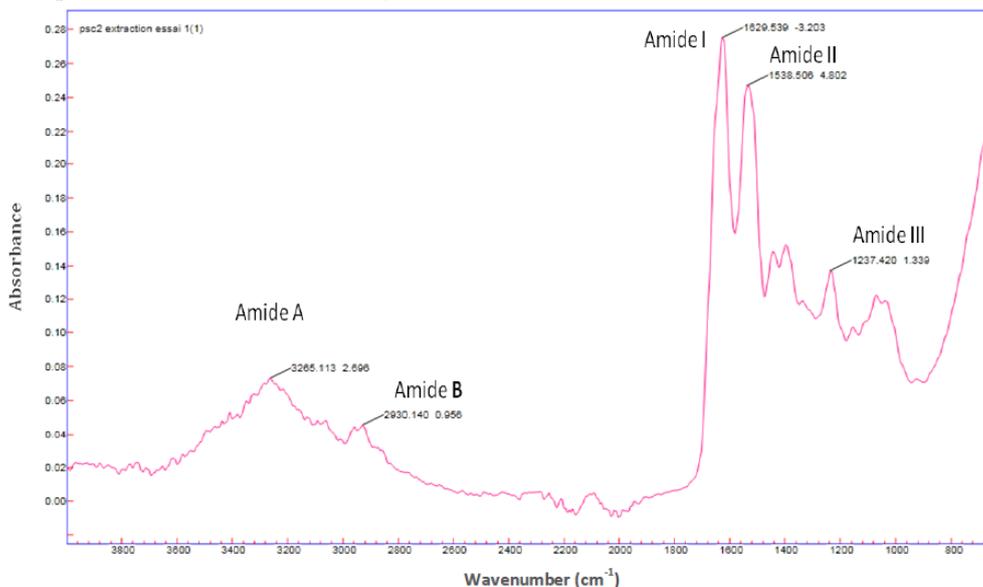


Figure 1. Spectre d'absorbance de FTIR de collagène obtenu par la l'extraction enzymatique « PSC »

Le résultat non satisfaisant en termes de rendement d'extraction peut être expliqué par la structure du byssus hautement réticulée qui se manifeste par des jonctions chimiques par le biais des fortes liaisons covalentes. Par conséquent, nous avons procédé à des prétraitements particuliers (Guanidine-HCl/ EDTA/ Urée/ HCl) dans le but d'agir sur sa

structure moléculaire complexe et de faciliter l'étape d'extraction enzymatique du collagène (Harrington et Waite, 2008; Vallejos et al., 2014; Rodriguez et al., 2017).

Les différents rendements des extractions testées avec les différents prétraitements sont représentés dans la figure 2.

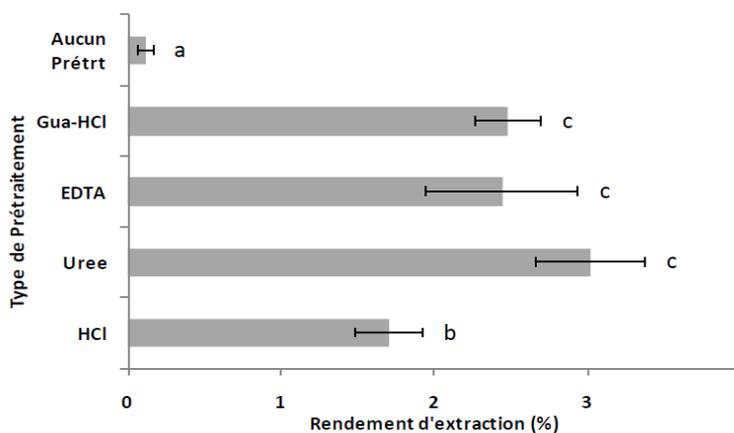


Figure 2. Les rendements d'extraction du collagène obtenus en utilisant différents types de prétraitement

Comme le montre la figure 2, la nature de prétraitement a un effet significatif ($p < 0,05$) sur le rendement d'extraction du collagène. Le prétraitement utilisant le HCl semble être le moins performant en termes de rendement d'extraction. En effet, nous n'avons pas observé de différences

significatives ($p > 0,05$) entre les rendements d'extraction du collagène du byssus traité par la Guanidine-HCl, l'EDTA et l'urée. Les spectres obtenus par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) des différents extraits du collagène du byssus sont représentés dans la figure 3.

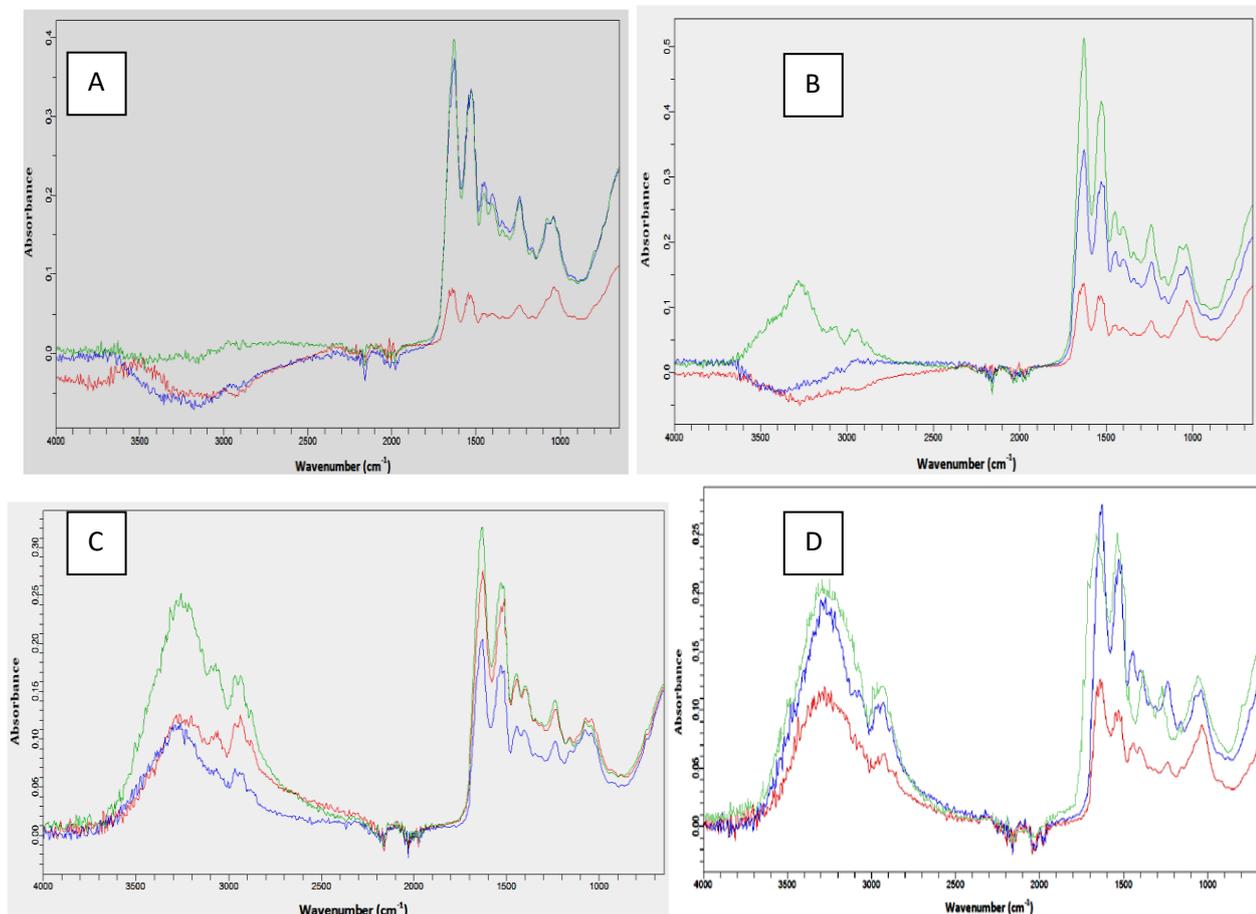


Figure 3. Spectre FTIR de l'extrait du collagène obtenu après des prétraitements spécifiques (A: HCl; B: Urée; C: Guanidine-HCl; D: EDTA)
 (— : 1^{ère} extraction ; — : 2^{ème} extraction ; — : 3^{ème} extraction)

Les spectres de FTIR des différents collagènes obtenus par différents types de prétraitements montrent des différences dans la structure moléculaire du collagène obtenu. Seuls les essais utilisant l'EDTA et la Guanidine-HCl comme prétraitement ont permis d'obtenir la structure moléculaire typique du collagène traduite par la présence des amides A et B et des amides I, II et III (Figure 3, C, D). En effet, les signaux qui ont été détectés entre 1200 et 1300 cm^{-1} sont généralement attribués au collagène type I et II (Hagenau *et al.*, 2009).

Les amides A et B ne sont pas apparus dans les spectres de FTIR du collagène extrait à partir du byssus traité avec l'acide chlorhydrique (Figure 3, A). Dans le cas du prétraitement avec l'urée, les amides A et B sont apparus dans les spectres du FTIR après la troisième extraction (Figure 3, B).

En effet, l'urée et la guanidine-HCl ont la même fonction chimique qui se manifeste dans l'affaiblissement de l'effet hydrophobe responsable de la stabilité des conformations protéiques natives, la seule différence est que la Guanidine-HCl est de 1,5 à 2,5 fois plus efficace que l'urée en tant que dénaturant protéique (Monera et Hodges, 1994).

L'EDTA semble être le prétraitement le plus adéquat pour l'extraction du collagène du byssus. D'une part, parce que cet agent chélateur confère une structure secondaire typique du collagène obtenue par spectroscopie infrarouge transformée en Fourier (FTIR), et d'autre part, de point de vue économique puisqu'il est considéré comme le moins cher par rapport aux différents agents des prétraitements testés.

Le résultat d'électrophorèse SDS-PAGE est représenté dans la figure 4.

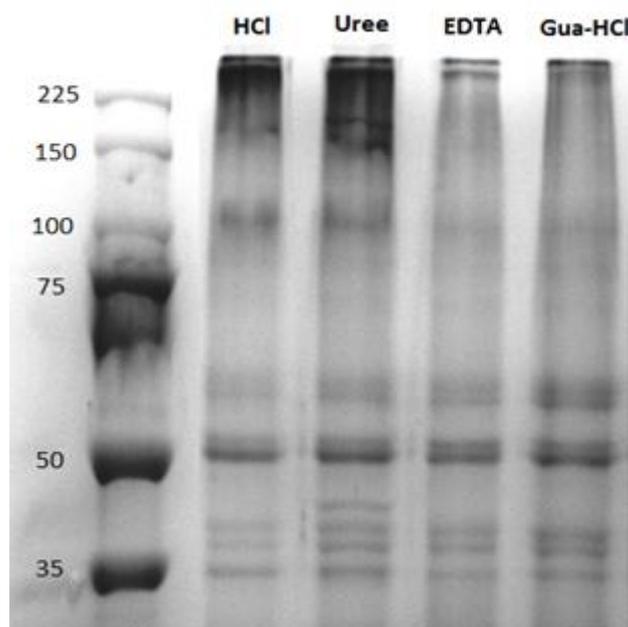


Figure 4. Profils électrophorétiques des collagènes obtenus par différents types de prétraitements

Ainsi, Les extractions acides avec de la pepsine ont libéré des collagènes résistant à la pepsine. Cela a entraîné la détection de plusieurs bandes de protéines par électrophorèse SDS-polyacrylamide comme le montre la figure 4.

Des fragments de collagène résistant à la pepsine (40-60 kDa) ont été signalés par Benedict et Waite (1986). Plus tard, ceux-ci ont été isolés et partiellement séquencés (Qin et Waite, 1995). Le COL-D, ainsi nommé parce qu'il prédomine dans la partie distale du filament du byssus existe comme homotrimère avec une masse de 60 kDa telle que déterminée par SDS-PAGE. Le COL-P, en revanche, provient de la partie proximale des filaments du byssus et a une masse apparente de 50 kDa (Coyne et *al.*, 1997).

Nos résultats sont en concordance avec les résultats de Qin et Waite (1995) qui ont conclu que le collagène du byssus ne peut pas être considéré comme collagène de type I, puisque les fragments peptidiques résistants à la pepsine sont de poids moléculaire inférieur à 65KDa.

Ces résultats ne sont par ailleurs pas conformes à ceux de DeVore et *al.* (1984) et Rodriguez et *al.* (2017) qui ont indiqué la présence de collagène de type I dans le byssus. Dans leurs études, les échantillons de collagène examinés par SDS-PAGE ne présentent que des configurations β et γ du collagène du type I; Cependant, aucune chaîne alpha n'a pas pu être visualisée à partir de leur évaluation. Ils ont considéré que la réticulation et les fortes liaisons des protéines du byssus ont diminué la solubilisation du collagène dans leur méthode d'extraction.

CONCLUSION

Il est clairement nécessaire de poursuivre les recherches pour établir les activités fonctionnelles du collagène issu du byssus de la moule. Les résultats obtenus doivent être consolidés par une meilleure caractérisation du collagène produit en analysant les acides aminés qui le constituent et en testant d'autres paramètres comme la turbidité du collagène en dispersion, sa viscosité apparente, l'effet du pH sur la solubilisation du collagène ainsi que la détermination de la température de dénaturation du collagène produit. Ces caractéristiques auront une incidence sur les performances du collagène du byssus de la moule en tant que nouvelle source potentielle de collagène pour des applications alimentaires ou pharmaceutiques. Tous ces résultats pourraient servir comme une contribution à l'élaboration de stratégies spécifiques visant la réutilisation des sous-produits de la mytiliculture.

Remerciement : Ce travail a été mené dans le cadre du projet transfrontalier BIOVecQ PS1.3_08 cofinancé par l'UE. Les auteurs tiennent à remercier toute l'équipe du laboratoire B³Aqua de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM).

BIBLIOGRAPHIE

- Coyne K. J., Qin X. X. and Waite J. H. (1997). Extensible collagen in mussel byssus: a natural block copolymer. *Science.*, 277, 1830–1832.
- Devore D.P. Engebretson G.H., Schachtele, C.F. and Sauk, J. J. (1984). Identification of collagen from byssus threads produced by the sea

- mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77: 529–531.
- Duan R, Zhang J, Dua X, Yao X. and Konno K. (2009). Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*) *Food Chem.*, 112:702–706.
- Hagenau A., Scheidt H.A., Serpell L., Huster D. and Scheibel T. (2009). Structural analysis of proteinaceous components in byssal threads of the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Macromol Biosci.*, 9:162–168.
- Harrington M.J & Waite J.H. (2008). Short-order tendons: liquid crystal meshophases, metal-complexation and protein gradients in the externalized collagens of mussel byssal threads. In: Scheibel T (ed) *Fibrous proteins*. Landes Bioscience Inc, Texas, pp 30–45.
- Hoyer B., Bernhardt A., Lode A., Heinemann S., Sewing J., Klinger M., Notbohm H. and Gelinsky M. (2014). Jellyfish collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.*, 10: 883–892.
- Leamli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature (Lond.)*, 227: 680-685.
- Lee S.J., Kim S.Y. and Lee Y.M. (2007). Preparation of porous collagen/ hyaluronic acid hybrid scaffolds for biomimetic functionalization through biochemical binding affinity. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.*, 82: 506–518.
- Moon S.H., Lee Y.J., Rhie J.W., Suh D.S., Oh D.Y., Lee J.H., Kim Y.J., Kim S.M. and Jun Y.J. (2015). Comparative study of the effectiveness and safety of porcine and bovine atelocollagen in Asian nasolabial fold correction. *J. Plast. Surg. Hand Surg.*, 49: 147–152.
- Monera Kay C.M. & Hodges R.S. (1994). Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions. *Cambridge University Press, Protein Science.*, 3: 1984-1991.
- Nagai T., Araki Y. and Suzuki N. (2002). Collagen of the skin of ocellate puffer fish (Takifugu rubripes). *Food Chem.*, 78: 173–177.
- Pallela R., Venkatesan J., Janapala V.R. and Kim S.K. (2012). Biophysicochemical evaluation of chitosan-hydroxyapatite-marine sponge collagen composite for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part A.*, 100: 486–495.
- Qin X.X. & Waite J.H. (1995). Exotic collagen gradients in the byssus of the mussel *Mytilus edulis*. *J. Exp. Biol.*, 198: 633–644.
- Rodriguez F., Moran L., Gonzalez G., Troncoso E. and Zuniga R.N. (2017). Collagen extraction from mussel byssus: a new marine collagen source with physicochemical properties of industrial interest. *J Food Sci Technol.*, 54:1228-1238.
- Silva T.H., Moreira-Silva J., Marques A.L.P., Domingues A., Bayon Y. and Reis R.L. (2014). Marine origin collagens and its potential applications. *Marine Drugs.*, 12: 5881–5901.
- Subhan F., Ikram M. and Shezad A. (2015). Marine collagen: an emerging player in biomedical applications. *J Food Sci Technol.*, 52:4703–4707.
- Suhre M.H., Gertz M., Steegborn C. and Scheibel T. (2014). Structural and functional features of a collagen-binding matrix protein from the mussel byssus. *Nat Commun.*, 5:3392.
- Vallejos N., Gonzalez G., Troncoso E. and Zuniga R.N. (2014). Acid and enzyme-aided collagen extraction from the byssus of Chilean Mussels (*Mytilus Chilensis*): effect of process parameters on extraction performance. *Food Biophysics.*, 9: 322–331.
- Yang Y.J., Jung D., Yang B., Hwang B.H. and Cha H.J. (2014). Aquatic proteins with repetitive motifs provide insights to bioengineering of novel materials. *Biotechnol Journal.*, 9: 1493–1502.