



**HAL**  
open science

## Validations biologiques et physico-chimiques d'un revêtement cellulosique de boîtes pour cultures cellulaires bioactives.

E. Velzenberger

► **To cite this version:**

E. Velzenberger. Validations biologiques et physico-chimiques d'un revêtement cellulosique de boîtes pour cultures cellulaires bioactives.. Sciences de l'ingénieur [physics]. Université de Technologie de Compiègne, 2008. Français. NNT : . tel-00410260

**HAL Id: tel-00410260**

**<https://theses.hal.science/tel-00410260>**

Submitted on 19 Aug 2009

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

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

Par Elodie VELZENBERGER

*Version provisoire*

VALIDATIONS BIOLOGIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES D'UN  
REVÊTEMENT CELLULOSIQUE DE BOÎTES POUR CULTURES  
CELLULAIRES BIOACTIVES

Laboratoire " De l'interaction cellule-matériau à l'organe artificiel ", UMR CNRS 6600 :  
Biomécanique et Bioingénierie.

Thèse présentée le 09 octobre 2008 pour l'obtention  
Du grade de Docteur de l'UTC

**Devant le jury composé de :**

Gilbert LEGEAY - Président

Dominique LAURENT-MAQUIN - Rapporteur

Véronique MIGONNEY - Rapporteur

Karim EL-KIRAT - Examineur

Isabelle PEZRON - Co-directeur de Recherche

Marie-Danielle NAGEL - Directeur de Recherche

## REMERCIEMENTS

Je tiens à profiter de l'opportunité qui m'est offerte dans ce manuscrit pour exprimer ma plus sincère reconnaissance envers le **Professeur Marie-Danielle NAGEL** pour m'avoir accueillie dans son équipe durant ces trois années et de m'avoir confié ce sujet de thèse. Je souhaite également adresser mes plus profonds remerciements au **Professeur Isabelle PEZRON** et au **Docteur Karim EL KIRAT** pour avoir accepté de m'encadrer et de me guider pas à pas dans mon apprentissage. Merci à vous trois pour m'avoir initiée aux plaisirs de la recherche et pour toute la confiance que vous m'avez témoignée. Mais surtout, merci pour votre disponibilité, votre patience, votre attention, vos encouragements et votre investissement personnel dans les étapes de la rédaction de ce manuscrit et des articles.

Je remercie vivement le **Docteur Gilbert LEGEAY** pour avoir si gentiment accepté d'être le Président du jury.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers le **Professeur Véronique MIGONNEY**, de l'Université Paris 13 et le **Professeur Dominique LAURENT-MAQUIN**, de l'Université de Reims, pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs.

Je voudrais aussi adresser mes remerciements les plus chaleureux aux membres de l'équipe " De l'interaction cellule-matériau à l'organe artificiel " et notamment **Muriel VAYSSADE** et **Jean-Luc DUVAL**, pour votre présence et votre aide au quotidien. Ma thèse ne se serait jamais aussi bien déroulée sans votre présence. Un immense merci pour votre soutien, votre humour, votre bonne humeur et nos discussions. Je tiens à remercier particulièrement **Pascale VIGNERON** pour nos trois années de cohabitation, ton amitié et ta gentillesse. Travailler au quotidien à vos côtés a été un réel plaisir et j'espère que nous aurons la possibilité de se revoir.

Je voudrais aussi adresser mes remerciements aux étudiants et post-docs qui ont partagé mon bureau quelques semaines ou plusieurs années et qui ont apporté avec eux leur bonne humeur. Merci à **Cyrill, Oumou, Anne** et **Silvia**.

Merci également à **Chantal, Murielle** et aux personnes de **l'UMR 6600** - Biomécanique et Bioingénierie – qui m'ont accueillie et soutenue au cours de mes travaux.

Enfin, ma plus profonde reconnaissance va à **mes proches, mes parents** et **Sylvain**, pour avoir été à mes côtés, pour leur soutien sans faille. Merci pour votre disponibilité et d'avoir eu le courage de me supporter au quotidien, chose pas toujours facile !

A tous, j'espère un jour pouvoir vous rendre tout ce que vous avez fait pour moi.

# TABLE DES MATIÈRES

|  |           |
|--|-----------|
| Glossaire.....   | 8         |
| Liste des Figures.....   | 9         |
| Liste des Tableaux.....  | 13        |
| Introduction.....  | 15        |
| Chapitre I Revue bibliographique.....  | 18        |
| <u>1Relation cellule – substrat : Rôle des protéines d'adhésion dans le comportement cellulaire.....</u> | <u>19</u> |
| 1.1L'adhésion cellulaire.....  | 20        |
| 1.2La morphologie cellulaire et la motilité.....   | 22        |
| 1.3La prolifération et la différenciation.....   | 23        |
| 1.4L'anoïkis.....  | 25        |
| <u>2L'adsorption de protéines et la composition de l'interface.....</u>                                  | <u>26</u> |
| 2.1Hydrophobicité / Hydrophilicité des surfaces.....   | 28        |
| 2.2Charge.....   | 29        |
| 2.3Changements de conformation des protéines adsorbées.....  | 30        |
| 2.4Modulation de l'activité biologique.....  | 31        |
| 2.5Le cas de la Fn.....  | 33        |
| 2.5.1Généralités.....  | 33        |
| 2.5.2Les modules de la Fn.....   | 34        |
| 2.5.3Les interactions Fn – récepteurs cellulaires.....   | 37        |
| <u>3Caractérisation des énergies de surfaces.....</u>  | <u>40</u> |
| 3.1La tension superficielle.....   | 41        |
| 3.2L'énergie interfaciale.....   | 41        |
| 3.3L'énergie libre de surface d'un solide.....   | 42        |
| 3.4Angles de contact.....  | 44        |
| 3.4.1Détermination du travail d'adhésion solide/liquide.....   | 45        |
| 3.4.2Les méthodes de Fowkes et Owens-Wendt.....  | 46        |
| 3.4.3La méthode de van Oss et Good.....  | 47        |
| 3.5Caractérisation des énergies de surface de biomatériaux et de revêtements protéiques.....             | 49        |

|       |   |           |
|-------|---|-----------|
| 4     | La microscopie à force atomique (AFM).....  | 52        |
| 4.1   | Applications de l'AFM en biologie.....  | 52        |
| 4.2   | Principe général de l'AFM.....  | 53        |
| 4.3   | Le cantilever.....  | 56        |
| 4.4   | Les différents types de force.....  | 57        |
| 4.4.1 | Les forces à courte portée.....   | 58        |
| 4.4.2 | Les forces électrostatiques.....  | 59        |
| 4.4.3 | Les forces de van der Waals.....  | 61        |
| 4.5   | Les différents modes d'acquisition.....   | 64        |
| 4.5.1 | Le mode contact.....  | 64        |
| 4.5.2 | Le mode non-contact.....  | 65        |
| 4.5.3 | Le mode Tapping™.....   | 66        |
| 4.6   | Spectroscopie de force (SF).....  | 67        |
|       | <b>Chapitre II Matériels et Méthodes.....</b>   | <b>72</b> |
| 1     | Matériaux.....  | 73        |
| 2     | Les lignées cellulaires.....  | 74        |
| 3     | Evaluation de la prolifération et répartition dans le cycle cellulaire.....               | 75        |
| 4     | Etude de l'apoptose.....  | 76        |
| 4.1   | Annexine-V.....   | 76        |
| 4.2   | Apostain.....   | 77        |
| 5     | Adsorption de Fibronectine (Fn).....  | 78        |
| 6     | Morphologie cellulaire sur revêtement de Fn.....  | 78        |
| 7     | Etudes topographiques par AFM.....  | 79        |
| 8     | Tests ELISA.....  | 80        |
| 9     | Marquage de la Fn à la fluorescéine (fluo-Fn).....  | 81        |
| 9.1   | Préparation de la fluo-Fn.....  | 81        |
| 9.2   | Quantification de la fluo-Fn adsorbée sur les différentes surfaces.....                   | 83        |
| 10    | Mesures des angles de contact.....  | 84        |
| 10.1  | Méthode de la goutte posée et calcul de l'interaction polaire Ips/e.....                  | 84        |
| 10.2  | Méthode de mesure en milieu liquide-liquide et calcul de l'interaction polaire Ips/e..... | 86        |
| 11    | Spectroscopie de force.....   | 90        |
| 11.1  | Greffage de la Fn sur les pointes AFM.....  | 90        |

|   |            |
|---|------------|
| 11.2Acquisitions des forces en mode force-volume.....   | 91         |
| 12Analyse statistique.....  | 93         |
| <b>Chapitre III Résultats.....</b>  | <b>94</b>  |
| 1Morphologie cellulaire sans revêtement de Fn.....  | 95         |
| 2Evaluation de la prolifération .....   | 97         |
| 3Analyse du cycle cellulaire.....   | 99         |
| 4Etude de l'apoptose.....   | 100        |
| 5Morphologie cellulaire sur les matériaux revêtus de Fn.....  | 104        |
| 6Topographie et rugosité des surfaces.....  | 106        |
| 7Quantification et conformation de la Fn adsorbée.....  | 108        |
| 8Quantification de la fluo-Fn adsorbée.....   | 112        |
| 9Angles de contact et évaluation de l'interaction polaire I <sub>ps/e</sub> des biomatériaux à l'état brut par la méthode de la goutte posée..... | 115        |
| 10Mesures d'angles de contact en milieu liquide-liquide.....  | 116        |
| 11Evaluation de l'interaction polaire I <sub>ps/e</sub> des biomatériaux en milieu liquide à l'état brut ou revêtus de Fn .....                   | 119        |
| 12Comparaison des interactions polaires I <sub>ps/e</sub> des surfaces brutes obtenues à sec ou en milieu aqueux.....                             | 121        |
| 13Quantification de l'affinité instantanée de la Fn pour les surfaces par spectroscopie de force.....   | 122        |
| 14Evolution de l'affinité de la Fn pour les surfaces en fonction du temps.....  | 131        |
| <b>Chapitre IV Discussion.....</b>  | <b>134</b> |
| 1Caractérisation biologique des échantillons.....   | 135        |
| 2Analyse des interactions polaires avant et après adsorption de Fn.....   | 138        |
| 3Analyse de l'interaction Fn-surface à long-terme.....  | 140        |
| 4Analyse de l'interaction instantanée Fn-surface .....  | 145        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Conclusions et perspectives.....</b>                   | <b>149</b> |
| <b>Références.....</b>                                    | <b>152</b> |
| <b>Annexe - Publications et présentations orales.....</b> | <b>184</b> |
| <b>Résumés.....</b>                                       | <b>187</b> |



## Glossaire

|                    |   |
|--------------------|---|
| <b>aa</b>          | Acide aminé   |
| <b>AFM</b>         | Microscopie à Force Atomique (" Atomic Force Microscopy ")      |
| <b>Ac</b>          | Anticorps   |
| <b>BSA</b>         | Bovine Serum Albumine   |
| <b>CEL</b>         | Boîtes de Pétri revêtues d'une double-couche de HPMC-CMC        |
| <b>CMC</b>         | Carboxy-Méthyl-Cellulose  |
| <b>EDC</b>         | 1-Ethyl-3-(3-Diméthylaminopropyl) Carbodiimide                  |
| <b>ELISA</b>       | " Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay "                          |
| <b>FITC</b>        | Isothiocyanate de fluorescéine (" Fluorescein IsoThioCyanate ") |
| <b>Fluo-Fn</b>     | Fibronectine couplée à la fluorescéine                          |
| <b>Fn</b>          | Fibronectine  |
| <b>HPMC</b>        | Hydroxy-Propyl-Méthyl-Cellulose                                 |
| <b>KW</b>          | Test statistique non-paramétrique de Kruskal-Wallis             |
| <b>MEC</b>         | Matrice Extra-Cellulaire  |
| <b>MW</b>          | Test statistique non-paramétrique de Mann-Whitney               |
| <b>NHS</b>         | N-HydroxySuccinimide  |
| <b>NS</b>          | Test statistique Non-Significatif ( $p < 0.05$ )                |
| <b>PolyHEMA</b>    | Poly (2-Hydroxy-Ethyl MethAcrylate)                             |
| <b>PS</b>          | Polystyrène de grade bactérien                                  |
| <b>PSt</b>         | Polystyrène traité pour la culture cellulaire                   |
| <b>SF</b>          | Spectroscopie de Force  |
| <b>Thiols COOH</b> | Acide 11-mercaptoundécanoïque                                   |
| <b>Thiols OH</b>   | 11-mercaptoundécanol  |
| <b>Vn</b>          | Vitronectine  |

## Liste des Figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 1 – Orientation des molécules d'eau et des ions en fonction de la charge de la surface.....   | 30 |
| Figure 2 – Conformation des protéines adsorbées.....   | 31 |
| Figure 3 - Structure d'un dimère de Fn.....  | 34 |
| Figure 4 - Représentation schématique des domaines fonctionnels et de l'agencement des modules de type I, II et II portés par un monomère de Fn. ....  | 35 |
| Figure 5 - Représentation en 3D des modules de type I, II et III présents dans une molécule de Fn.....   | 37 |
| Figure 6 - (A) Représentation de l'interface MEC/Cellule. (B) Modèle de reconnaissance des sites RGD et PHSRN de la Fn par une intégrine. (C) Localisation des sites RGD et PHSRN sur les modules FnIII-10 et FnIII-9, respectivement..... | 38 |
| Figure 7 – Forces s'exerçant sur les molécules d'un liquide.....   | 41 |
| Figure 8 - Mesure d'angles de contact par la technique de la goutte posée.   | 44 |
| Figure 9 – (A) Principe général de l'AFM et (B) pointes AFM de type microleviers.....  | 55 |
| Figure 10 - Forces s'exerçant sur la pointe en mode contact.....   | 58 |
| Figure 11 - Schéma de la variation de l'énergie libre avec la séparation des particules selon la théorie de DLVO.....  | 61 |
| Figure 12 – La fonction de Lennard-Jones.....  | 63 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 13 – Techniques couramment utilisées pour la détermination des interactions avec des biomolécules.....                                 | 69  |
| Figure 14 – Courbe de force typique.....  | 70  |
| Figure 15 - Représentation schématique d'un monomère de Fn humaine...   | 80  |
| Figure 16 - Diagramme d'élution de la fluo-Fn.....  | 83  |
| Figure 17 - Mesure d'angle de contact en milieu liquide-liquide.....  | 87  |
| Figure 18 - Schéma du dispositif expérimental pour les mesures d'angles de contact en milieu liquide-liquide.....                             | 89  |
| Figure 19 - Schéma des pointes utilisées pour la spectroscopie de force.....  | 91  |
| Figure 20 – Exemple d'acquisition de courbes de force en mode force – volume.....   | 93  |
| Figure 21 - Morphologie des trois lignées cellulaires sur CEL, PolyHEMA et PSt après 24h de culture sans Fn (objectif x20).....               | 96  |
| Figure 22 - Prolifération cellulaire sur CEL, PolyHEMA et PSt après 24 et 48h.....  | 98  |
| Figure 23 - Marquage à l'Annexine-V.....  | 102 |
| Figure 24 - Morphologie cellulaire des pré-ostéoblastes MC-3T3, avec ou sans pré-adsorption de Fn (0, 2 et 50 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> )..... | 105 |
| Figure 25 - Images AFM acquises sur CEL, PolyHEMA, PSt et PS avec ou sans pré-adsorption de Fn (0, 2 et 50 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> ).....    | 107 |
| Figure 26 - Quantification de la Fn adsorbée sur CEL, PolyHEMA, PSt et PS et caractérisation de sa conformation par test ELISA.....           | 109 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 27 - Adsorption de fluo-Fn sur les différents matériaux et désorption selon le protocole classique.....  | 113 |
| Figure 28 – Comparaison protocole classique et protocole type-ELISA.....  | 114 |
| Figure 29 - Dépôt de gouttes d'octane en milieu aqueux sur les différentes surfaces avant (A) et après (B) adsorption de Fn.....  | 118 |
| Figure 30 – Courbes de force typiques obtenues pour les pointes –Fn, –COOH et –OH sur chaque matériau.....  | 124 |
| Figure 31 - Mesure des forces d'adhésion entre les différents matériaux et les pointes AFM greffées Fn, COOH ou OH.....   | 126 |
| Figure 32 - Représentation graphique des forces d'adhésion.....   | 127 |
| Figure 33 - Mesure des forces d'adhésion entre les différents matériaux et les pointes greffées Fn avant ou après trypsination.....   | 129 |
| Figure 34 - Mesure des forces d'adhésion entre les différents matériaux et les pointes greffées Fn avec des temps de contact entre la pointe et la surface variant de 0 à 1000ms.....             | 132 |
| Figure 35 - Représentation des fréquences d'adhésion entre les différents matériaux et les pointes greffées Fn avec des temps de contact entre la pointe et la surface variant de 0 à 1000ms..... | 133 |
| Figure 36 - Corrélation inverse entre l'interaction polaire des matériaux bruts et la densité de fluo-Fn adsorbée (protocole classique, cf Chapitre II pp.77-78).....                             | 140 |
| Figure 37 – Comparaison des interactions instantanées et à long-terme de la Fn pour les surfaces.....   | 147 |

**Figure 38 – Corrélation inverse entre l’interaction polaire des matériaux bruts et la force d’adhésion.....148**

## Liste des Tableaux

|   |     |
|---|-----|
| Tableau 1- Forces jouant un rôle crucial à l'échelle moléculaire.....   | 57  |
| Tableau 2 – Exemples de valeurs de la constante de Hamaker en fonction du système étudié (Meurk et al. 1997).....   | 64  |
| Tableau 3 - ELISA – Ac primaires utilisés.....  | 80  |
| Tableau 4 - ELISA – Ac secondaires utilisés.....  | 81  |
| Tableau 5 – Préparation du réactif de Bradford.....   | 82  |
| Tableau 6 - Composantes des tensions de surface des différents liquides utilisés pour l'étude (van Oss 1994).....   | 85  |
| Tableau 7 - Répartition des trois lignées dans le cycle cellulaire sur les trois supports de culture.....   | 100 |
| Tableau 8 - Détection de l'apoptose tardive par immunomarquage Apostain. ....   | 104 |
| Tableau 9 – Valeurs de $R_{rms}$ pour chaque matériau revêtu ou non de Fn (0, 2 et $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).....   | 108 |
| Tableau 10 – Statistiques relatives aux résultats des ELISA.....  | 111 |
| Tableau 11 - Angles de contact (diiodométhane et eau Ultrapure <sup>TM</sup> ), composantes dispersives de l'énergie libre de surface $\gamma_{sd}$ et interactions polaires $I_{ps}$ / e déterminés sur les différents substrats, à sec..... | 115 |
| Tableau 12 - Angles de contact octane/eau sur les différents substrats avec ou sans pré-adsorption de Fn ( $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).....  | 119 |

|   |     |
|---|-----|
| Tableau 13 - Interactions polaires du travail d'adhésion (Ips/e) entre la phase aqueuse et les différents substrats, avec ou sans pré-adsorption de Fn (2µg.mL-1).....  | 121 |
| Tableau 14 - Interactions polaires du travail d'adhésion (Ips/e) entre l'eau et les différents substrats bruts obtenues par la méthode de la goutte posée (à sec) ou par la méthode en milieu liquide-liquide (surfaces immergées)..... | 121 |
| Tableau 15 – Tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus pour CEL.....   | 150 |

# Introduction

---



Mon sujet de thèse s'inscrit dans le " plan pluri formation Nanobiotechnologies " (ppf) de l'Université de Technologie de Compiègne. Pour mener à bien ce travail, une étroite collaboration a été mise en place entre deux départements de l'université : le Génie Biologique (et plus particulièrement l'UMR CNRS 6600) et le Génie des Procédés Industriels. Ce projet a pour objectif la caractérisation biologique et physico-chimique d'un support original pour culture cellulaire conçu par l'UMR CNRS 6600 en collaboration avec le Centre de Transfert de Technologie du Mans et l'entreprise Statice Santé. Nous avons mis au point des boîtes pour culture cellulaire anti-adhésives bioactives en enduisant de carboxyméthylcellulose (CMC) des boîtes de Pétri standard. Ce matériau innovant est défavorable à la prolifération cellulaire et possède la capacité d'induire la différenciation et/ou l'apoptose.

Les surfaces des biomatériaux sont déterminantes pour gérer l'activité fonctionnelle des cellules adhérentes cultivées à leur contact. Les propriétés de surface telles que l'hydrophobicité, l'hydrophilicité, la charge ou la rugosité des matériaux vont conditionner l'adsorption des protéines présentes dans l'environnement physiologique. Celles-ci influenceront la morphologie et les orientations fonctionnelles des cellules adhérentes. Ce processus complexe correspond en réalité à l'étude des interactions matériau – protéines – cellules. Le recours aux deux approches complémentaires, physico-chimie et biologie, est essentiel pour cerner les différents aspects du problème et mieux comprendre les mécanismes d'interactions mis en jeu aux interfaces.

Aussi, le but de ce projet transdisciplinaire est-il de corréler les propriétés de surface aussi bien à une échelle macro qu'à une échelle nanométrique (morphologie et physico-chimie) avec les activations biologiques. Nous avons choisi de comparer le matériau cellulosique (CEL) à trois autres supports : le poly(2-hydroxy-éthyl méthacrylate) (PolyHEMA) couramment utilisé pour la formation de sphéroïdes, le polystyrène traité pour la culture cellulaire (PSt) et le polystyrène de grade bactérien (PS), matériaux largement employés comme substrats de référence. D'un point de vue biologique, l'induction de l'apoptose par ces différents biomatériaux est évaluée sur des cellules adhérentes cancéreuses (cellules de mélanomes murins B16F10) et sur des cellules adhérentes saines (pré-ostéoblastes murins MC-3T3 et fibroblastes

murins Swiss 3T3). La caractérisation physico-chimique des surfaces s'articule autour du calcul des interactions polaires développées par les substrats à partir de mesures d'angles de contact et autour de l'utilisation de la microscopie à force atomique. Nous avons également évalué l'interaction d'une protéine majeure de la matrice extracellulaire (MEC) – la fibronectine (Fn) – avec les différentes surfaces. Cette glycoprotéine est notamment reconnue pour conduire à l'adhésion, l'étalement, la prolifération et la survie de cellules adhérentes. Par une approche pluridisciplinaire (ELISA, Fn fluorescente, angles de contact, spectroscopie de force), nous avons caractérisé la capacité de cette protéine à interagir avec les matériaux.

Dans ce contexte, le travail présenté dans ce mémoire s'organise autour de cinq chapitres. Après une revue de l'état de l'art, la méthodologie employée pour la réalisation de cette étude est décrite et suivie par une description et une discussion des résultats. Enfin, la dernière partie est consacrée à la présentation des conclusions générales avec une proposition de perspectives pour continuer ces travaux.

# Chapitre I Revue bibliographique

---

# 1 Relation cellule – substrat : Rôle des protéines d'adhésion dans le comportement cellulaire

La régulation de la signalisation et de certaines fonctions spécifiques des cellules adhérentes passe par les signaux engendrés par la MEC. Les interactions des cellules avec les matériaux dépendent de nombreuses propriétés physico-chimiques telles que la rugosité, l'hydrophilicité ou la charge des surfaces. Ces caractères physico-chimiques influencent et modulent la réponse cellulaire vis-à-vis des biomatériaux, aussi bien au regard de la biocompatibilité de dispositifs médicaux implantables, la fonctionnalité de systèmes biohybrides ou encore la performance de supports pour cultures cellulaires (Bottaro *et al.* 2002; Shin *et al.* 2003; Rosso *et al.* 2004; Datta *et al.* 2005; Lutolf and Hubbell 2005). Les orientations fonctionnelles telles que la prolifération, la différenciation ou la mort programmée sont en relation directe avec la géométrie adoptée par les cellules adhérentes (Chen *et al.* 1998; Chen *et al.* 1999a). La reconnaissance et l'attachement à la MEC par des intégrines – récepteurs cellulaires - permettent l'organisation du cytosquelette et la régulation de nombreux signaux cytoplasmiques de transduction. La perte de cette reconnaissance affecte la survie des cellules et induit une forme d'apoptose dans la plupart des cellules non-transformées mieux connue sous le nom d'anoïkis (Frisch and Francis 1994; Wang 2004; Zhan *et al.* 2004; Gilmore 2005; Reddig and Juliano 2005).

Pour la plupart des types cellulaires, l'adhésion à la MEC est donc essentielle à leur survie (Folkman and Moscona 1978; Ben-Ze'ev *et al.* 1980; Ruoslahti and Reed 1994). De plus, la croissance et l'expression du phénotype sont régulés en partie par la capacité des cellules à adopter une morphologie appropriée (Folkman and Moscona 1978; Ben-Ze'ev *et al.* 1980; Singhvi *et al.* 1994; Takebe *et al.* 2003; McBeath *et al.* 2004). Comprendre le comportement des cellules au contact de différents supports est un enjeu majeur afin de développer des matériaux synthétiques en évitant des effets adverses et d'induire les réponses cellulaires désirées.

Dans le domaine des biomatériaux, la CMC est couramment utilisée en tant que revêtement anti-adhésif pour des plaques de renfort abdominal (Beck 1997;

Buckenmaier *et al.* 2000; Szabo *et al.* 2000; van 't Riet *et al.* 2003), des pansements (Guest and Ruiz 2005; Guest *et al.* 2005; Caruso *et al.* 2006; Ravenscroft *et al.* 2006), mais également en tant qu'hydrogel de remplissage de prothèses mammaires (Cicchetti *et al.* 2002; Valeriani *et al.* 2002) ou encore en tant que matrice vecteur de médicaments (Wu *et al.* 1998; Barbucci *et al.* 2004; Chiumiento *et al.* 2006; Liu *et al.* 2007). De précédentes études ont montré que des boîtes de Pétri en polystyrène revêtues d'une double couche d'HMPC-CMC représentaient un modèle anti-adhésif valable pour l'étude de mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions cellules/matériaux, cellules/cellules et la régulation de la différenciation (Hindie *et al.* 2005; Hindie *et al.* 2006).

### 1.1 L'adhésion cellulaire

Les cellules adhérentes, dans leur environnement naturel, sont accrochées aux protéines de la MEC. De façon similaire, dans des conditions *in vitro*, l'attachement des cellules est médié par les protéines d'adhésion contenues dans le milieu de culture (additionné de sérum) (Grinnell and Feld 1982; Hayman *et al.* 1985). L'attachement et l'étalement des cellules peuvent aussi survenir sans les protéines du sérum grâce aux propriétés de surface des matériaux ou également par la synthèse protéique endogène des cellules (Schneider and Burridge 1994; Gronowicz and McCarthy 1996).

*In vitro*, l'adhésion et l'étalement des cellules ostéoblastiques (et de nombreux autres types cellulaires), dépendent en premier lieu de l'adsorption de vitronectine (Vn) ou de Fn sur les matériaux, y compris sur le polystyrène traité pour la culture cellulaire, le titane, l'acier inoxydable et l'hydroxyapatite (Steele *et al.* 1993b; Howlett *et al.* 1994; Kilpadi *et al.* 2001). Ainsi, la capacité des matériaux à adsorber les protéines adhésives du sérum dans une conformation favorable va déterminer leur aptitude à induire l'adhésion et l'étalement (Steele *et al.* 1993a; Steele *et al.* 1995) : cet aspect est fondamental dans la biocompatibilité des surfaces. L'hydroxyapatite, par rapport au titane et à l'acier, en est un exemple pertinent en favorisant à la fois l'adsorption de Vn et de Fn. Cette adsorption conjointe accroît significativement l'attachement des ostéoblastes au matériau (Kilpadi *et al.* 2001).

D'autre part, les protéines d'adhésion peuvent masquer des surfaces initialement défavorables à l'adhésion cellulaire (Ertel *et al.* 1994). Les ostéoblastes en culture montrent une adhésion privilégiée si la surface est revêtue de protéines adhésives (Vn ou Fn) ou si le milieu de culture en est supplémenté (Schneider and Burridge 1994; Degasne *et al.* 1999).

L'interaction primaire entre les cellules adhérentes et les protéines d'adhésion se produit *via* les récepteurs intégrines (hétérodimères présents au niveau de la membrane cellulaire). Cela a été notamment démontré par la diminution significative de l'attachement des cellules après l'introduction d'anticorps (Ac) se liant aux intégrines (Grzesik and Robey 1994; Degasne *et al.* 1999). D'autres auteurs (Sinha and Tuan 1996) ont montré que la différence d'expression des intégrines observée sur divers matériaux induit des variations dans l'attachement cellulaire. Les intégrines sont impliquées dans la signalisation intracellulaire (transduction de signaux de la MEC vers la cellule) et par ce biais influencent de nombreuses fonctions cellulaires parmi lesquelles nous pouvons citer la migration, la différenciation et la survie (Schwartz *et al.* 1995; Grzesik 1997; Damsky and Ilic 2002).

Même si les états initiaux de la surface, des cellules et de l'interface sont déterminants, la nature dynamique du système doit être prise en compte. Les cellules, en sécrétant de la Fn (Grinnell and Feld 1982; Bagambisa *et al.* 1994; Chou *et al.* 1995) ou en la remaniant, peuvent modifier leur environnement et leur mécanismes d'adhésion. Il est bien connu que les cellules s'adaptent à leur environnement immédiat. Il a en effet été montré que des fibroblastes non-adhérents réduisaient leur production et/ou sécrétion de Fn ainsi que l'expression de leur principal récepteur membranaire : les intégrines  $\alpha_5\beta_1$  (Dalton *et al.* 1992). Inversement, la production de collagène d'ostéoblastes est augmentée sur des surfaces rugueuses (Martin *et al.* 1995). En fonction des ligands disponibles et de leur état de différenciation, les cellules peuvent également s'adapter en modifiant les intégrines exprimées (Singer *et al.* 1988; Clover *et al.* 1992; Hormia and Kononen 1994; Schneider and Burridge 1994; Siebers *et al.* 2005). La régulation de l'expression des intégrines à la surface des cellules peut refléter la nature des

protéines d'adhésion adsorbées sur les matériaux étudiés et ainsi, souligner certaines propriétés de surface (Burrige and Fath 1989). Néanmoins, il est nécessaire de prendre en compte le fait que les cellules expriment différemment leurs intégrines en fonction de leur situation *in vitro* ou *in vivo* (Clover *et al.* 1992).

## **1.2 *La morphologie cellulaire et la motilité***

L'étalement des cellules est un processus étroitement lié au phénomène d'adhésion et, en principe, implique les mêmes protéines de la MEC. En plus de leurs effets sur l'attachement des cellules, la Vn et la Fn sont indispensables à la formation des points focaux et à l'organisation de l'architecture interne de la cellule (Schneider and Burrige 1994). Massia et Hubbell (Massia and Hubbell 1991) ont estimé à 140nm (voire moins) l'espacement nécessaire entre deux ligands pour que de telles structures se forment. La réponse des cellules peut donc varier en fonction de la densité de ligands disponibles, cette densité étant influencée par la topographie des surfaces (Ranucci and Moghe 2001). Leur distribution et la disponibilité des sites de liaison sur une surface sont des facteurs primordiaux quant à l'adhésion, l'étalement et les fonctions mises en place ultérieurement (Garcia *et al.* 1999; Rezanian and Healy 1999; Rezanian and Healy 2000).

En plus des adaptations liées à l'expression des intégrines ou à la production de Fn, des changements progressifs dans les mécanismes d'ancrage sont fréquemment observés comme la réorganisation du cytosquelette et de la MEC sur laquelle les cellules sont accrochées (Grinnell 1986; Singer *et al.* 1988; Altankov and Groth 1994; Hormia and Kononen 1994; van Kooten and von Recum 1999). Lorsque les cellules s'étalent, les forces contractiles développées appliquent une tension sur la MEC ; ces tensions pouvant être suffisantes pour détacher les protéines adsorbées à la surface du biomatériau. Il a été effectivement observé que des fibroblastes étaient capables de retirer la Fn pré-adsorbée sur une lame de verre (van Kooten and von Recum 1999). Bien que ce détachement pourrait perturber l'adhésion, il semblerait que les cellules réorganisent les protéines en un assemblage de fibrilles (Grinnell 1986; Altankov *et al.* 1996) suggérant ainsi que la force d'adhésion présente entre les protéines et la surface ne doit pas être trop importante afin que les cellules

conservent une activité normale (Altankov and Groth 1994). A l'échelle moléculaire, la motilité des cellules est donc directement liée à une réorganisation moléculaire accompagnée également de réactions protéolytiques avec, essentiellement, l'intervention des métalloprotéases et des protéines de la famille des activateurs du plasminogène (Mutsaers *et al.* 1997; Shapiro 1998).

La motilité cellulaire (y compris la migration) dépend de la nature de l'adhésion des cellules à la surface. Des ligands pro-adhésifs sont nécessaires à cette motilité et peuvent fournir des signaux haptotactiques<sup>1</sup> (Leavesley *et al.* 1992; Dalton *et al.* 1998; Yang *et al.* 2003), avec un pic de migration observé pour concentrations intermédiaires de ligands à la surface (DiMilla *et al.* 1993). Webb *et al.* (Webb *et al.* 2000) ont montré que la migration des cellules est inversement corrélée à leur étalement. Il apparaît alors que la motilité maximale nécessite une force d'adhésion tout juste suffisante pour maintenir les cellules en contact avec la surface.

### *1.3 La prolifération et la différenciation*

Il est bien connu que l'adhésion et la morphologie influencent les activités cellulaires telles que la prolifération et la différenciation (Ingber 2003). Très tôt, Folkman et Moscona (Folkman and Moscona 1978) ont montré que la chimie de surface avait un impact sur la forme des cellules et leur croissance. Ces effets ont été depuis confirmés en concevant des surfaces de chimie contrôlée qui conduisent les cellules vers une morphologie bien définie (Singhvi *et al.* 1994; Chen *et al.* 1997; Dike *et al.* 1999; Brock *et al.* 2003). La "dédiérenciation" des chondrocytes en culture 2-D est également largement décrite et dépend directement de la morphologie adoptée par les cellules (Benya and Shaffer 1982).

En ce qui concerne les ostéoblastes et les protéines adsorbées, la Fn et ses récepteurs deviennent déterminants à mesure que les cellules se différencient (Damsky *et al.* 1997; Globus *et al.* 1998; Garcia *et al.* 1999; Stephansson *et al.* 2002). Ces cellules (ainsi que de nombreux autres types) produisent leur propre Fn. En parallèle, Altankov et Groth (Altankov and Groth 1994) proposent que la

---

<sup>1</sup> L'haptotaxie est induite par un gradient de protéines d'adhésion fixées dans la MEC ou sur un substrat.



réorganisation de la Fn adsorbée sur les surfaces soit requise pour la prolifération des fibroblastes.

La liaison de la Fn par la sous-unité  $\beta_1$  des intégrines (particulièrement le dimère  $\alpha_5\beta_1$ ) a un rôle prédominant dans la maturation des cellules précurseurs vers un phénotype de cellule ostéoblastique différenciée (Garcia *et al.* 1999; Gronthos *et al.* 2001; Stephansson *et al.* 2002). Cette liaison est notamment nécessaire pour la minéralisation de la matrice osseuse (Moursi *et al.* 1997; Gronthos *et al.* 2001; Schneider *et al.* 2001). En plus de la Fn, cette sous-unité peut se lier au collagène ou à la laminine (Gronthos *et al.* 2001).

La liaison Vn- $\alpha_v\beta_3$  apparaît aussi être impliquée dans la minéralisation, comme indiqué par l'inhibition et le blocage du récepteur  $\alpha_v\beta_3$  (Schneider *et al.* 2001). De plus, ce dimère est impliqué dans les réponses de cellules ostéoblastiques - de l'étalement à la minéralisation - lorsqu'elles sont mises en culture sur un substrat synthétique riche en motifs Arginine – Glycine - Acide Aspartique (RGD) (Healy *et al.* 1999). Contrairement aux résultats de Schneider *et al.* (Schneider *et al.* 2001), une équipe a montré qu'un niveau d'expression réduit de la sous-unité  $\alpha_v$  était corrélé à une faible adhésion des cellules d'ostéosarcome humain SaOS-2 mais favorisait la différenciation (Koistinen *et al.* 1999). Ces observations sont en accord avec une étude qui a démontré que des cellules ostéoblastiques transgéniques qui surexprimaient l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  présentaient une prolifération accrue accompagnée d'une différenciation réduite (Cheng *et al.* 2001). Ces cellules transgéniques se couplait peu à la Fn suggérant l'implication de cette protéine et de la sous-unité  $\beta_1$  dans la différenciation des cellules ostéoblastiques. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est aussi un médiateur clé dans l'angiogénèse (Horton 1997) et l'adhésion à la MEC des ostéoclastes (Reinholt *et al.* 1990; Horton 1997). Cette intégrine possède donc un rôle clé dans de nombreux mécanismes ; citons la réparation tissulaire ou le remodelage osseux parmi tant d'autres.

Au regard de la motilité cellulaire, l'adhésion joue un rôle critique dans la différenciation. Une force d'adhésion trop importante peut inhiber les activités cellulaires. Qiu *et al.* (Qiu *et al.* 1998) ont montré que sur des surfaces chargées

positivement, les cellules stromales s'attachaient significativement plus mais elles ne possédaient pas la capacité de s'étaler ni de se différencier. En outre, ces observations soulignent que, ne prendre en compte que le critère d'adhésion n'est pas un indicateur adéquat de biocompatibilité quand une fonction spécifique est attendue.

#### *1.4 L'anoïkis*

Le comportement et le devenir d'une cellule résultent de son environnement immédiat. La survie des cellules dépend en permanence de leur capacité à interagir avec d'autres cellules et/ou avec la MEC (Frisch and Francis 1994). En l'absence de telles interactions et des activités intracellulaires qu'elles induisent, se déclenche un processus d'autodestruction, la mort cellulaire programmée ou apoptose (Frisch and Francis 1994). Les modalités de différenciation des cellules déterminent la nature et la fréquence des interactions moléculaires indispensables à leur survie, et, en conséquence, leur localisation. L'anoïkis est une forme particulière d'apoptose qui se produit lors du détachement de cellules adhérentes de leur MEC en engageant leurs intégrines (Frisch and Ruoslahti 1997; Chiarugi 2008). Des études plus récentes ont montré que l'anoïkis pouvait également se produire lors de la rupture de contact cellule-cellule (Frisch and Screatton 2001; Grossmann 2002). Tout détachement de leur point d'ancrage provoque un phénomène d'apoptose, nommé anoïkis, un terme grec qui signifie " sans domicile ". L'anoïkis protège à la fois contre la prolifération ectopique des cellules (altération de l'architecture cellulaire) et contre leur migration (événements initiateurs de l'invasion et de la métastase).

Maîtriser la quantité et/ou la conformation des protéines adhésives adsorbées à la surfaces de biomatériaux devient ainsi un enjeu majeur afin d'induire les cellules vers une réponse appropriée : la survie, la prolifération, la différenciation ou l'anoïkis.

## 2 L'adsorption de protéines et la composition de l'interface

L'activité de surface des protéines est très élevée ce qui explique leur forte affinité pour les interfaces (Brash 1983; Brash and Horbett 1995; Norde and Haynes 1995). L'adsorption initiale d'une protéine sur une surface se produit très rapidement (Baier and Dutton 1969) et évite les interactions directes qui pourraient se produire entre les cellules et la surface. Nygren *et al.* (Nygren 1996; Nygren *et al.* 1997) ont montré une adsorption significative de protéines, ainsi que l'adhésion de plaquettes, après avoir immergé des matériaux dans du sang total pendant seulement 5s. De la même manière, Horbett et Schway (Horbett and Schway 1988) ont observé que des surfaces exposées à du sérum entre 10 secondes et 90 minutes induisaient, chez des fibroblastes, un étalement similaire.

L'adsorption protéique peut être favorisée ou au contraire inhibée par des changements enthalpiques ou entropiques du système surface / phase aqueuse / protéines. Ces changements peuvent être résumés en trois points (Haynes and Norde 1994) :

- L'état d'hydratation des protéines et des surfaces
- La redistribution des charges à l'interface
- Les changements de conformations de la protéine

L'importance relative de ces trois facteurs dépend non seulement de la nature de la protéine mais également du type de surface et du solvant.

Dans l'hypothèse d'une adsorption en monocouche, une vision simpliste mais néanmoins correcte montre que la quantité de protéines adsorbées à la surface augmente avec le temps (Pitt *et al.* 1989; McFarland *et al.* 1999; Serro *et al.* 1999). Puis, la vitesse d'adsorption diminue à mesure que le nombre de sites de liaison disponibles s'amointrit (Horbett 1996; Wertz and Santore 1999), l'adsorption devenant progressivement dépendante de l'affinité protéine – surface. Cependant, il n'est pas possible, d'après ces données, de prédire la fonctionnalité et la bioactivité des protéines adsorbées.

La compétition des protéines pendant l'adsorption sur les surfaces représente un facteur clé dans le comportement cellulaire ultérieur. L'adsorption des protéines va dépendre de leur concentration dans le plasma ou le sérum, du nombre de sites de liaison et de leur affinité respective pour la surface considérée (Slack and Horbett 1988; Fabrizius-Homan and Cooper 1991b; Horbett 1996). Prenons comme exemple du plasma contenant de la Vn. Cette solution est mise en contact avec différentes surfaces polymériques (polyéthylène, silicone, Téflon, polyuréthane); de nombreuses protéines sont adsorbées sur les surfaces et elles s'enrichissent particulièrement en Vn : au final, la quantité de Vn à la surface est augmentée par rapport à la concentration de Vn de la solution d'origine (Bale *et al.* 1989; Fabrizius-Homan and Cooper 1991a). Pour le cas de l'albumine ou du fibrinogène, leurs concentrations plasmatiques étant initialement importantes, les quantités de ces deux protéines retrouvées adsorbées sur les surfaces sont également très importantes (Fabrizius-Homan and Cooper 1991a).

Au cours du temps, et en l'absence d'interactions cellulaires, la composition de la couche adsorbée change à mesure que des protéines telles que l'albumine sont déplacées au profit de protéines qui ont une forte affinité avec les surfaces ; ce phénomène est mieux connu sous le nom d' " effet Vroman " (Vroman and Adams 1986; Green *et al.* 1999; Wertz and Santore 1999). Le changement de la composition de la couche protéique ne consiste pas en une simple désorption (Grinnell 1986; Horbett 1996) de molécules mais provient plutôt de leur déplacement. Ce phénomène est particulièrement prononcé sur les surfaces hydrophiles (Arai and Norde 1990a; Arai and Norde 1990b) où les protéines sont faiblement accrochées au support (Brash and Horbett 1995). Les compétitions et les déplacements sont apparents pour des solutions diluées, dans lesquelles l'adsorption d'un type de molécule montre un pic d'adsorption à une concentration sérique/plasmatique intermédiaire (Grinnell and Feld 1982; Horbett and Schway 1988; Green *et al.* 1999). Encore une fois, la Vn est un cas particulier. Contrairement au fibrinogène ou à la Fn où le " pic de Vroman " est obtenu pour des solutions plasmatiques diluées entre 0.01 et 10% (v/v), la quantité de Vn adsorbée aux surfaces continue d'augmenter quelle que soit la concentration plasmatique considérée (Fabrizius-Homan and Cooper 1991a). Les auteurs suggèrent alors que la Vn présente une plus grande résistance aux déplacements ; hypothèse confirmée par le fait que autant de Vn que

de fibrinogène est adsorbé sur des surfaces exposées pendant 2 heures à une solution de plasma pur (Fabrizius-Homan and Cooper 1991a).

## *2.1 Hydrophobicité / Hydrophilicité des surfaces*

Un des aspects les plus étudiés et des plus importants est la variation d'adsorption des protéines en fonction du caractère hydrophile ou hydrophobe de la surface. Comme l'eau est un solvant polaire, elle n'interagit pas ou peu avec les composés ou les surfaces non polaires. Les molécules d'eau se structurent localement au contact des surfaces non polaires (Vogler 1998) (Figure 1). Cela a pour effet d'augmenter l'ordre du système et de baisser l'entropie.

Les interactions variées entre les acides aminés (aa) basiques, acides, polaires et apolaires d'une protéine et l'eau vont conditionner sa structure dans le solvant, positionnant les résidus hydrophobes vers l'intérieur de la protéine pour éviter tout contact avec l'eau (Norde 1986; Horbett 1996). Cependant, Haynes et Norde (Haynes and Norde 1994) ont estimé que 40 à 50% de la surface exposée des petites protéines était composée de groupements non polaires. Afin qu'une protéine s'adsorbe sur une surface, les deux entités doivent être (au moins en partie) déshydratées (Horbett 1996; Norde and Giacomelli 2000) pour obtenir ainsi un système thermodynamique favorable (Norde 1986; Haynes and Norde 1994). Inversement, il apparaît que le déplacement des molécules d'eau à la surface d'un matériau hydrophile représente une barrière d'énergie défavorable à l'adsorption de protéines (Vogler 1998). Une équipe (Hanein *et al.* 1993) a effectivement démontré que peu (ou pas) de protéines s'adsorbent à la surface des matériaux hydrophiles car ils sont recouverts d'une pellicule d'eau (Figure 1).

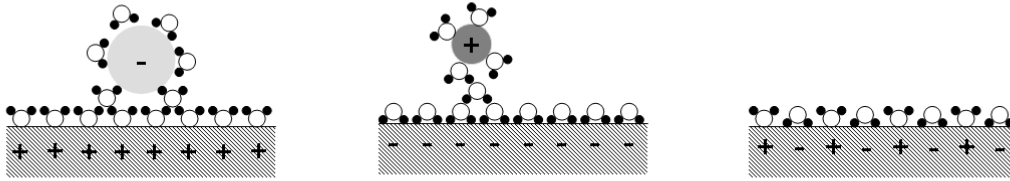
Toutefois, nous allons montrer que l'adsorption protéique sur des matériaux hydrophiles est possible grâce à la présence de charges et aux changements de conformation des protéines. Les surfaces hydrophobes sont connues pour induire l'adsorption d'une plus grande quantité de protéines par rapport à des surfaces hydrophiles : l'étalement de protéines sur des matériaux hydrophobes masquera l'accessibilité de la surface au solvant (Jönsson *et al.* 1982; Absolom *et al.* 1987;

MacDonald *et al.* 2002). Cependant, ces résultats ne sont pas universels car quelques protéines ont une affinité prononcée pour les surfaces chargées (Elwing *et al.* 1995). En effet, certaines études mettent en évidence des surfaces hydrophobes et hydrophiles sont capables de provoquer l'adsorption de quantités équivalentes d'un type de protéines en l'absence de phénomènes compétitifs (exemple : adsorption de Vn sur du polystyrène de grade bactérien ou sur du polystyrène traité pour la culture cellulaire, (Underwood *et al.* 1993)). Il est cependant indispensable de noter que la plupart des protocoles expérimentaux font appel à de nombreuses étapes de rinçages (Margel *et al.* 1993) – source de désorption - et il devient impossible de détecter les protéines qui étaient initialement peu accrochées à la surface (Brash and Horbett 1995).

## 2.2 Charge

Il est assez intuitif de penser que des corps possédant des charges opposées vont être attirés mutuellement. L'adsorption de protéines est conduite par des événements similaires mais cela devient plus compliqué lorsqu'il s'agit d'étudier des protéines en solution aqueuse : les charges de la protéine sont en partie masquées par les molécules d'eau (Hanein *et al.* 1993), modulées par le pH et/ou écrantées par des ions (Haynes and Norde 1994; Brash and Horbett 1995). La charge d'une surface est minimisée à son point isoélectrique ; un pH inférieur conduit à l'acquisition d'une charge positive et *vice versa*. La présence d'ions en solution tels que  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cl}^-$  mène à la formation d'une couche sur les molécules et surfaces chargées (Figure 1). La composition de cette couche est influencée directement par les charges présentes à la surface des molécules et des matériaux (Israelachvili and Wennerstrom 1996). Même si les interactions peuvent subvenir à l'échelle atomique, la charge globale des protéines et des surfaces domine sur l'attraction électrostatique (Shelton *et al.* 1988; Haynes and Norde 1994; Norde and Haynes 1995; Horbett 1996). L'adsorption maximale survient en général au pH pour lequel la charge nette est minimisée (Haynes and Norde 1994). L'adsorption des protéines sur une surface est également influencée par les contre-ions (Norde 1986) ; par exemple, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont reconnus pour être impliqués dans certains processus d'adsorption (Ellingsen 1991; Underwood *et al.* 1993; Serro *et al.* 1999),

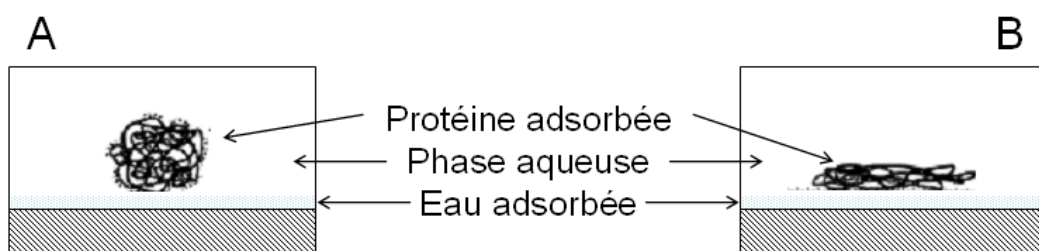
citons comme exemple l'intervention des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mécanismes d'adsorption de l'albumine et des immunoglobulines G sur des surfaces de  $\text{TiO}_2$  et d'hydroxyapatite.



**Figure 1 – Orientation des molécules d'eau et des ions en fonction de la charge de la surface.**

### *2.3 Changements de conformation des protéines adsorbées*

L'entropie du système peut également varier par des changements de conformation des protéines adsorbées (Horbett 1996; Norde and Giacomelli 2000). Les réarrangements de la protéine permettent d'augmenter son aire de contact avec la surface. De tels changements induisent l'augmentation de la force d'adhésion de la protéine à la surface avec le temps (Bohnert and Horbett 1986; Rapoza and Horbett 1989; Slack and Horbett 1989). Ces modifications structurales sont directement reliées à la réversibilité de l'adsorption et à l'éluion de la protéine (Rapoza and Horbett 1990; Fabrizius-Homan *et al.* 1992; Norde and Giacomelli 2000). De plus, la flexibilité et la stabilité de la conformation de la protéine contribuent à sa cinétique d'adsorption (Arai and Norde 1990a; Arai and Norde 1990b).



## Figure 2 – Conformation des protéines adsorbées.

A – Protéine dans sa conformation native. B – Protéine dénaturée

Par rapport à l'état d'hydratation et la charge, le changement de conformation de la protéine est le facteur le plus influent quant à son adsorption sur une surface (Figure 2). De nombreuses études utilisant des protéines et des surfaces variées suggèrent que, au moins un changement de conformation de la protéine se produit lors de son adsorption (Norde and Giacomelli 2000; Giacomelli and Norde 2001). Ces expériences démontrent en outre que les protéines adsorbées ne sont pas complètement dénaturées, du moins complètement étalées. La capacité d'une protéine à retrouver sa conformation originelle après désorption dépend principalement de l'hydrophobicité de la surface et des forces de stabilisation internes développées au sein de la protéine (Norde and Giacomelli 1999) telles que les liaisons hydrogène, hydrophobes, ioniques ou de van der Waals. Le recouvrement d'une surface dépendra en partie des phénomènes de compétition entre les protéines, de leur étalement, de la force de liaison entre la surface et la protéine et, enfin, de leur taux de désorption (Norde and Giacomelli 1999).

### *2.4 Modulation de l'activité biologique*

La fonction d'une protéine est gouvernée par des régions spécifiques. L'activité de protéines adsorbées sur une surface va donc dépendre de son orientation et/ou de sa conformation. En concevant des surfaces chargées de chimie contrôlée, Liu *et al.* (Liu *et al.* 2005) ont maîtrisé l'orientation de l'ostéopontine adsorbée et ont pu ainsi moduler l'adhésion cellulaire.

De nombreuses études reportent la fonction réduite ou améliorée de protéines suite à l'adsorption sur une surface ; le changement de conformation de ces protéines en est la cause la plus probable. La modulation de cette activité par l'adsorption a été détaillée par Horbett (Horbett 1994; Horbett 2003) qui a également discuté la force de liaison de la protéine à la surface comme autre mécanisme possible. D'autres travaux ont démontré que les revêtements de Fn sur du polystyrène traité pour la culture cellulaire augmentaient l'adhésion (Steele *et al.*



1993b) et la différenciation (Stephansson *et al.* 2002) de cellules ostéoblastiques par rapport à des quantités similaires de Fn adsorbée sur du polystyrène hydrophobe. Alors que certains changements de conformation de la Fn peuvent réduire sa fonctionnalité, d'autres peuvent au contraire l'améliorer : sa forme soluble réduit sa capacité à se lier aux cellules, suggérant ainsi le besoin d'une " activation par la surface " (Klebe *et al.* 1981; Akiyama and Yamada 1987). De même, la liaison des intégrines à la Vn est facilitée par sa dénaturation partielle et son auto-assemblage (Seiffert and Smith 1997). L'activation du fibrinogène par les surfaces est certainement une des plus étudiées : dans une étude de Savage *et al.* (Savage and Ruggeri 1991), le fibrinogène n'est capable de se lier aux plaquettes inactives que lorsqu'il est adsorbé dans une conformation propice à la reconnaissance plaquette-fibrinogène.

D'autre part, de nombreuses équipes ont démontré que le fait de travailler avec des solutions protéiques concentrées (Garcia *et al.* 1999; Norde and Giacomelli 1999) et/ou complexes (Grinnell and Feld 1982; Lewandowska *et al.* 1989) restreignait les changements de conformation induits par les surfaces et l'activité biologique de la protéine pouvait ainsi être conservée.

Pour obtenir une adsorption et une bioactivité maximales, une forme de coopération entre les facteurs influençant l'adsorption des protéines est requise (couche d'hydratation, polarité du matériau, rugosité...). Baszkin et Lyman (Baszkin and Lyman 1980) ont montré que les adsorptions de l'albumine, de la gammaglobuline et du fibrinogène augmentaient lorsque le ratio [(composante polaire)/(composante apolaire)] de l'énergie de surface augmentait, *i.e.* en augmentant l'hydrophilicité. Norde (Norde 1986) démontre dans son étude (et à l'aide de théories sur l'adhésion des particules) que les changements structuraux et fonctionnels des protéines deviennent significatifs lorsque des forces de type polaire ou de type apolaire commencent à dominer l'adsorption. Il est alors envisageable de penser que des phénomènes similaires guident les réponses cellulaires. En effet, le pic d'adsorption de Fn du sérum sur un copolymère contenant autant de groupements hydrophiles qu'hydrophobes correspond au pic d'étalement de fibroblastes (Horbett and Schway 1988). Toutefois, il est à noter que des pics

d'adsorption de Fn et d'étalements cellulaires similaires ont été obtenus pour des copolymères totalement hydrophobes (Horbett and Schway 1988).

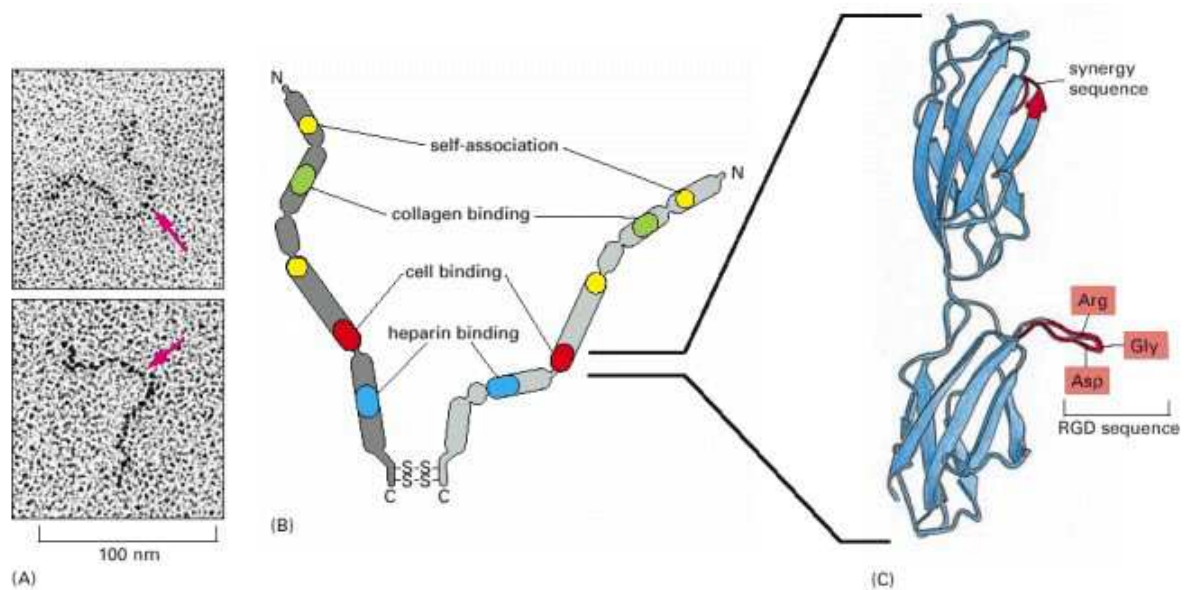
## **2.5 *Le cas de la Fn***

### **2.5.1 Généralités**

La Fn est une glycoprotéine présente sous deux formes distinctes. Dans les fluides corporels, la Fn est une protéine globulaire soluble (sécritée par les hépatocytes et les cellules endothéliales) alors que dans la MEC, la Fn est sous forme fibrillaire et est insoluble. Sous cette forme, la Fn est sécrétée par les cellules mésenchymateuses (en particulier les fibroblastes) et par certaines cellules épithéliales. La Fn, grâce à ses multiples sites d'adhésion possède deux fonctions principales : l'organisation de la MEC et l'adhésion cellulaire. Elle assure le maintien du réseau de la matrice en se liant à d'autres constituants tels que le collagène ou l'héparine. La Fn joue un rôle important au niveau de l'adhésion cellulaire en se liant aux récepteurs membranaires *via* un motif formé de trois acides aminés (Arginine – Glycine - Acide Aspartique) appelé séquence RGD. Par cette liaison spécifique avec certains récepteurs membranaires, la Fn contrôle le comportement cellulaire : organisation du cytosquelette, prolifération, différenciation (Garcia *et al.* 1999; Keselowsky *et al.* 2003; Lan *et al.* 2005).

La Fn est un dimère de grande taille en forme de V de 100nm de long. C'est une glycoprotéine constituée de deux monomères liés par deux ponts disulfure (Figure 3 A et B) en position C-terminale. Les deux chaînes polypeptidiques sont similaires mais rarement identiques : elles sont codées par le même gène mais synthétisées à partir de plusieurs variants d'ARNm. L'hétérodimère présente une masse moléculaire d'approximativement 440kDa. Chaque chaîne possède près de 2000 acides aminés qui sont organisés en cinq à six domaines reliés par des segments polypeptidiques. Ces domaines, constitués par la répétition de sous-unités de trois types différents (I, II et III), sont impliqués dans des liaisons fonctionnelles avec les cellules (ce domaine comprend le site RGD), le collagène (ou site gélatine), la fibrine et l'héparine (Figure 3 B). Le domaine de liaison avec les récepteurs de la membrane plasmique comprend la séquence RGD et un module répété de type III

appelé séquence PHSRN (Figure 3 C). Ce dernier motif est qualifié de synergique car il ne possède aucune activité de fixation vis-à-vis des récepteurs membranaires lorsqu'il est seul : il potentialise l'étalement cellulaire quand il est présenté avec le motif RGD. Le point isoélectrique de la Fn a une valeur de  $pI = 5,38$ , ce qui signifie que pour des  $pH > 5,38$ , la Fn est plutôt chargée négativement.



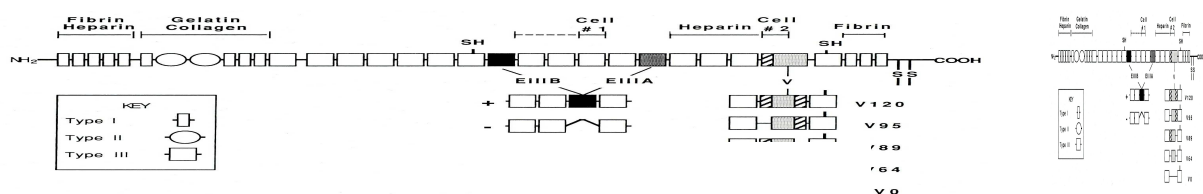
### Figure 3 - Structure d'un dimère de Fn

(A) Sur les images issues de la microscopie électronique à balayage, les flèches rouges indiquent la position C-terminale d'une molécule de Fn immobilisée sur du platine. (B) Représentation schématique où figurent les principaux sites de liaison. (C) Représentation tri-dimensionnelle déterminée par cristallographie aux rayons X du site de liaison avec les intégrines.

Source : Guidebook to : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mboc4.figgrp.3572>

#### 2.5.2 Les modules de la Fn

La séquence d'un monomère de Fn révèle trois types de répétitions internes homologues, appelées également modules, séparés habituellement par de courtes séquences de connexion : les modules ont une structure plutôt rigide et sont reliés par des parties plus flexibles. Le module I d'une longueur de 45 aa est représenté douze fois dans un monomère de Fn, le module II d'une longueur de 60 aa est représenté deux fois et enfin le module III d'une longueur de 90 aa est représenté de 15 à 17 fois (Figure 4). Chaque module est une unité indépendante à ne pas confondre avec les domaines fonctionnels de la protéine qui peuvent être constitués de plusieurs modules (Figure 4). Ces modules sont également retrouvés dans d'autres protéines, spécialement le module de type III qui est la représentation la plus ubiquitaire de tous les modules. Ce module de type III est retrouvé à hauteur de 2% dans l'ensemble des protéines animales (Bork and Doolittle 1992) et peut être occasionnellement trouvée dans le règne végétal (De Marino *et al.* 1999). Les séquences d'aa des modules de la Fn sont hautement conservées. Les trois types de modules sont des structures invariantes : les modules de type I et de type II contiennent chacun quatre cystéines avec deux ponts disulfure, éléments cruciaux pour le maintien de la stabilité et la fonction (Isaacs *et al.* 1989). Le module de type III est dépourvu de ponts disulfure mais les modules III-7 et III-15 contiennent toutefois une cystéine, dissimulée dans la structure 3-D.

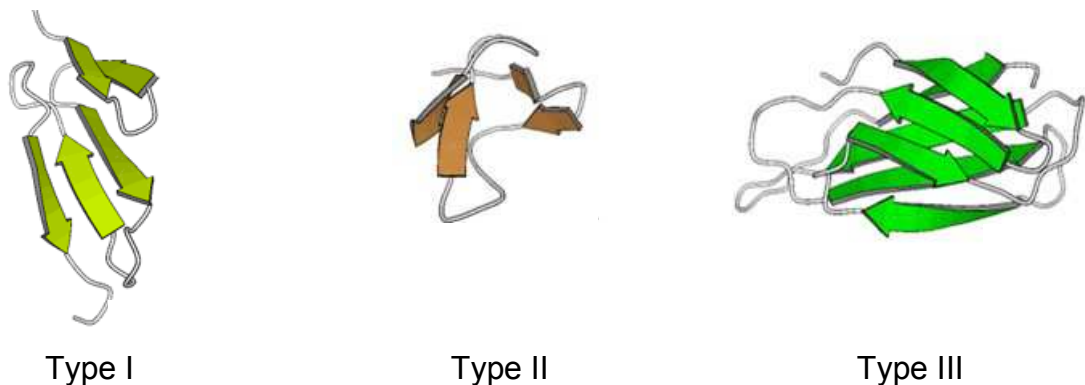


**Figure 4 - Représentation schématique des domaines fonctionnels et de l'agencement des modules de type I, II et III portés par un monomère de Fn.**

Source : T. Kreis and R. Vale *Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins*, A Sambrook and Tooze Publication at Oxford University Press, 1993, p.56

Les modules de la Fn sont des entités indépendantes et peuvent conserver leur repliement dans l'espace même s'ils sont isolés les uns des autres. Cela a été démontré, notamment en considérant des fragments protéolytiques ne contenant chacun qu'un seul module. Après avoir subi une dénaturation chimique ou thermique, chaque module a retrouvé sa conformation initiale (Litvinovich *et al.*

1991). Cependant, la stabilité des modules individuels dépend des interactions avec les modules avoisinants et ce sont ces interactions qui vont conditionner la forme finale de la protéine.



**Figure 5 - Représentation en 3D des modules de type I, II et III présents dans une molécule de Fn.**

Source : <http://home.comcast.net/~kennethingham/newsite/figs/modules2.htm>

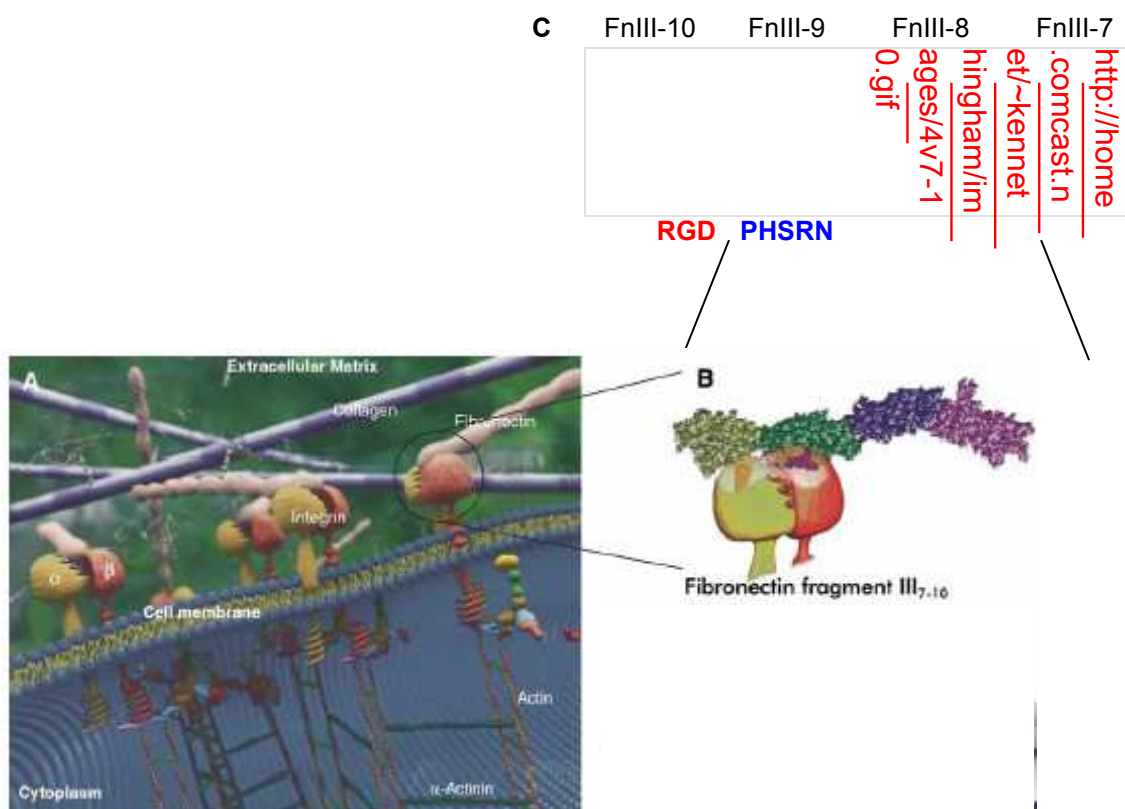
Les structures tri-dimensionnelles de plusieurs modules de la Fn ont été déterminées (Figure 5). Les modules qui possèdent des séquences d'aa similaires présentent un repliement dans l'espace comparable. Les trois types de modules sont composés pratiquement exclusivement de feuillets- $\beta$  anti-parallèles et de replis avec peu ou pas d'hélices- $\alpha$ .

### 2.5.3 Les interactions Fn – récepteurs cellulaires

La Fn présente de nombreux sites de liaison pour des protéines de la MEC, des protéines du sang circulant, des glycosaminoglycanes mais également des récepteurs membranaires.

Sur un support de culture ou un biomatériau, en général, l'adhésion cellulaire s'effectue entre autres par la liaison entre la cellule et la Fn adsorbée sur cette surface. Les sites RGD (sur le module FnIII-10) et PHSRN (sur le module FnIII-9) de la Fn se lient à certaines protéines de la membrane cellulaire appelées intégrines (Figure 6). Celles-ci, en se regroupant au niveau des points focaux d'adhésion, permettent à la fois l'ancrage des cellules sur leur substrat et l'activation d'une cascade de phosphorylations impliquant plus particulièrement p125FAK. Cette protéine, mise en jeu ensuite dans les voies de transduction du signal jusqu'au noyau, apparaît comme jouant un rôle central dans la régulation de l'organisation du cytosquelette, ainsi que dans la régulation des gènes en réponse à l'environnement

extracellulaire (Hynes 1992; Giancotti and Ruoslahti 1999; Miller and Boettiger 2003). La Fn va influencer directement le comportement cellulaire et plus particulièrement la prolifération, la différenciation et la motilité. D'autre part, la fibronectine joue un rôle fondamental au cours de l'embryogénèse (Ffrench-Constant and Hynes 1988), de l'angiogénèse (Francis *et al.* 2002), de la cicatrisation (Lucena *et al.* 2007), et de l'homéostasie en général (Lucena *et al.* 2007). La Fn peut aussi intervenir dans des processus pathologiques tels que l'inflammation (Proctor 1987) ou la cancérogénèse (Oppenheimer 2006).



**Figure 6 - (A) Représentation de l'interface MEC/Cellule. (B) Modèle de reconnaissance des sites RGD et PHSRN de la Fn par une intégrine. (C)**

**Localisation des sites RGD et PHSRN sur les modules FnIII-10 et FnIII-9, respectivement.**

*Source : Tirrell, M., E. Kokkoli, and M. Biesalski, The role of surface science in bioengineered materials. Surface Science, 2002. 500(1-3): p. 61-83.*



Les comportements cellulaires sont conditionnés en partie par la présence de Fn mais également par sa conformation (Garcia *et al.* 1999; Keselowsky *et al.* 2003). Celle-ci est influencée par le pH (Bergkvist *et al.* 2003), la force ionique (Bergkvist *et al.* 2003) mais également par l'hydrophobicité (Keselowsky *et al.* 2003), la rugosité (dos Santos *et al.* 2008) et la chimie de surface (McClary *et al.* 2000; Keselowsky *et al.* 2003) si elle entre en contact avec un biomatériau ; son activité biologique sera dépendante de l'ensemble de ces paramètres. Ainsi, l'analyse des énergies de surface avant et après adsorption de Fn sur des surfaces pourrait fournir des informations de première importance sur les interactions mises en jeu aux interfaces et permettre la formulation de prédictions quant aux comportements cellulaires résultants.

### **3 Caractérisation des énergies de surfaces**

La MEC est constituée de nombreuses protéines parmi lesquelles nous pouvons citer la Fn, la Vn, le collagène ou la ténascine. *In vivo*, l'ensemble de ces protéines constitue une sorte de réseau propice à l'adhésion des cellules adhérentes et à leur croissance (Reddig and Juliano 2005). Comme nous l'avons vu auparavant, ces molécules d'adhésion sont également utilisées en conditions *in vitro* pour favoriser l'attachement de cellules adhérentes sur des biomatériaux (Keselowsky *et al.* 2003). Nous avons effectivement montré dans les sections précédentes que les propriétés de surface des biomatériaux telles que la charge (Blanco *et al.* 2008), la topographie (Blanco *et al.* 2008), l'hydrophobicité ou l'hydrophilicité (van der Valk *et al.* 1983; van Wachem *et al.* 1985), la chimie de surface (Fuse *et al.* 2007) et l'énergie de surface (Kennedy *et al.* 2006) vont conditionner le comportement des cellules.

### 3.1 La tension superficielle

Par définition, la tension ou énergie de surface correspond à l'énergie libre nécessaire pour augmenter la surface considérée d'une unité d'aire. Dans le cas des liquides, on parle de tension superficielle. Pour illustrer cette tension, on peut observer que les molécules d'un liquide sont soumises à un certain nombre de forces qui se compensent parfaitement dans le volume. A la surface, l'affinité entre les molécules de liquide et les molécules de gaz étant moins fortes, un déficit existe (Figure 7). La résultante des forces est non nulle et dirigée vers l'intérieur du liquide créant ainsi une tension à la surface (de Gennes *et al.* 2002).

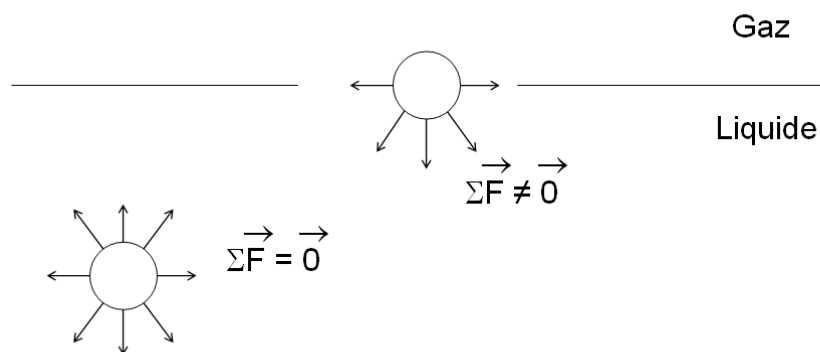


Figure 7 – Forces s'exerçant sur les molécules d'un liquide.

### 3.2 L'énergie interfaciale

Pour assurer un contact au niveau moléculaire entre deux phases différentes 1 et 2, il est nécessaire de fournir une énergie libre par unité de surface formée. On appelle cette énergie tension interfaciale  $\gamma_{12}$ . Elle résulte du fait que les molécules de la phase 1 au contact des molécules de la phase 2 ne peuvent pas satisfaire aussi bien leurs interactions cohésives avec leurs voisines que des molécules entourées

exclusivement de molécules de la phase 1. Plus simplement, les interactions 1-1 ou 2-2 sont toujours plus favorables que les interactions de type 1-2.

Dupré (Dupré 1869) fut le premier à introduire le concept du travail d'adhésion  $W^a$  entre deux phases et a donné pour définition :

$$W_{12}^a = \gamma_1 + \gamma_2 - \gamma_{12} \quad (I.1)$$

Avec

$\gamma_1$  l'énergie de surface de la phase 1 ;

$\gamma_2$  l'énergie de surface de la phase 2 ;

$\gamma_{12}$  l'énergie interfaciale entre les deux phases 1 et 2.

Pour expliquer son raisonnement, Dupré a considéré le processus réversible qui consiste à séparer deux matériaux 1 et 2 de nature différente. Le travail d'adhésion correspond à l'énergie qu'il faut fournir pour créer une unité de surface 1 et une unité de surface 2 moins l'énergie nécessaire pour rompre les liaisons et séparer ces deux surfaces unitaires à l'infini. Ainsi, l'énergie interfaciale  $\gamma_{12}$  est d'autant plus faible que l'énergie d'adhésion entre ces deux phases est grande.  $W_{12}^a$  traduit les interactions entre les deux phases 1 et 2 en contact.

Le travail de cohésion  $W^c$  est l'homologue homogène de l'énergie d'adhésion car il correspond à l'énergie nécessaire pour séparer un corps 1 (liquide ou solide) en deux pour former deux entités de section identique. Le travail de cohésion est défini par :

$$W_1^c = 2\gamma_1 \quad (I.2)$$

### *3.3 L'énergie libre de surface d'un solide*

Les propriétés de surface des solides peuvent aussi être caractérisées par une grandeur macroscopique qui est l'énergie libre de surface du solide. Comme pour un

liquide, elle traduit la discontinuité existant entre la masse du solide et sa surface. D'un point de vue microscopique, au cœur du solide, les liaisons et interactions avec les atomes voisins sont toutes de même nature, alors qu'à la surface, un certain nombre de liaisons ne peuvent pas être satisfaites. Il en résulte un excès d'énergie à la surface.

Par définition, l'énergie de surface  $\gamma_s$  d'un solide, en contact avec sa vapeur ou dans le vide, correspond au travail qu'il faut fournir pour augmenter la surface d'une unité d'aire. Contrairement aux liquides, les atomes ou molécules d'un solide sont très faiblement mobiles, et les techniques expérimentales analogues à celles utilisées pour les mesures d'énergie de surface des liquides ne sont pas envisageables. On peut estimer la valeur de l'énergie de surface, soit par des calculs basés sur une modélisation des interactions, soit à partir de mesures effectuées au voisinage du point de fusion.

La méthode de calcul, basée sur la modélisation des interactions, propose de décomposer l'énergie de surface totale en la somme d'interactions intermoléculaires considérées comme indépendantes. Dans le cas général (liquide, solide, gaz) et en l'absence de liaisons fortes (Fowkes 1964b), l'énergie de surface sera décomposée en deux termes :

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^p \quad (1.3)$$

Avec

$\gamma^d$  : composante liée aux interactions dispersives de London ;

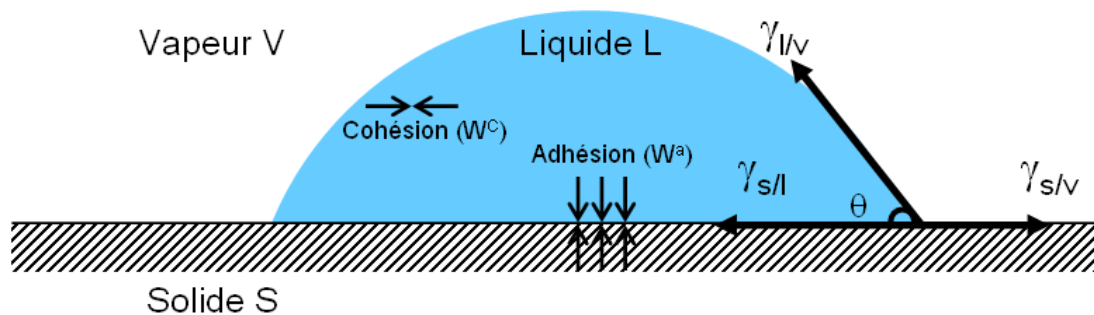
$\gamma^p$  : composante liée aux interactions de type polaire ou non dispersive.

L'énergie de surface des solides est un paramètre important pour comprendre, interpréter et prédire les phénomènes de surface et notamment le mouillage. Cependant, si la mesure de la tension interfaciale entre deux liquides non miscibles ou entre un liquide et un gaz ( $\gamma_l$ ) est relativement aisée, il est difficile de déterminer l'énergie de surface d'un solide ( $\gamma_s$ ). La technique la plus utilisée est d'estimer sa

valeur à partir de mesures d'angle de contact effectuées avec des liquides de tension de surface connue.

### 3.4 Angles de contact

Lorsque l'on dépose une goutte de liquide l sur un solide s, celle-ci adopte une configuration particulière qui reflète les interactions se produisant entre le solide et le liquide. La forme adoptée par la goutte à l'équilibre correspond à l'énergie minimale du système. Elle résulte de l'équilibre des forces d'adhésion solide-liquide et les forces de cohésion du liquide.



**Figure 8 - Mesure d'angles de contact par la technique de la goutte posée.**

Avec

$\gamma_{s/v}$  : énergie libre de surface du solide en équilibre avec sa vapeur ;

$\gamma_{l/v}$  : énergie libre de surface du liquide en équilibre avec sa vapeur ;

$\gamma_{s/l}$  : énergie libre interfaciale du système solide-liquide ;

$\theta$  : angle de contact du liquide sur le solide en présence de vapeur de liquide.

A l'équilibre, le mouillage d'une surface par un liquide et l'angle de contact résultant sont reliés par l'équation de Young (Figure 8) :

$$\gamma_{l/v} \cdot \cos\theta = \gamma_{s/v} - \gamma_{s/l} \quad (1.4)$$

### 3.4.1 Détermination du travail d'adhésion solide/liquide

La méthode de calcul de l'énergie de surface basée sur la mesure d'angle de contact fait nécessairement intervenir un travail d'adhésion entre le solide et le liquide. Selon Dupré (Dupré 1869), le travail d'adhésion entre un liquide l et un solide s est défini à l'aide de l'équation (I.1) par :

$$W_{s/l}^a = \gamma_s + \gamma_l - \gamma_{s/l} \quad (I.5)$$

Or l'équation de Young (I.4) permet d'exprimer  $\gamma_{s/l}$  tel que :

$$\gamma_{s/l} = \gamma_{s/v} - \gamma_{l/v} \cdot \cos\theta \quad (I.6)$$

Dès lors, en combinant les équation (I.5) et (I.6), on obtient :

$$W_{s/l}^a = \gamma_{l/v} \cdot (1 + \cos\theta) + \gamma_s - \gamma_{s/v} \quad (I.7)$$

Les interactions entre un gaz et un liquide sont dans la plupart des cas négligeables et la tension interfaciale n'est pas ou peu influencée par la vapeur environnante. On a donc l'approximation usuelle  $\gamma_{l/v} \approx \gamma_l$  et l'équation (I.7) se réécrit :

$$W_{s/l}^a = \gamma_l \cdot (1 + \cos\theta) + \pi_{s/l} \quad (I.8)$$

Avec

$\pi_{s/l} = \gamma_s - \gamma_{s/v}$  : pression d'étalement.

$\pi_{s/l}$  est appelée pression d'étalement de la vapeur sur le solide et représente la diminution de l'énergie de surface du solide résultant de l'adsorption d'un film bidimensionnel de molécules de vapeur à la surface. Ce terme est souvent négligé (Good 1993) pour les solides de faible énergie de surface de telle sorte que l'on obtienne :

$$W_{s/l}^a = \gamma_l \cdot (1 + \cos\theta) \quad (I.9)$$

Il existe différentes méthodes de calcul pour la détermination de l'énergie de surface d'un substrat solide. Toutes sont basées sur une ou plusieurs mesures d'angle de contact entre la surface solide et différents liquides. Si l'on connaît la valeur de la tension superficielle du liquide (et de ses composantes), il est possible de résoudre un système d'équations donnant les valeurs de l'énergie de surface (et de ses composantes). De nombreuses méthodes de détermination des énergies de surface existent, mais nous allons nous attarder à documenter les méthodes de Fowkes, Owens-Wendt et de van Oss et Good.

### 3.4.2 Les méthodes de Fowkes et Owens-Wendt

Fowkes (Fowkes 1962; Fowkes 1964a) a été l'un des premiers à proposer une détermination de la tension interfaciale à partir de tensions de surface lorsque l'un des deux milieux est purement dispersif (exemple : un hydrocarbure) :

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 2 \cdot [(\gamma_1^d \cdot \gamma_2^d)^{1/2}] \quad (I.10)$$

Avec

$$\gamma_1 = \gamma_1^d + \gamma_1^p \quad (I.11)$$

et

$$\gamma_2 = \gamma_2^d + \gamma_2^p \quad (I.12)$$

Le travail d'adhésion entre les deux phases s'écrit alors comme la moyenne géométrique des composantes dispersives de l'énergie de surface :

$$W_{1/2}^a = 2 \cdot [(\gamma_1^d \cdot \gamma_2^d)^{1/2}] \quad (I.13)$$

L'utilisation de la moyenne géométrique a été justifiée par des considérations théoriques dans le cas d'interactions purement dispersives.

Alors que les forces de dispersion existent quels que soient les atomes et les molécules mis en jeu, les forces polaires ne se rencontrent que pour certains types de molécule. Les interactions polaires ont pour origine la différence d'électronégativité qui existe entre différents atomes au sein de la même molécule. Owens et Wendt (Owens and Wendt 1969) ont étendu l'approche de Fowkes aux liquides polaires. Ils ont proposé de décomposer le travail d'adhésion en une composante dispersive et une composante polaire, et d'exprimer la composante polaire par la moyenne géométrique des composantes polaires des énergies de surface des phases en présence. Dans le cas d'une interaction liquide/solide, on obtient alors :

$$W_{s/l}^a = 2 \cdot [(\gamma_l^d \cdot \gamma_s^d)^{1/2}] + 2 \cdot [(\gamma_l^p \cdot \gamma_s^p)^{1/2}] \quad (I.14)$$

En utilisant l'équation (I.9), on peut alors obtenir une expression reliant les composantes polaires et dispersives de l'énergie de surface à l'angle de contact :

$$\gamma_l \cdot (1 + \cos\theta) = 2 \cdot [(\gamma_l^d \cdot \gamma_s^d)^{1/2}] + 2 \cdot [(\gamma_l^p \cdot \gamma_s^p)^{1/2}] \quad (I.15)$$

Ainsi, à l'aide de mesures d'angle entre la surface et deux liquides différents (dont, en général, un liquide totalement apolaire), on peut à partir de la relation (I.15) résoudre un système de deux équations et déterminer les composantes dispersive et polaire de la surface considérée. Pour un liquide apolaire, l'équation (I.15) devient :

$$\gamma_s^d = \gamma_l^d \cdot [(1 + \cos\theta)/2]^2 \quad (I.16)$$

### 3.4.3 La méthode de van Oss et Good

La méthode de van Oss et Good permet également de calculer les composantes polaire et dispersive de l'énergie de surface mais en décrivant cette fois-ci la composante polaire à l'aide du modèle acido-basique de Lewis (van Oss 1994).



Pour cette méthode, la composante dispersive est décrite par les interactions de type Lifshitz- van der Waals qui s'écrit  $\gamma^{LW}$  et prend en compte les composantes liées essentiellement aux interactions de type dispersive de London (la notation employée par van Oss est différente de celle d'Owens et Wendt, mais en pratique,  $\gamma^{LW}$  est équivalent à  $\gamma^d$ ). Le travail d'adhésion entre deux milieux 1 et 2 lié aux interactions de type LW est approché de la même manière que pour la méthode de Fowkes, par une moyenne géométrique :

$$W_{12}^{LW} = 2 \cdot [(\gamma_1^{LW} \cdot \gamma_2^{LW})^{1/2}] \quad (I.17)$$

Les méthodes varient dans l'expression de la composante polaire. Selon la méthode de van Oss et Good, la composante polaire de l'énergie de surface d'un solide ou d'un liquide peut être décrite selon une composante  $\gamma^+$  "accepteur d'électron" (acide de Lewis) et une composante  $\gamma^-$  "donneur d'électron" (base de Lewis). La tension de surface se décompose alors de la manière suivante :

$$\gamma = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \quad (I.18)$$

Dont la composante acide-base  $\gamma^{AB}$  est décrite par :

$$\gamma^{AB} = 2 \cdot [(\gamma_1^+ \cdot \gamma_1^-)^{1/2}] \quad (I.19)$$

La plupart du temps, les substances polaires possèdent une composante acide différente de la composante basique. Deux constituants vont réagir de manière réciproque : la composante acide de l'un va réagir avec la composante basique de l'autre et vice versa. Dès lors, la part de l'énergie d'adhésion due aux interactions acide-base noté  $W_{12}^{AB}$  sera :

$$W_{12}^{AB} = 2 \cdot [(\gamma_1^+ \cdot \gamma_2^-)^{1/2}] + 2 \cdot [(\gamma_1^- \cdot \gamma_2^+)^{1/2}] \quad (I.20)$$

On remarque cette fois-ci que le travail est considéré comme une double interaction asymétrique entre deux substances. Dans cette approche, l'équation (I.15) devient alors :

$$(1 + \cos\theta) \cdot \gamma_l = 2 \cdot [(\gamma_s^{LW} \cdot \gamma_l^{LW})^{1/2}] + 2 \cdot [(\gamma_s^+ \cdot \gamma_l^-)^{1/2}] + 2 \cdot [(\gamma_s^- \cdot \gamma_l^+)^{1/2}] \quad (I.21)$$

Comme pour la méthode de Owens-Wendt (Owens and Wendt 1969), il est possible à partir de l'équation (I.21) de résoudre un système de trois équations (trois liquides différents dont un liquide apolaire) et de déterminer les composantes dispersive, acide et basique de la surface considérée.

Néanmoins, dans les modèles de van Oss (van Oss 1994) et Owens et Wendt (Owens and Wendt 1969), l'utilisation de la moyenne géométrique pour la partie polaire n'a pas été validée de façon théorique et reste de nos jours, l'objet de critiques.

### *3.5 Caractérisation des énergies de surface de biomatériaux et de revêtements protéiques*

De nos jours, il est accepté que l'adhésion et l'étalement des cellules sur des surfaces polymériques soient directement reliés aux composantes dispersive et polaire de l'énergie libre de surface. Van der Valk *et al.* (van der Valk *et al.* 1983) ont recherché l'influence que pouvait avoir les composantes de l'énergie de surface sur l'étalement et le taux de prolifération de cellules pulmonaires de souris transformées sur différents polymères en présence de protéines sériques. Les composantes polaire et dispersive ont été caractérisées et il a été démontré que l'étalement cellulaire était dépendant de la partie polaire de l'énergie de surface. Les cellules s'étaient peu lorsque la composante polaire était inférieure à  $5\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ , alors qu'un étalement prononcé était remarqué pour des valeurs supérieures à  $15\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ . Une relation similaire a été trouvée entre l'étalement des cellules et la polarité de revêtements protéiques.

De même, un lien entre l'adhésion cellulaire et la composante polaire de l'énergie de surface a été établi par Birdi *et al.* (Birdi 1981) sur du polystyrène : les cellules adhéraient de plus en plus à mesure que la polarité augmentait. De Bartolo

et son équipe (De Bartolo *et al.* 2002) ont évalué l'adhésion et l'activité métabolique de cellules de foie de rat cultivées sur différentes membranes polymériques avant ou après adsorption de protéines. Les propriétés physico-chimiques de ces membranes sont caractérisées par des mesures d'angles de contact. Les composantes acide ( $\gamma^+$ ), basique ( $\gamma^-$ ) et de Lifshitz van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ) sont calculées en utilisant la méthode de Good, van Oss et Chaudhery (van Oss *et al.* 1987). L'adsorption d'albumine sérique bovine (BSA) est dépendante à la fois de l'angle de contact et de l'énergie totale de surface. Pour chaque membrane, plus la composante basique ( $\gamma^-$ ) de l'énergie de surface est importante et plus l'adhésion cellulaire est favorisée. La présence de protéines adsorbées sur les membranes change la mouillabilité de la surface en augmentant la composante  $\gamma^-$ . L'étalement cellulaire en présence de protéines est ainsi amélioré et s'accompagne d'une nette augmentation des activités métaboliques avec la synthèse d'urée.

L'influence de l'énergie de surface totale, de la composante acide et de la composante basique de surfaces d'acier inoxydable ou d'alliages à base de titane-vanadium-aluminium sur l'attachement et la croissance d'ostéoblastes a été examinée (Bren *et al.* 2004). Les matériaux présentant des énergies de surface élevées conduisent les cellules ostéoblastiques à se différencier par rapport aux surfaces de faible énergie. De plus la composante acide de l'énergie de surface est directement corrélée à l'activité de la phosphatase alcaline et à la différenciation de ces cellules. Les auteurs suggèrent que cette hausse de la composante acide et la différenciation cellulaire sont dues à la protonation de la couche d'oxyde des surfaces métalliques. Enfin, ils concluent qu'une meilleure compréhension des mécanismes à la base des interactions acide/base peut mener à l'amélioration des traitements de surface pour une application donnée et améliorer ainsi la biocompatibilité des matériaux.

Par des mesures d'angles de contact, de nombreuses autres études ont aussi souligné l'importance de l'hydrophilicité ou de l'hydrophobicité dans l'influence du comportement cellulaire. Lee *et al.* (Lee *et al.* 1998) ont créé, par traitement corona, des surfaces de polyéthylène possédant un gradient de mouillabilité (angles de contact à l'eau Ultrapure™ évoluant de 96° à 43°). Ils ont ensuite mis en culture

différents types cellulaires ou fait adsorber des protéines sériques. Indépendamment de la lignée étudiée, les cellules adhèrent, s'étalent et prolifèrent sur des zones présentant une hydrophilicité intermédiaire, avec un maximum d'adhésion pour des angles de contact de l'eau de 57°. De même, l'adhérence des protéines du sérum est améliorée sur des surfaces d'hydrophilicité modérée.

Toutefois, les méthodes employées par toutes ces équipes pour évaluer la mouillabilité des substrats est la technique de la goutte posée. Dans le cas de matériaux polymériques (Grundke *et al.* 1996), de revêtements protéiques (Grundke *et al.* 1999), ou de surfaces biologiques en général, cette méthode n'est pourtant pas adaptée. Le liquide déposé peut pénétrer dans ces substrats, déformer la couche ou modifier la conformation. Les angles de contact deviennent alors difficiles à mesurer et ne reflètent pas l'état de la surface dans ses conditions d'usage. Cette technique présente, en outre, un second désavantage : les caractéristiques physico-chimiques de surfaces destinées à être en contact avec des fluides biologiques sont déterminées à sec et non pas dans des conditions physiologiques. Les surfaces peuvent en effet avoir un comportement différent en contact avec l'air ou en présence d'une phase liquide. De plus, dans l'hypothèse où un revêtement protéique doit être caractérisé, les protéines peuvent subir un changement de conformation si elles sont séchées à l'air. L'étude de Harnett *et al.* (Harnett *et al.* 2007) peut être mentionnée comme exemple. Différents biomatériaux sont caractérisés avec ou sans revêtement de Fn. Dans cette étude, la Fn est adsorbée sur les surfaces, rincée et séchée à l'air pendant une nuit, puis les angles de contact à l'eau sont mesurés. Après adsorption de Fn sur les différents substrats, l'hydrophobicité est significativement augmentée par rapport aux matériaux bruts. Cependant, l'auteur émet des réserves quant à ce résultat en mettant en évidence l'influence du séchage sur le réarrangement conformationnel de ces biomolécules (Absolom *et al.* 1981; Harnett *et al.* 2007).

Afin d'éviter les étapes de séchage et caractériser des surfaces polymériques, il existe une alternative toutefois peu utilisée : immerger les surfaces et mesurer les angles de contact dans une phase liquide (Schultz *et al.* 1977b; Schultz *et al.* 1977a; Grundke *et al.* 1996; Grundke *et al.* 1999). Cette technique a été décrite pour la première fois par Schultz (Schultz *et al.* 1977b; Schultz *et al.* 1977a) pour déterminer

la composante polaire de substrats possédant de fortes énergies de surface. Pour mener à bien ses investigations, Schultz a immergé une surface de mica fraîchement clivé dans une phase huileuse (alcanes) et a déposé des gouttes d'eau Ultrapure™ (les deux liquides choisis étant non miscibles) sur le mica. Busscher et ses collègues (Busscher *et al.* 1991) ont baigné des surfaces de polyfluoroéthylènepropylène–Teflon dans des solutions de BSA et ont évalué l'adsorption de cette protéine avec la technique de la bulle captive. Grundke *et al.* ont considéré des surfaces lisses de fluorohydrocarbure et ont apprécié, par la technique de la bulle captive, l'évolution de l'état de cette surface avant et après adsorption d'albumine ou de fibrinogène humains (Grundke *et al.* 1999). Les mesures effectuées en PBS pH 7,4, s'apparentent aux conditions physiologiques et il devient possible d'évaluer les caractéristiques des protéines dans leur état le plus hydraté. Ils ont noté que les adsorptions des deux protéines considérées modifiaient la mouillabilité du substrat initial en augmentant son hydrophilicité. Dans une seconde étude, cette même équipe a associé la méthode en milieu liquide-liquide à la microscopie à force atomique (AFM) pour quantifier la mouillabilité et évaluer la topographie de différents matériaux celluloseux en eau Ultrapure™ ou en solutions protéiques (Grundke *et al.* 1996). L'association de ces deux méthodes peut améliorer la compréhension des phénomènes de mouillage de substrats hydrophiles et protéiques et ainsi appréhender certains paramètres physico-chimiques en conditions physiologiques.

## **4 La microscopie à force atomique (AFM)**

### *4.1 Applications de l'AFM en biologie*

L'AFM est une technique qui a révolutionné l'étude de la structure et des propriétés des surfaces (Colton *et al.* 1997). C'est la seule méthode qui donne accès directement à la hauteur des structures (direction z). De plus, son utilisation ne nécessite pas de préparation invasive de l'échantillon contrairement à d'autres méthodes à haute résolution (par exemple microscopie électronique à transmission). Il est également possible de travailler en milieu liquide, souvent aqueux. Tous ces avantages de l'AFM en font une méthode de choix pour la caractérisation des objets

biologiques en conditions natives, physiologiques, en temps réel et avec une résolution inégalée.

Cette technique a en effet, permis de fournir des images en 3-D de structures biologiques, y compris de biomolécules, de films lipidiques, de protéines, d'acides nucléiques, de cellules entières, *etc...* Ainsi, l'AFM a permis d'observer le bourgeonnement de levures *Saccharomyces cerevisiae* en temps réel et de mesurer les propriétés mécaniques de la surface de la cicatrice formée (Ahimou *et al.* 2003). Dans une étude pionnière, l'équipe de Hansma a pu observer l'activité de transcription de l'ADN par l'ARN polymérase en temps réel (Kasas *et al.* 1997). La caractérisation topographique des surfaces a aussi largement contribué à l'élucidation de mécanismes d'interaction entre des mimes de membranes cellulaires et de nombreux facteurs externes : des solvants (Mou *et al.* 1994), des protéines (Morandat and El Kirat 2007), des peptides (El Kirat *et al.* 2006), des détergents (El Kirat and Morandat 2007), des nanoparticules (Hong *et al.* 2006). Elle permet également, grâce à la spectroscopie de force, d'accéder aux propriétés physiques de la surface telles que l'élasticité, l'hydrophobicité et les interactions intra- et inter-moléculaires. La spectroscopie de force a été appliquée à l'étude de nombreuses interactions, par exemple, dans l'étude des interactions spécifiques entre l'avidine et la biotine (Ebner *et al.* 2007) ou pour la cartographie d'adhésion à la surface de cellules vivantes en greffant un ligand spécifique sur la pointe AFM (Dupres *et al.* 2005). La manipulation de protéines et la caractérisation de surface de couches adsorbées a également été largement développée grâce à l'AFM : avec le collagène (Dupont-Gillain and Rouxhet 2001), avec la bactériorhodopsine en cristaux 2-D (Muller *et al.* 2000).

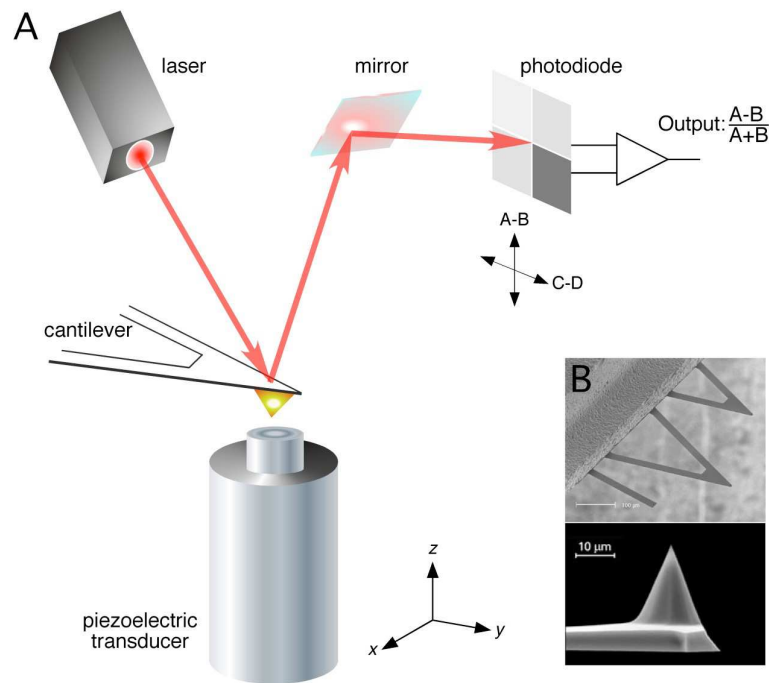
## **4.2** *Principe général de l'AFM*

L'AFM est utilisée pour étudier la topographie des surfaces avec la possibilité d'obtenir une résolution à l'échelle de l'atome. Cette technique a pour élément de base une pointe souple dont l'extrémité a un rayon de courbure de quelques dizaines de nanomètres. Cette pointe est en contact avec l'échantillon qui est lui-même fixé sur un scanner à céramiques piezo-électriques (Figure 9A). Lorsque l'on applique

une tension à ces céramiques, elles se dilatent ou se contractent, ce qui permet de déplacer l'échantillon dans les trois directions de l'espace x, y, z avec une précision de l'ordre de 0,1nm. Un laser est réfléchi sur la pointe AFM puis collecté dans une photodiode à quatre cadrans. Ce dernier permet de mesurer la déflexion (cadrans A et B) et la torsion de la pointe AFM (cadrans C et D). Lorsque la pointe souple rencontre un obstacle, elle peut se plier et le laser change de position dans la photodiode. Une boucle de rétroaction permet également de contrôler la force d'appui de la pointe sur l'échantillon. La position du laser dans les cadrans donne ainsi directement accès à la topographie de l'échantillon. Le levier (cantilever) est " microfabriqué " en nitrure de silicium  $\text{Si}_3\text{N}_4$  avec des dimensions de 100 à 300 $\mu\text{m}$  en longueur, 10 à 60 $\mu\text{m}$  en largeur et 0,5 à 3 $\mu\text{m}$  en épaisseur (Colton *et al.* 1997) (Figure 9B).

Il existe trois modes d'opérations en AFM : (i) le mode contact, (ii) le mode non-contact qui consiste en une oscillation de la pointe à la surface de l'échantillon sans jamais rentrer en contact avec celui-ci, et (iii) le mode tapping (ou contact intermittent) qui correspond à une oscillation de la pointe qui rentre en contact intermittent avec l'échantillon.

Dans le mode contact, utilisé dans ce travail, la pointe et l'échantillon sont en contact permanent. Grâce à la boucle de rétroaction, la force normale à la surface peut être maintenue constante à une valeur minimale (< 500pN).



**Figure 9 – (A) Principe général de l'AFM et (B) pointes AFM de type microlevers.**



### 4.3 *Le cantilever*

Le cœur de l'AFM est représenté par le cantilever : un support où sont montées des pointes à son extrémité. Les stylets et cantilevers modernes sont fabriqués soit en silicium, en nitrure de silicium ou en diamant par microfabrication. Ces techniques de fabrication (photolithographie, gravure) ont été initialement développées pour l'industrie électronique et plus particulièrement pour la mise au point des circuits imprimés. L'utilisation du micro-usinage permet la découpe des pointes à partir du cantilever ; ces pointes étant un pré-requis nécessaire pour imager à haute résolution des échantillons biologiques. La structure de la pointe va déterminer la nature des interactions avec la surface ainsi que l'aire géométrique de contact.

Une pointe en nitrure de silicium est recouverte d'une couche d'oxyde non-conductrice et sa géométrie est souvent conique ou pyramidale. Les cantilevers utilisés ont soit une forme triangulaire (ou en forme de "V") soit une forme rectangulaire. Leur longueur varie entre 100 et 300 $\mu\text{m}$  et leur épaisseur oscille de 0,5 à 3 $\mu\text{m}$ . Les leviers sont souvent recouverts d'une fine couche d'or ou d'aluminium pour rendre les pointes réfléchissantes et détecter le laser. Des revêtements ferromagnétiques sont également réalisables pour effectuer des mesures magnétiques. La géométrie en forme de "V" minimise les mouvements de torsion du cantilever pendant l'acquisition ; les leviers de cette géométrie sont donc préférentiellement choisis pour obtenir des images topographiques de grande qualité. Au contraire, une géométrie rectangulaire possède un grand degré de liberté pour les mouvements de rotation et est sensible aux forces latérales. Cette géométrie sera particulièrement utile pour effectuer des mesures de friction. Quelle que soit le type de géométrie, la force de résistance à la flexion du levier est déterminée par la loi de Hooke :  $F = -\kappa x$ , où  $\kappa$  est la constante de force du cantilever et  $x$  le déplacement de l'échantillon. En AFM, la résolution de la force est, en première approximation, limitée à l'agitation thermique du cantilever, ce bruit étant caractérisé par la constante de raideur du levier. Les valeurs typiques de cette constante sont comprises entre 10 et 100 $\text{pN}\cdot\text{nm}^{-1}$  en mode contact, entre 0,5 et 5  $\text{pN}\cdot\text{nm}^{-1}$  en mode non-contact et entre 30 et 60

pN.nm<sup>-1</sup> en mode Tapping™. Plus la valeur de la constante de raideur est petite et plus les mesures sont précises. Le fait d'avoir une constante de raideur petite présente cependant quelques inconvénients mineurs : la sonde devient sensible aux variations de température et le temps de réponse peut être retardé. Cependant, la force appliquée sur l'échantillon peut être très largement influencée par l'utilisation de leviers qui possèdent une constante de raideur importante (Evans 2001).

Les cantilevers souples sont particulièrement adaptés au mode contact car ils n'endommagent pas l'échantillon lors d'une acquisition. Les leviers raides, quant à eux, sont adéquats pour l'utilisation du mode non-contact car ils ont une fréquence de résonance élevée. Ainsi, un type de levier sera choisi pour une application donnée en fonction de sa fréquence de résonance ainsi que sa gamme de mesures (Viani *et al.* 1999).

#### 4.4 Les différents types de force

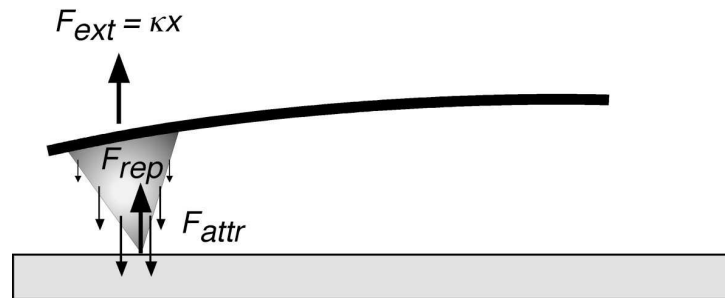
Le principe de l'AFM se base sur les interactions physiques développées entre l'échantillon à analyser et la pointe AFM. Les différents types de force impliqués à l'échelle moléculaire pour des études AFM et plus largement pour la nanomécanique, sont donnés dans le tableau 1.

**Tableau 1- Forces jouant un rôle crucial à l'échelle moléculaire.**

| Type de force                    | Ordre de grandeur                                     |
|----------------------------------|---|
| Collision                        | 10 <sup>-12</sup> à 10 <sup>-9</sup> pN par collision |
| Elastique                        | 1 - 100pN   |
| Electrostatique et van der Waals | 1 – 1 000pN   |
| Visqueuse                        | 1 – 1 000pN   |
| Thermique                        | 100 – 1 000pN   |
| Covalente                        | 10 000pN  |

La gamme des interactions, qui est très variée, est d'une importance cruciale pour la compréhension de l'AFM. La force totale lors d'une acquisition est composée à la fois de forces développées par la pointe AFM mais également de forces développées par l'échantillon. La situation d'équilibre en mode contact est établie par

la complémentarité des forces attractives à longue distance (forces de van der Waals et électrostatiques) et des forces répulsives à courte portée (Figure 10). Ce sont ces dernières qui vont déterminer la qualité de la résolution de l'acquisition (Meyer *et al.* 2003).



**Figure 10 - Forces s'exerçant sur la pointe en mode contact.**

La force attractive ( $F_{attr}$ ) à longue distance entre la pointe et l'échantillon est compensée par la force répulsive à courte portée (*i.e.* pendant le contact,  $F_{rep}$ ) et la force externe ( $F_{ext}$ ) exercée par la flexion du levier.

#### **4.4.1 Les forces à courte portée**

Les forces à courte portée sont d'une importance majeure en microscopie à effet tunnel. Une pointe conductrice est placée en face de la surface à étudier et le courant résultant du passage d'électrons entre la pointe et la surface par effet tunnel est mesuré. Ce courant tunnel diminue de manière exponentielle en fonction de l'éloignement de la pointe et du sujet à analyser (Meyer *et al.* 2003). Les forces à courte portée se produisent à une distance  $< 1\text{nm}$  et sont formées à partir de la superposition des ondes électroniques et de la répulsion des noyaux des atomes. Les forces à courte portée peuvent être à la fois attractives et répulsives. Les forces sont attractives lorsque le chevauchement des ondes électroniques réduit l'énergie totale du système. Au contraire, selon le principe d'exclusion de Pauli des forces répulsives peuvent être générées à cause d'un trop fort recouvrement des ondes électroniques.

Les variations des forces à courte portée à l'échelle atomique permettent d'obtenir une résolution maximale. A une distance de 0,5nm de la surface, l'ordre de grandeur des forces à courte portée entre l'échantillon et l'apex de la pointe devient comparable à l'ordre de grandeur des forces à longue portée. Ainsi, il existe une distance caractéristique critique à laquelle peut être obtenue la résolution atomique maximale en mode non-contact (Meyer *et al.* 2003).

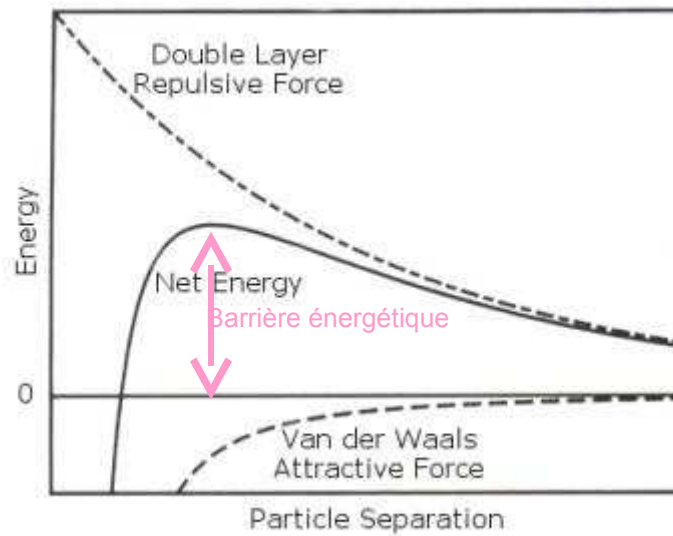
#### 4.4.2 Les forces électrostatiques

Les interactions biologiques sont principalement gouvernées par les forces électrostatiques à longue portée développées par des particules chargées. Une surface dans un liquide peut acquérir une charge soit par ionisation ou dissociation de groupements chargés ou par l'adsorption d'ions de la solution sur la surface non chargée ou de charge opposée. Quel que soit le processus, la charge de la surface est compensée par l'adsorption de contre-ions de charge opposée. Certains de ces contre-ions sont liés à la surface pour former la couche de *Stern* ou de *Helmholtz*, alors que les autres forment, près de la surface, une "couche diffuse" possédant un mouvement thermique. Cette "couche", reconnue sous le nom de double-couche électrique (Israelachvili 1991), accroît la concentration d'ions entre des particules qui interagissent. Lors des acquisitions AFM en milieu aqueux, ces phénomènes sont de mise : par exemple, le mica, qui est chargé négativement, va attirer des ions chargés positivement. Ces ions vont s'accumuler à l'interface et conduire à la formation d'une couche chargée positivement. Cette double-couche peut interagir avec d'autres ions ou surfaces chargées. D'ailleurs, la répulsion des double-couches électriques a été exploitée afin d'obtenir des acquisitions de haute résolution (Muller *et al.* 1999). Le potentiel de double-couche diminue de façon exponentielle avec l'épaisseur de l'"atmosphère ionique", mieux connue sous le nom de longueur de Debye (distance moyenne d'interaction entre particules chargées,  $1/\mu$ ). Ce terme dépend à la fois de la constante diélectrique de la solution et de la concentration en ions (Israelachvili 1991). Pour des faibles potentiels de surfaces ( $\psi_0$ ), le potentiel à une distance  $r$  ( $\psi_r$ ) est relié à la longueur de Debye par la relation de Debye-Hückel (Israelachvili 1991) :

$$\psi_r = \psi_0 e^{-\mu r} \quad (1.22)$$

Généralement, lors de l'approche d'une pointe AFM sur un échantillon, la répulsion électrostatique diminue en fonction de l'importance de la force ionique du milieu aqueux. Contrairement aux forces de van der Waals, la répulsion due à la double-couche électrique est sensible aux types d'ions en solution, à leurs concentrations, au pH mais également à la densité de charge présente à la surface. La combinaison des forces attractives de van der Waals et des forces répulsives de la double-couche électrique représente la base du système DLVO (Derjaguin – Landau – Verwey – Overbeek).

La théorie de DLVO suggère que la stabilité d'un système colloïdal est déterminée par la somme des forces de l'attraction de van der Waals et la double couche électrique de répulsion, qui existent entre les particules lorsqu'elles s'approchent les unes des autres en raison du mouvement Brownien qu'elles subissent. Cette théorie énonce qu'une barrière énergétique résultant des forces répulsives empêche deux particules de s'approcher l'une de l'autre et d'adhérer l'une à l'autre (Figure 11). Mais si les particules entrent en collision avec une énergie suffisante pour passer la dite barrière énergétique, la force d'attraction les tirera jusqu'à les mettre en contact et les coller très fortement l'une à l'autre et de manière irréversible.



**Figure 11 - Schéma de la variation de l'énergie libre avec la séparation des particules selon la théorie de DLVO.**

L'énergie nette est donnée par la somme de la double couche de répulsion et par les forces d'attractives de van der Waals que les particules subissent lorsqu'elles s'approchent l'une de l'autre.

#### 4.4.3 Les forces de van der Waals

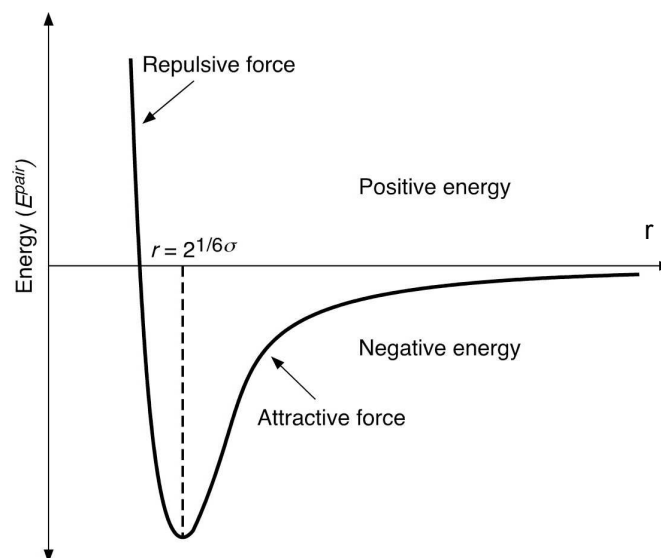
Avec les forces électrostatiques, les forces de van der Waals représentent les forces les plus impliquées dans le domaine de la biologie. Ces forces sont de type dipôle-dipôle qui agissent sur tous les atomes et les molécules entre 2 et 10nm de distance. Les forces prépondérantes sont dues aux forces de dispersion entre dipôles instantanés et non pas celles entre dipôles permanents. Les forces de van der Waals agissent à faible distance et ont un ordre de grandeur de  $F \approx 1 / r^7$  (à une distance supérieure à 5nm) ; ce qui signifie qu'elles diminuent significativement avec

la distance. Ainsi, Israelachvili (Israelachvili 1991) montre qu'à une distance inférieure à  $r = 5\text{nm}$ , les forces de van der Waals sont diminuées à  $F \approx 1 / r^8$ .

Les forces de van der Waals peuvent être utilisées pour caractériser à la fois les composantes attractives et répulsives de la relation force-distance entre une pointe AFM et un échantillon : l'énergie potentielle d'une particule à l'apex de la pointe peut varier en fonction de l'interaction générée par une particule présente à la surface de l'échantillon. La variation de l'énergie potentielle ( $E^{pair}$ ) avec la distance ( $r$ ) peut être décrite mathématiquement par la fonction  $E^{pair} = f(r)$ . La fonction de Lennard-Jones (Figure 12) en est un cas particulier et est utilisée pour la modélisation des interactions présentes entre la pointe AFM et l'échantillon (Israelachvili 1991) :

$$E^{pair}(r) = 4 \varepsilon [(\sigma/r)^{12} - (\sigma/r)^6] \quad (1.23)$$

Cette équation donne l'énergie potentielle entre deux atomes, où  $r$  est la distance qui les sépare. Le terme  $\varepsilon$  est dit paramètre énergie de Lennard-Jones, il est constant pour un type d'atomes donné, et décrit la profondeur du puits d'énergie à son minimum. Le terme  $\sigma$  qui est aussi une constante, représente la distance entre deux atomes à laquelle les forces attractives et répulsives sont égales.



## Figure 12 – La fonction de Lennard-Jones.

Schéma représentant la variation d'énergie ( $E^{pair}$ ) en fonction de la séparation de deux atomes ( $r$ ).

En microscopie à force atomique, la géométrie du système se résume à une sphère s'approchant d'un corps d'une surface infinie. Dans cette configuration, les forces de van der Waals sont représentées par (Meyer *et al.* 2003) :

$$F_{vdW} = HR / (6r^2) \quad (1.24)$$

où H est la constante de Hamaker, R le rayon de courbure de la pointe et r la distance entre la pointe et l'échantillon. La valeur de la constante de Hamaker est de l'ordre de  $10^{-19}$ J (pour un liquide ou un solide, indifféremment) pour des mesures effectuées dans le vide (Israelachvili 1991). Pour donner une idée de la force de van der Waals dans le vide, Meyer (Meyer *et al.* 2003) a pris en compte une pointe de rayon de courbure  $R = 30$ nm et une distance avec l'échantillon de  $r = 0,5$ nm ; la force de van der Waals ainsi développée était de l'ordre de 2nN.

Enfin, il est important de mentionner la répercussion importante de l'introduction d'un milieu supplémentaire entre la pointe et l'échantillon (air, milieu liquide) sur la force de van der Waals. La théorie de Lifshitz prévoit en effet que la force est proportionnelle à  $(\epsilon_1 - \epsilon_3) \cdot (\epsilon_2 - \epsilon_3)$  et à  $(n_1^2 - n_3^2) \cdot (n_2^2 - n_3^2)$ , où  $\epsilon$  et  $n$  sont la constante diélectrique et l'indice de réfraction, de la pointe (1), de l'échantillon (2) et du milieu intermédiaire (3), respectivement. Un milieu qui possède un  $\epsilon$  et un  $n$  proches des valeurs respectives des  $\epsilon$  et  $n$  de la pointe et de l'échantillon, va considérablement réduire la contribution des forces de van der Waals par rapport aux acquisitions sous vide. C'est d'ailleurs le cas pour la plupart des matériaux immergés. De plus, en choisissant judicieusement le liquide d'immersion (Tableau 2, (Meurk *et al.* 1997)), la constante de Hamaker peut être négative, ce qui aboutit à des forces répulsives (Hutter and Bechhoefer 1993). Ainsi l'immersion de la pointe AFM et de l'échantillon dans un liquide mène à une diminution significative de la contribution des forces de van der Waals dans la force totale développée entre la pointe et le matériau.



**Tableau 2 – Exemples de valeurs de la constante de Hamaker en fonction du système étudié (Meurk *et al.* 1997).**

| Système   | Constante de Hamaker, H ( $10^{-20}$ J) | Interaction résultante |
|---|---|------------------------|
| Pointe-milieu-substrat  |   |                        |
| Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> -diiodométhane-β-Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub>      | 1,0                                     | Attractive             |
| Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> -1-bromonaphthalène-β-Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> | 2,8                                     | Attractive             |
| Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> -diiodométhane-SiO <sub>2</sub>                      | -0,8                                    | Répulsive              |
| Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> -1-bromonaphthalène-SiO <sub>2</sub>                 | -0,2                                    | Répulsive              |

## 4.5 Les différents modes d'acquisition

### 4.5.1 Le mode contact

L'acquisition d'images topographiques en mode contact se caractérise par le contact physique établi entre la pointe AFM et l'échantillon à analyser. La surface est scannée et l'image enregistrée en fonction des changements de déflexion du levier ; le laser réfléchi sur la pointe est collecté par la photodiode. Dans ce mode, la pointe subit de nombreuses forces de répulsion. Sa position est donnée par la mise en place de l'équilibre des forces s'exerçant sur elle : les forces attractives entre la pointe et l'échantillon sont compensées par les forces répulsives entre l'apex de la pointe et l'échantillon, ainsi que la force externe exercée par la constante de raideur du levier (Figure 10). La pointe appuie sur la surface, elle est donc repoussée du fait du principe de Pauli, et le levier est dévié. La rétroaction s'effectue sur la mesure de la direction de la déviation. Les informations topographiques peuvent être générées à partir de deux sous-modes : le sous-mode force constante (ou mode hauteur) ou le sous-mode hauteur constante (ou mode force).

Le mode force constante (ou mode hauteur) est le plus couramment utilisé. La déflexion du cantilever est maintenue constante par une boucle d'asservissement qui pilote le déplacement de la céramique piézo-électrique sous l'échantillon. Les lignes d'équiforces sont donc interprétées comme la topographie de l'échantillon : le contraste de l'image est dû uniquement au déplacement en z de la céramique. Cette méthode permet de mesurer des variations en z de l'ordre de 0,01nm.

Pour le mode hauteur constante (ou mode force), la hauteur de l'échantillon est maintenue constante et la déflexion du cantilever est enregistrée. Ce mode donne également des informations topographiques mais il introduit une limite dans le choix de l'échantillon : il doit être très peu rugueux de manière à ce que le cantilever puisse suivre la surface sans être endommagé. Dans ces conditions, l'image est uniquement due aux variations locales de force. Ce mode est généralement utilisé pour obtenir des images à l'échelle atomique.

Toutefois, l'acquisition de données en mode contact suppose d'analyser des échantillons suffisamment rigides pour qu'ils ne soient pas endommagés lors du passage de la pointe (Baker *et al.* 2000). Ce problème peut être aggravé si l'échantillon est imagé à l'air car la force normale de la pointe sur l'échantillon peut être augmentée de 50nN. Travailler en milieu aqueux permet de s'affranchir partiellement de ce problème en réduisant les forces appliquées à 1nN ; force encore importante qui peut altérer les échantillons biologiques. Il a en effet été estimé à 50-100pN la force maximale à appliquer pour imager des protéines membranaires ou d'autres échantillons de nature biologique afin d'éviter leur endommagement et obtenir une résolution maximale (Muller *et al.* 1995; Muller and Engel 2002). Une autre critique de la technique doit être soulignée : pendant le processus d'acquisition en mode contact, la pointe AFM peut perturber l'échantillon. Néanmoins, il a été démontré par l'utilisation de la cristallographie à rayons X ou à électrons que la structure atomique des protéines était peu modifiée si la force de contact n'excédait pas 100pN (Muller *et al.* 1995; Muller and Engel 2002).

#### **4.5.2** Le mode non-contact

Le mode non-contact utilise les forces attractives. Difficile à gérer, il est très peu utilisé en pratique, car les forces attractives sont petites, et nécessitent un environnement à faible bruit. Par ailleurs, la couche de contamination vient largement affecter les mesures - le vide est plus que conseillé pour obtenir une résolution suffisante en pratique. La rétroaction s'effectue soit sur la déviation, soit sur l'amplitude des oscillations.

### 4.5.3 Le mode Tapping™

Même si des images de haute résolution (à l'échelle atomique) peuvent être obtenues grâce au mode contact, ce dernier n'est pas approprié pour imager des structures immobilisées sur des surfaces telles que des macromolécules isolées. En effet, Karrasch *et al.* (Karrasch *et al.* 1993) ont montré que de telles structures étaient fréquemment déplacées au cours de l'acquisition en mode contact. L'utilisation du mode Tapping™ permet de palier ce problème : la pointe ne rentre en contact avec l'échantillon qu'une fois par oscillation. Par rapport au mode contact, cette méthode réduit considérablement le temps de contact, les forces de friction et les forces latérales. Le mode Tapping™ représente donc la technique d'acquisition idéale pour la caractérisation d'échantillons mous ou élastiques. Une grande variété de biomolécules ont été ainsi imagées (Bezanilla *et al.* 1994; Dunlap *et al.* 1997; Guthold *et al.* 1999; Moller *et al.* 1999).

En surface de l'échantillon, le cantilever vibre près de sa fréquence de résonance (de 5 à 100kHz suivant les leviers et le type de milieu), à une amplitude suffisamment élevée (habituellement entre 20 et 100nm) de façon à ce que la pointe traverse la couche de contamination habituellement présente sur toute surface analysée. La pointe ne vient que périodiquement en contact avec l'échantillon et les forces de friction sont ainsi évitées. Quand la pointe interagit avec la surface (essentiellement de façon répulsive), l'amplitude décroît, car la fréquence de résonance change. La rétroaction se fait alors sur l'amplitude d'oscillation du levier.

L'image hauteur représente la topographie de la surface. La variation de l'amplitude d'oscillation est utilisée comme signal d'asservissement afin de corriger le déplacement en z, pour conserver l'amplitude constante et ainsi suivre la morphologie de surface. L'image amplitude représente quant à elle, la variation de la racine carrée de l'amplitude (RMS). La boucle de rétroaction permet de maintenir une amplitude d'oscillation constante en conservant un RMS constant du signal d'oscillation : l'interaction pointe – échantillon pendant l'acquisition reste ainsi constante.

Le mode Tapping™ est approprié pour l'analyse de polymères, d'échantillons biologiques et fonctionne également en milieu liquide. Malheureusement, ce mode manque de résolution. La précision maximale ( $\leq 1\text{nm}$ ) ne peut être atteinte qu'en mode contact. Cependant, le fait d'utiliser des fréquences proches de la fréquence de résonance du cantilever permet un contrôle relativement précis de l'oscillation du levier et d'obtenir par ce biais des images topographiques de protéines natives de grande qualité (Moller *et al.* 1999). De récents développements, ont permis l'élaboration du MAC Mode™ (Magnetically Activated Cantilever) (Han *et al.* 1997). Le principe consiste en un cantilever magnétique piloté directement par un champ magnétique oscillant. Le MAC Mode™ permet l'acquisition d'images de très haute résolution.

#### **4.6 Spectroscopie de force (SF)**

La SF permet de mesurer des forces de l'ordre du piconewton avec une résolution pouvant aller jusqu'à l'Ångström (Clausen-Schaumann *et al.* 2000; Fisher *et al.* 2000). Cette technique fournit des données essentielles et fondamentales sur les bases moléculaires à l'origine de nombreux phénomènes biologiques tels que la reconnaissance moléculaire (Florin *et al.* 1994; Lee *et al.* 1994; Hinterdorfer *et al.* 1996), le repliement des protéines (Rief *et al.* 1997; Oberhauser *et al.* 1998; Muller *et al.* 2002; Kedrov *et al.* 2006), la mécanique de l'ADN (Rief *et al.* 1999) ou encore l'adhésion cellulaire (Benoit *et al.* 2000).

En SF, des molécules individuelles ou des assemblages moléculaires sont greffés sur des pointes AFM *via* des agents pontants. Les analyses de la structure, de la dynamique, des interactions ou des propriétés mécaniques des molécules deviennent alors envisageables (Florin *et al.* 1994; Rief *et al.* 1997; Merkel *et al.* 1999; Cui and Bustamante 2000; Oesterhelt *et al.* 2000). Les pointes greffées sont approchées d'une surface définie et la force est mesurée grâce à la déflexion du cantilever.

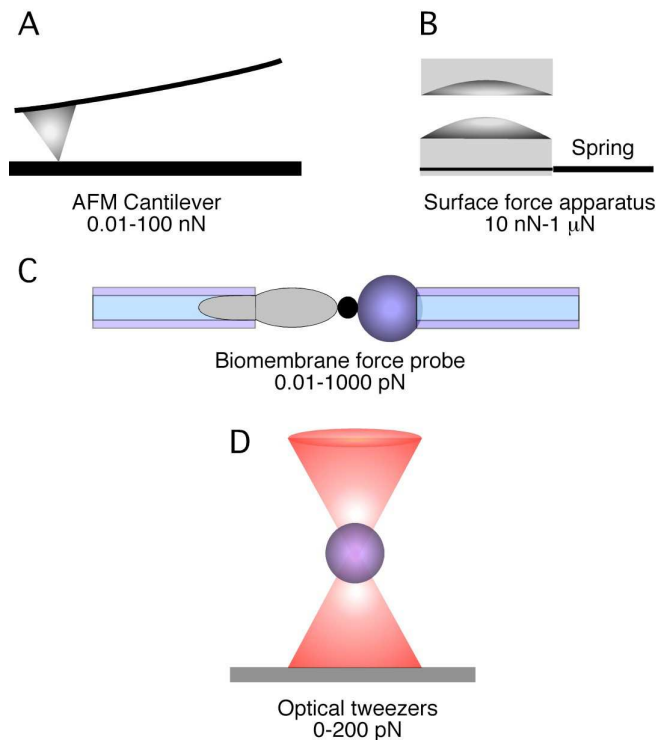
Trois autres méthodes de mesures de force à l'échelle nanométrique peuvent être évoquées (Figure 13). Citons dans un premier temps la sonde de force sur

biomembrane (Figure 13C) (Evans *et al.* 1995; Simson *et al.* 1998). Cette technique permet de greffer sur des billes de verre des groupements définis. L'une d'entre elles (bille-sonde) est greffée à la surface d'une hématie maintenue par une micropipette. L'hématie joue le rôle d'un ressort, dont la raideur peut être ajustée en faisant varier la pression appliquée au niveau de la pipette. La seconde bille, comportant un groupement complémentaire (bille-test) est approchée de la première à l'aide de la seconde pipette. Lorsque le contact est établi, la bille-test est écartée à une vitesse variable, sous un vidéomicroscope. La déformation de l'hématie permet de visualiser l'adhésion des billes et de calculer la force existant au moment de la rupture. La précision de cette technique est comprise entre 0,01 et 1000pN.

Les pinces optiques (Figure 13D), appelées aussi " pièges optiques ", reposent sur une technique émergente de micromanipulation (Ashkin *et al.* 1990; Ashkin 1997). Les pinces optiques piègent les particules diélectriques en utilisant une lumière intense dirigée. La lumière laser crée un piège harmonique avec une raideur d'environ  $0,1 \text{ pN.nm}^{-1}$  qui peut servir à exercer ou à mesurer des forces de 0 à 200 pN. La détection et le fonctionnement dans cette gamme de forces facilitent les expériences avec des biomolécules isolées. Toutefois, utilisée sur des spécimens biologiques, la lumière laser occasionne des effets indésirables dus à la chaleur ainsi que des dommages optiques.

Enfin, nous pouvons mentionner les appareils de mesures de forces de surface (Figure13B) (Leckband *et al.* 1992). Ces dispositifs permettent de mesurer les forces exercées entre deux plans de matériaux. Cette technique consiste à approcher l'une de l'autre deux sphères (ou une sphère et un plan) constituées des matériaux à étudier, et à mesurer la force s'exerçant entre elles quand la distance qui les sépare devient petite. La gamme des forces mesurées est plus élevée que celle des techniques citées précédemment (10nN à 1 $\mu$ N).

De toutes les méthodes de mesure de force disponibles, l'AFM présente une résolution élevée et une gamme d'acquisition importante (0,01 à 100nN, Figure 13A). L'AFM est donc particulièrement adaptée pour la caractérisation d'échantillons biologiques.



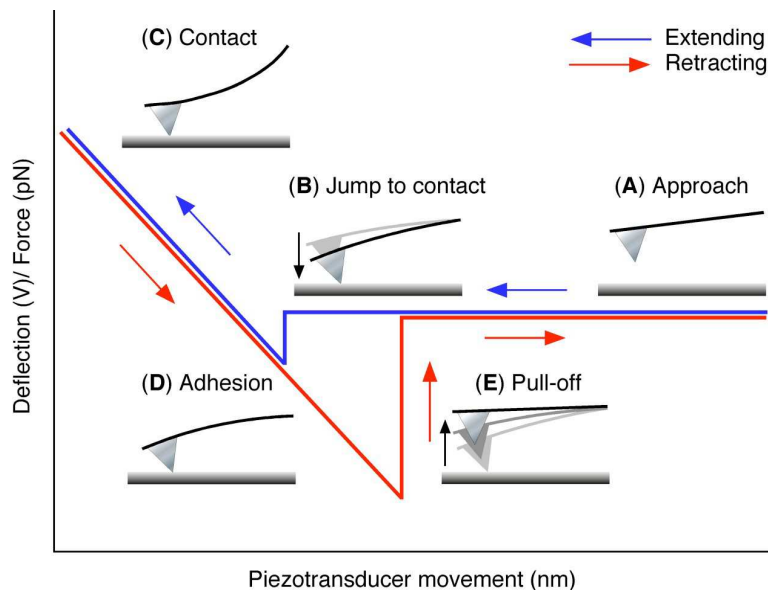
**Figure 13 – Techniques couramment utilisées pour la détermination des interactions avec des biomolécules.**

(A) Cantilever AFM, (B) Appareil de mesures de forces de surface, (C) Sonde de force sur biomembrane, (D), Pincettes optiques.

En SF, la surface est approchée et mise en contact avec la pointe greffée et est rétractée à une vitesse pré-définie. Pendant la rétraction, la (ou les) biomolécules greffées à l'apex de la pointe AFM sont éloignées de la surface puis étirées. L'éloignement de la pointe de la surface provoque une tension du système moléculaire et peut éventuellement induire un dépliement des biomolécules ou une dissociation du complexe moléculaire.

Considérons à présent des protéines comme exemple de biomolécules. L'élongation, le dépliement et la relaxation d'une chaîne polypeptidique se représente grâce à la courbe force-distance (Figure 14). Les courbes force-distance sont obtenues en enregistrant la déflexion du cantilever en fonction du déplacement vertical du scanner piezo-électrique. Cette acquisition permet d'obtenir des données brutes exprimées sous la forme d'un voltage en fonction de la distance, ces résultats pouvant être aisément convertis en courbe force-distance. La première conversion consiste à transformer le voltage acquis en déflexion du cantilever grâce à la pente

de la courbe de rétraction (lorsque la pointe est en contact avec la surface). Puis, en utilisant la loi de Hooke, la déflexion est transformée en force.



**Figure 14 – Courbe de force typique.**

Représentation schématique d'une courbe force-distance avec les étapes correspondant aux interactions de l'échantillon et de la pointe. La pente de la droite (C)-(D) est nécessaire pour la détermination de la déflexion du cantilever et donc pour la conversion de la courbe " voltage-distance " en courbe " force-distance " (à condition de connaître la constante de raideur du levier). La courbe de rétraction (rouge) représentée dans cet exemple est caractéristique du pic d'adhésion du cantilever avec une surface et non pas du dépliement d'une chaîne polypeptidique.

Sur une courbe de force, la distance entre deux pics d'adhésion distincts reflète l'augmentation de longueur d'une protéine après dépliement et étirement. L'amplitude, quant à elle, mesure la force nécessaire à apporter pour déplier la chaîne polypeptidique. Pour une protéine unique greffée sur une pointe AFM, les dépliements observés sur les courbes de force à des distances précises avec des amplitudes données sont caractéristiques de la protéine étudiée.

Une approche combinatoire faisant appel aux techniques de SF, de mesure d'angle de contact et d'analyse d'adsorption protéique peut permettre une meilleure compréhension des phénomènes d'interaction entre la Fn et des surfaces modèles. L'objectif de ce travail est donc de mettre en évidence une corrélation entre les propriétés physico-chimiques de quatre biomatériaux, l'adsorption d'une protéine adhésive (la Fn) et le comportement de trois lignées cellulaires mises à leur contact. Enfin, ce travail a pour but de caractériser le revêtement CEL et de démontrer que ce matériau peut représenter un dispositif de culture cellulaire alternatif pour des applications anti-adhésives, tant sur l'adsorption de Fn que sur l'adhésion cellulaire.



## Chapitre II Matériels et Méthodes

---

---

Validation biologique et physico-chimique d'un revêtement cellulosique de boîtes pour cultures cellulaires bioactives

# 1 Matériaux

Toutes les études de biologie cellulaire ont été réalisées sur 3 types de supports :

1. Des boîtes de polystyrène recouvertes d'une bicouche de polymères dérivés de la cellulose (CEL). Après activation des surfaces par traitement plasma, une première couche d'hydroxypropylméthylcellulose E4M 0,2% (w/v) (Colorcon, Dartford, UK) est déposée puis la carboxyméthylcellulose 7LF (Benacel®, Hercules International Limited, Rijswijk, Pays-Bas) est coulée, représentant la couche la plus superficielle. Le procédé de préparation a été développé par le Dr. LEGEAY au Centre de Transfert de Technologie du Mans et est décrit dans le brevet français n° 2 862 979 (03/06/2005) et mondial WO 2005054424 A2 n°10/580, 679 (22/11/2007). Une fois préparées, les boîtes sont stérilisées à l'oxyde d'éthylène puis conditionnées individuellement. Avant utilisation, les boîtes sont hydratées au minimum 1 heure en eau Ultrapure™ stérile.
2. Des boîtes de polystyrène recouvertes d'un polymère anti-adhésif, le PolyHEMA (Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Le polymère est préparé extemporanément en recouvrant les boîtes de polystyrène d'une solution de PolyHEMA (12mg.mL<sup>-1</sup>, éthanol 95°) afin d'obtenir une densité finale de 0,8mg.cm<sup>-2</sup>. L'éthanol 95° est évaporé pendant la nuit à 37°C. Les boîtes sont ensuite stérilisées en les incubant pendant 1h dans une solution de pénicilline (200U.mL<sup>-1</sup>, Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) streptomycine (200µg.mL<sup>-1</sup>, Gibco Invitrogen) puis en les rinçant trois fois en eau Ultrapure™ stérile.
3. Les boîtes de polystyrène traitées pour la culture cellulaire Nunclon™ (NUNC™, Roskilde, Danemark) sont utilisées comme contrôle adhésif (PSt).

Pour la caractérisation physico-chimique des surfaces et la détermination de l'interaction Fn-surface, un témoin supplémentaire est introduit :

4. Les boîtes de polystyrène de grade bactérien Greiner Bio-One (Greiner Bio-One SAS, Courtaboeuf, France) (PS).

Ce matériau, ne présente aucun intérêt pour la culture cellulaire mais il constitue un substrat très intéressant pour l'adsorption des protéines et son usage est courant dans cette optique (Dewez *et al.* 1998; Dewez *et al.* 1999; Shen *et al.* 2004).

## 2 Les lignées cellulaires

Trois lignées murines adhérentes de référence ont été choisies afin d'évaluer leur capacité à résister à des substrats anti-adhésifs :

1. Les fibroblastes murins Swiss 3T3 (ATTC®, CCL-92™, LGC Promochem Sarl, Molsheim, France) sont cultivés en milieu DMEM (Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal (Gibco Invitrogen), 2% de L-glutamine (Gibco Invitrogen), 100U.mL<sup>-1</sup> de pénicilline et 100µg.mL<sup>-1</sup> de streptomycine.
2. Les pré-ostéoblastes MC-3T3 E1 sous-clone 4 (ATTC®, CRL-2593™, LGC Promochem Sarl) sont cultivés en milieu MEM-α sans acide ascorbique (Gibco Invitrogen) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal, 1% de L-glutamine, 100U.mL<sup>-1</sup> de pénicilline et 100µg.mL<sup>-1</sup> de streptomycine.
3. Les cellules de mélanome B16F10 à haut pouvoir métastatique, nous ont été généreusement données par le Dr. LARUE (UMR CNRS 146, Institut Curie, Orsay, France). Ces cellules sont cultivées en milieu RPMI (Gibco Invitrogen) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal, 1% de L-glutamine, 100U.mL<sup>-1</sup> de pénicilline et 100µg.mL<sup>-1</sup> de streptomycine.

Les lignées cellulaires ont été maintenues à 37°C en atmosphère humide enrichie de 5% de CO<sub>2</sub> pour les MC-3T3 ou de 10% de CO<sub>2</sub> pour les Swiss 3T3 et les B16F10.

Pour l'ensemble des expérimentations, les cellules sont utilisées au stade de la préconfluence, deux jours après un passage. Les trois lignées sontensemencées

sur CEL, PolyHEMA et PSt à une densité de  $10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup> et incubées pendant 6, 24 ou 48h à 37°C.

### **3 Evaluation de la prolifération et répartition dans le cycle cellulaire**

Les cellules sur PSt sont détachées par une solution de 0,25% de trypsine-EDTA (Gibco Invitrogen) pendant 2 minutes à 37°C, puis 2 minutes à température ambiante. La trypsine est ensuite inhibée avec du sérum de veau foetal et les boîtes de Pétri rincées trois fois avec du milieu complet pour collecter l'ensemble des cellules.

Les cellules cultivées sur CEL et PolyHEMA sont collectées par centrifugation (5 minutes à 200×g) et resuspendues dans 500µL de trypsine-EDTA pendant 5 minutes à 37°C afin de dissocier les agrégats, puis 500µL de sérum sont ajoutés pour inhiber la trypsine.

Les cellules sont comptées avec un hématimètre de Malassez et la viabilité est évaluée par un test d'exclusion au Bleu Trypan (1/3, Sigma Aldrich). La prolifération cellulaire est représentée par le ratio  $N/N_0$ , où N est le nombre de cellules vivantes comptées à 24 ou 48h et  $N_0$ , le nombre de cellules à l'ensemencement.

Pour l'analyse du cycle cellulaire, les cellules ensemencées sur chaque matériau sont détachées par trypsination, comptées, collectées et lavées deux fois en PBS- EDTA (5mM). Les cellules sont ensuite resuspendues dans 250µL de PBS-EDTA puis fixées en ajoutant 750µL d'éthanol absolu glacé et enfin conservées à -20°C pendant 1 à 2 semaines. Les cellules sont lavées dans du PBS-EDTA puis remises en suspension dans une solution de PBS-EDTA contenant 0,1% de Triton X-100 (Sigma Aldrich), 40µg de RNase A (Sigma Aldrich) et 25µg d'iodure de propidium (Sigma Aldrich). Les échantillons sont alors incubés 15 minutes à l'obscurité. L'acquisition se fait par cytométrie en flux (Epics XL-MCL, FC, Beckman Coulter France SA, Roissy CDG, France) et par mesure, 10 000 évènements<sup>1</sup> sont

---

<sup>1</sup> Un évènement correspond au passage d'une cellule devant le laser.

étudiés. L'utilisation du logiciel MultiCycle (Phoenix Flow Systems, San Diego, US) permet de déduire le pourcentage de cellules en phase G1, S ou G2/M et donc d'obtenir la répartition des cellules dans le cycle cellulaire.

## 4 Etude de l'apoptose

### 4.1 *Annexine-V*

Le processus apoptotique induit une modification de l'asymétrie membranaire et s'accompagne de l'externalisation des phosphatidylsérines. L'annexine-V, en présence d'ions  $Ca^{2+}$ , se lie spécifiquement à ces phosphatidylsérines ainsi présentées et ce test devient un indicateur représentatif du phénomène apoptotique.

Sur PSt, les surnageants sont prélevés et les cellules sont détachées par incubation dans une solution de trypsine-EDTA à 0,25%. La trypsine est ensuite inhibée avec du sérum de veau foetal et les boîtes sont rincées trois fois en PBS. Les cellules cultivées sur CEL et PolyHEMA sont collectées par centrifugation pendant 5 minutes à 200×g et resuspendues avec de la trypsine-EDTA à 0,25% afin de dissocier les agrégats. La trypsine est inhibée avec du sérum de veau foetal et tous les échantillons sont soumis à une centrifugation de 5 minutes à 200×g.

En parallèle, pour chaque lignée cellulaire et chaque matériau, un contrôle positif d'apoptose a été testé. La staurosporine (Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) - inducteur d'apoptose reconnu (Zhang *et al.* 2004)- est remise en suspension dans du DMSO afin d'obtenir une solution mère à 2mM. Les cellules sont traitées avec 1µM de staurosporine pendant 24h pour les Swiss 3T3 et les B16F10 ou 6h pour les MC-3T3. Le cytomètre a été calibré en fonction des résultats obtenus pour ces contrôles positifs.

Les échantillons sont ensuite marqués à l'annexine-V en respectant le protocole du fournisseur (Beckman Coulter). Les échantillons sont lavés en PBS glacé et centrifugés pendant 5 minutes à 200×g. Les surnageants sont jetés et les culots cellulaires resuspendus dans du tampon de conjugaison 1X glacé (binding buffer,

Beckman Coulter France SA). 1µL d'annexine-V couplée à la fluoréscéine isothiocyanate (FITC, Beckman Coulter France SA) sont ajoutés à chacune des suspensions cellulaires. Les tubes sont conservés à l'obscurité pendant 15 minutes et les préparations sont analysées durant les 30 minutes suivant le marquage par cytométrie en flux. Par acquisition, 10 000 évènements au minimum sont analysés. Les cellules annexine-V positives détectées par le cytomètre sont rapportées au nombre total d'évènements analysés afin de déduire un pourcentage de cellules subissant l'apoptose (Tsuchimochi *et al.* 2005).

## 4.2 *Apostain*

L'Apostain est un immunomarquage basé sur la sensibilité accrue de l'ADN des cellules apoptotiques à une dénaturation thermique. L'ADN est dénaturé par la chaleur en présence de formamide. L'ADN simple brin ainsi mis en évidence est détecté par un Ac monoclonal qui lui est spécifique. Cette technique est plus sensible que la méthode TUNEL<sup>1</sup> pour distinguer les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques.

Les cellules cultivées sur les différents matériaux sont fixées avec une solution de méthanol 80% (v/v) glacé pendant 30 minutes, lavées et resuspendues dans 250µL de formamide pendant 10 minutes à 37°C puis pendant 5 minutes à température ambiante. Le formamide est inactivé en incubant l'échantillon dans une solution de PBS supplémentée par 1% (p/v) de lait, 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont incubées en présence de l'Ac monoclonal anti-ADN simple-brin (fabriqué chez la souris, AbCys, Paris, France) pendant 45 minutes à température ambiante. Le marquage est révélé par un Ac secondaire conjugué Cy-3 anti-souris (Jackson Immuno-Research, Soham, UK). L'Ac primaire est dilué au 1/10<sup>e</sup> dans une solution de PBS supplémenté par 5% de sérum de veau foetal et l'Ac secondaire est dilué au 1/200<sup>e</sup> dans une solution de PBS-lait 1%. Afin de montrer le marquage spécifique de l'ADN simple-brin, des contrôles négatifs sont effectués en

---

<sup>1</sup> TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling method : détection des extrémités 3'-OH (générées par la fragmentation de l'ADN) par des groupements FITC-dUTP, réaction catalysée par la terminale déoxynucléotidyl transférase (TdT).

l'absence de l'Ac monoclonal. Afin d'identifier toutes les cellules, les échantillons ont subi un contre-marquage au DAPI (Di Amino Phényl Indol, dilué au 1/1000<sup>e</sup>, D9564, Sigma-Aldrich). Les cellules sont cytocentrifugées (Shandon Cytospin® 3) puis chaque lame est montée au mowiol et observée au microscope à épifluorescence.

Sur chacune des lames, dix champs sont choisis au hasard (objectif ×20). Le nombre total de cellules est compté ainsi que le nombre de cellules présentant des corps apoptotiques. De ces données est déduit un pourcentage de cellules apoptotiques.

## 5 Adsorption de Fibronectine (Fn)

La Fn plasmatique humaine lyophilisée (Roche Diagnostics, Meylan, France) est reconstituée en eau Ultrapure™ stérile pour atteindre une concentration finale de 1mg.mL<sup>-1</sup> (protocole établi par le fournisseur).

Pour les adsorptions de protéines sur les différents types de surface, la Fn est diluée en PBS pH 7,4 stérile pour une concentration finale de 2µg.mL<sup>-1</sup> ou de 50µg.mL<sup>-1</sup>. Les surfaces sont incubées en présence de la solution de Fn pendant 45 minutes à 37°C puis rincées 3 fois 10 minutes en PBS pH 7,4 stérile à température ambiante (21-24°C). Durant toutes les expérimentations, les surfaces sont conservées en milieu aqueux afin d'éviter le démoillage et la désorption de Fn.

## 6 Morphologie cellulaire sur revêtement de Fn

Les pré-ostéoblastes MC-3T3 sont largement reconnus pour leur capacité à exprimer plusieurs intégrines impliquées dans la reconnaissance spécifique de la Fn dont  $\alpha_5\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$ . Pour ce type cellulaire, les liaisons Fn-intégrines sont particulièrement importantes dans l'expression des gènes et la minéralisation de la MEC (Stephansson *et al.* 2002). Cette lignée modèle est donc particulièrement adaptée pour nos études de reconnaissance des surfaces avant et après adsorption de Fn.

Les pré-ostéoblastes murins MC-3T3 E1 sous-clone 4 (ATTC®, CRL-2593™) sont cultivés en milieu MEM- $\alpha$  sans acide ascorbique (Gibco Invitrogen) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal, 1% de L-glutamine, 100U.mL<sup>-1</sup> de pénicilline et 100 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de streptomycine. Les cellules sont maintenues à 37°C en atmosphère humide enrichie de 5% de CO<sub>2</sub>.

Pour l'ensemble des expérimentations, les cellules sont utilisées au stade de la préconfluence, deux jours après un passage. Les MC-3T3 sontensemencées à une densité de 10<sup>4</sup> cellules.cm<sup>-2</sup> sur CEL, PolyHEMA, PSt et PS avec ou sans revêtement de Fn (adsorption à 2 ou 50 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> suivie de trois lavages en PBS). Les pré-ostéoblastes sont ensuite incubés pendant 4 heures à 37°C en milieu sans sérum.

## **7 Etudes topographiques par AFM**

La surface des échantillons avec (2 et 50 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) ou sans adsorption de Fn est imagée en milieu liquide (PBS pH 7,2) à l'aide d'un microscope à force atomique commercial (Nanoscope III AFM MultiMode, Veeco Metrology LLC, Santa Barbara, CA, Etats-Unis) équipé d'un scanner J (125  $\mu$ m x 125  $\mu$ m x 5  $\mu$ m) et d'une cellule liquide en quartz. Les images topographiques (256 x 256 pixels) sont acquises en mode contact à température ambiante (21-24°C) à l'aide de pointes "V" en nitrure de silicium Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (Microlevers, Veeco Metrology LLC, Santa Barbara, CA) possédant une constante de raideur théorique comprise entre 0,01 et 0,03 N.m<sup>-1</sup>, avec une force d'appui minimale (< 200 pN) et une vitesse de scan de 5-6 Hz. Le rayon de courbure des pointes utilisées est de l'ordre de ~20nm. Toutes les images présentées dans ce manuscrit sont des données brutes aplanies ("flattened raw data").

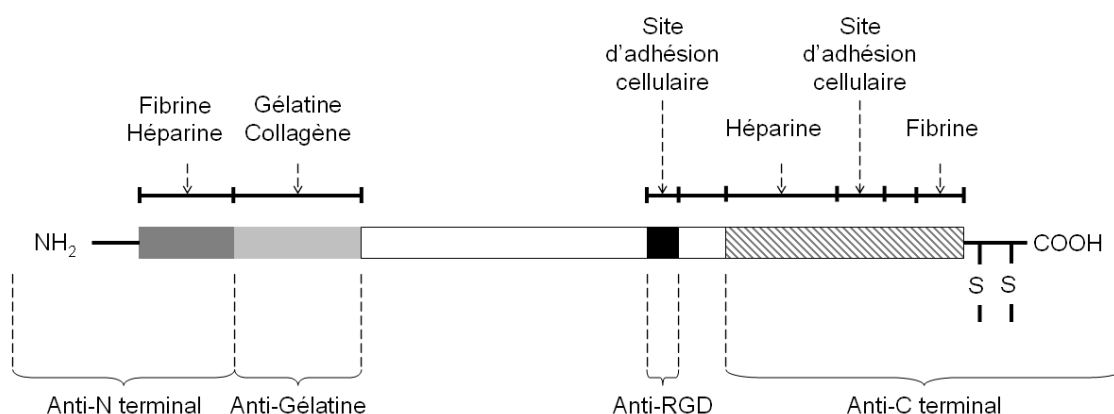


## 8 Tests ELISA

Suite à l'adsorption de Fn, les surfaces ont subi trois rinçages de 10 minutes en solution de PBS-0,1% Tween 20 et ont été saturées durant 45 minutes à 37°C dans une solution de PBS-0,25% BSA-0,1% Tween 20. Les échantillons ont été ensuite incubés pendant 1 heure à 37°C dans une solution d'Ac primaires (Tableau 3) dilués en PBS-0,25% BSA-0,1% Tween 20. Les sites de reconnaissance des Ac monoclonaux anti-Fn sont mis en évidence dans la Figure 15.

**Tableau 3 - ELISA – Ac primaires utilisés.**

| Ac primaire                                | Dilution             | Référence | Fournisseur           |
|--|----------------------|-----------|-----------------------|
| Anti-Fn (polyclonal)                       | 1/10000 <sup>e</sup> | A0245     | DAKO, Trappes, France |
| Anti-Fn domaine RGD<br>(monoclonal)        | 1/5000 <sup>e</sup>  | VMA1926   | AbCys, Paris, France  |
| Anti-Fn domaine C-terminal<br>(monoclonal) | 1/5000 <sup>e</sup>  | VMA1935   | AbCys, Paris, France  |
| Anti-Fn domaine N-terminal<br>(monoclonal) | 1/5000 <sup>e</sup>  | VMA1936   | AbCys, Paris, France  |
| Anti-Fn domaine Gélatine<br>(monoclonal)   | 1/5000 <sup>e</sup>  | VMA1892   | AbCys, Paris, France  |



**Figure 15 - Représentation schématique d'un monomère de Fn humaine.**

Schéma des sites de reconnaissance des différents Ac monoclonaux utilisés dans l'étude.

Après trois lavages de 5 minutes en PBS-0,1% Tween 20, les échantillons sont incubés durant 1 heure à 37°C avec une solution d'Ac secondaires couplés à la peroxydase (Tableau 4).

**Tableau 4 - ELISA – Ac secondaires utilisés.**

| Ac secondaire | Dilution             | Référence | Fournisseur                            |
|---------------|----------------------|-----------|--|
| Anti-lapin    | 1/10000 <sup>e</sup> | UP511380  | Uptima Interchim,<br>Montluçon, France |
| Anti-souris   | 1/1000 <sup>e</sup>  | UP446330  | Uptima Interchim,<br>Montluçon, France |

Les surfaces sont ensuite rincées trois fois 5 minutes en PBS-0,1% Tween 20 et incubées avec une solution contenant un substrat de la peroxydase (o-phenylenediamine, OPD, Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). La réaction chromogène est stoppée après au moins 2 minutes d'incubation par une solution d'acide chlorhydrique 1M et l'absorbance est lue à  $\lambda=490\text{nm}$ . Pour chaque Ac, trois expériences indépendantes ont été réalisées en triplicata, soit neuf points par condition.

## 9 Marquage de la Fn à la fluorescéine (fluo-Fn)

### 9.1 Préparation de la fluo-Fn

La première étape consiste à dissoudre le FITC (Sigma Aldrich) dans du DMSO afin d'obtenir une concentration finale de FITC de  $10\text{mg.mL}^{-1}$ . 10 $\mu\text{L}$  de FITC sont ensuite incubés pendant 1 heure à 37°C avec 1mL de Fn ( $1\text{mg.mL}^{-1}$ , Roche Diagnostics) préalablement resuspendue dans du tampon bicarbonate de sodium 0,1M pH 9. La Fn marquée est séparée du FITC sur une colonne Sephadex™ G-25 (PD-10, GE Healthcare Europe GmbH, Orsay, France) équilibrée avec du PBS pH 7,5. La première bande visible sur la colonne correspond à la protéine couplée à la fluorescéine et est éluée en premier lieu (lecture de l'absorbance à  $\lambda=280\text{nm}$ ). La seconde bande, quant à elle correspond au FITC qui n'a pas réagi (lecture de l'absorbance à  $\lambda=494\text{nm}$ , Figure 16).

La concentration en protéines des fractions collectées est évaluée grâce à la méthode de Bradford (Bradford 1976). Lorsque le bleu de Coomassie brillant G250 se fixe sur les protéines, son maximum d'absorption est déplacé de 465nm à 595nm. Cette fixation, due à des interactions ioniques, permet donc de doser les protéines par comparaison avec une gamme étalon de 0 à 10µg.mL<sup>-1</sup> de protéines (obtenue avec une solution de Fn à 1mg.mL<sup>-1</sup> dans de l'eau distillée). A 10µL d'échantillon, on ajoute 90µL d'eau Ultrapure™ et 900µL de réactif de Bradford (Tableau 5). Les absorbances sont lues à λ=595nm après agitation et incubation de 15 minutes à l'obscurité.

**Tableau 5 – Préparation du réactif de Bradford.**

| Solution mère                             | Réactif utilisé                         |
|---|---|
| 1g de Serva Blue G250                     | 3mL de solution mère                    |
| 200mL d'acide orthophosphorique 88% (p/p) | 8mL d'acide orthophosphorique 88% (p/p) |
| 100mL d'éthanol 95% (v/v)                 | 4mL d'éthanol 95% (v/v)                 |
| q.s.p. 1000mL avec de l'eau Ultrapure™    | q.s.p. 60mL avec de l'eau Ultrapure™    |

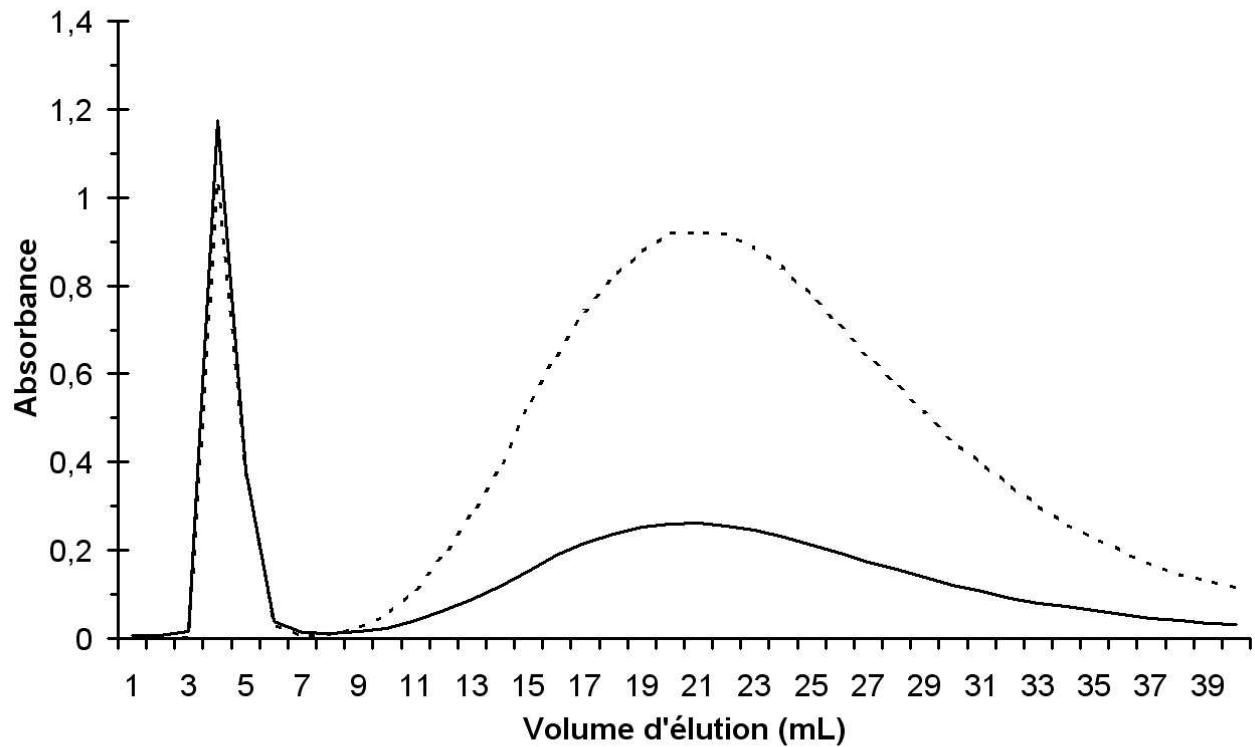
Pour chacun des échantillons contenant la protéine marquée, le nombre de molécules de fluorescéine par molécule de Fn est estimé :

$$[\text{fluorescéine}] / [\text{fluo-Fn}] = DO_{494\text{nm}} / (\epsilon_{\text{FITC}} \times [\text{fluo-Fn}])$$

où :

$\epsilon_{\text{FITC}}$  est préalablement déterminé grâce à la loi de Beer-Lambert en représentant la DO mesurée à λ=494nm de solutions étalon de FITC de concentrations connues. Le groupe isothiocyanate du FITC réagit avec les amines primaires et le groupe amino-terminal des protéines. La Fn plasmatique humaine contient 156 lysines et 2 groupes amino-terminal par dimère pour un total de 158 possibilités de greffage de la fluorescéine sur la protéine. Quel que soit l'échantillon considéré, le nombre de molécules de fluorescéine par dimère de Fn est toujours compris entre 15 et 20.

Enfin, les fractions contenant les plus fortes concentrations de fluo-Fn sont conservées à 10°C.



**Figure 16 - Diagramme d'élution de la fluo-Fn.**

La ligne pleine et en les pointillés correspondent à la DO mesurée pour chaque fraction à  $\lambda=280\text{nm}$  (dosage de Bradford) et  $\lambda=494\text{nm}$  respectivement.

## **9.2** *Quantification de la fluo-Fn adsorbée sur les différentes surfaces*

Après adsorption de fluo-Fn pendant 45 minutes à  $37^\circ\text{C}$ , les différentes surfaces sont rincées trois fois 10 minutes en PBS sans jamais les démoiller. Les surfaces subissent deux digestions protéiques de 1h à  $37^\circ\text{C}$  dans une solution de trypsine de concentration initiale  $20\mu\text{g.mL}^{-1}$ . L'intensité de fluorescence de la fluo-Fn

digérée est mesurée grâce à un spectrofluorimètre ( $\lambda_{\text{émission}}=535\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{excitation}}=485\text{nm}$ , Spectrafluor Plus, Tecan, Lyon, France). L'intensité de fluorescence obtenue est reportée sur une courbe standard obtenue à partir de solutions connues de fluo-Fn trypsinées : 0 ; 0.2 ; 0.5 ; 1 ; 1,5 et  $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Afin d'apprécier l'impact des nombreux lavages du protocole ELISA sur la désorption de Fn, un second protocole type " ELISA " a été appliqué. Les surfaces sont incubées dans une solution mère de fluo-Fn à  $2\mu\text{g.mL}^{-1}$  à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 45 minutes. Les matériaux sont ensuite rincés 3 fois 10 minutes dans une solution de PBS-0,1% Tween 20, saturés avec de la BSA pendant 45 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$  et les solutions d'Ac sont substituées par une solution de PBS-0,25% BSA-0,1% Tween 20. Après les derniers rinçages au PBS-0,1% Tween 20, la fluo-Fn adsorbée sur les différents échantillons est digérée 2 fois et la quantité de fluo-Fn récupérée est déduite d'après une courbe standard comme décrit précédemment.

## 10 Mesures des angles de contact

La mesure d'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface. La méthode consiste à mesurer l'angle entre la tangente du profil d'une goutte déposée sur un substrat et la surface du substrat. La mesure de l'angle de contact permet d'accéder à de nombreux paramètres et permet la discrimination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface. On peut ainsi déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface.

### 10.1 Méthode de la goutte posée et calcul de l'interaction polaire

$$P_{s/e}$$

Les angles de contact en condition statique sont mesurés sur les matériaux bruts. Des gouttes de  $5\mu\text{L}$  d'eau Ultrapure™ ou de diiodométhane (Fluka, Sigma Aldrich) sont déposées à l'aide d'une seringue sur la surface de chaque échantillon. Les valeurs des composantes des tensions de surface des liquides employés sont fournies dans le Tableau 6. Les angles de contact sont déterminés à température

ambiante (21-24°C) grâce à un dispositif de mesure couplé à un ordinateur (DSA-10, Krüss GmbH, Hamburg, Allemagne). L'angle de contact est déterminé à partir d'images digitalisées par un ordinateur *via* une caméra. Le logiciel associé permet de numériser le contour de la goutte par traitement des images. Il détermine ensuite l'angle de contact par des méthodes d'interpolation.

**Tableau 6 - Composantes des tensions de surface des différents liquides utilisés pour l'étude (van Oss 1994).**

| Liquide       | $\gamma$ (mJ.m <sup>-2</sup> ) | $\gamma^d$ (mJ.m <sup>-2</sup> ) | $\gamma^p$ (mJ.m <sup>-2</sup> ) | $\gamma_{l/e}$ (mJ.m <sup>-2</sup> ) |
|---------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| Eau           | 72,8                           | 21,8                             | 51                               |                                      |
| Octane        | 21,6                           | 21,6                             | 0                                | 50,8                                 |
| Diiodométhane | 50,8                           | 50,8                             | 0                                |                                      |

$\gamma$  est la composante totale du liquide considéré,  $\gamma^d$  est la composante dispersive,  $\gamma^p$  est la composante polaire et  $\gamma_{l/e}$  est la tension de surface entre le liquide et l'eau.

Nous avons choisi ici d'exprimer et de comparer les interactions polaires entre les différents substrats et l'eau ( $I_{s/l}^p$ ) sous la forme d'un travail d'adhésion, sans faire d'hypothèse sur l'expression de la partie polaire ( $\gamma^p$ ) de l'énergie de surface.

En reprenant l'équation (I.5), l'énergie interfaciale solide/liquide peut être exprimée comme (Fowkes 1962; Fowkes 1964a; Owens and Wendt 1969) :

$$\gamma_{s/l} = \gamma_s + \gamma_l - W^a \quad (\text{II.1})$$

où  $W^a$  est le travail d'adhésion qui peut être divisé en une composante polaire et dispersive :  $W^a = 2 \cdot [(\gamma_l^d \cdot \gamma_s^d)^{1/2}] + I_{s/l}^p$ .

La combinaison de l'équation (II.1) et de l'équation de Young (I.4) aboutit à :

$$I_{s/l}^p = \gamma_l \cdot (1 + \cos\theta) - 2 \cdot [(\gamma_l^d \cdot \gamma_s^d)^{1/2}] \quad (\text{II.2})$$

A sec, les valeurs de  $\gamma_s^d$  et  $I_{s/l}^p$  peuvent être déterminées d'après les angles de contact obtenus grâce à la méthode de la goutte posée en utilisant au moins un liquide apolaire et un liquide polaire.

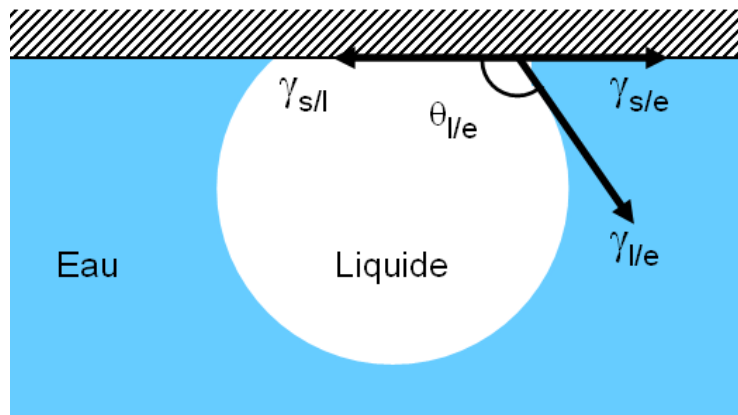
Pour chaque matériau, trois expériences indépendantes sont réalisées en triplicata (*i.e.* neuf échantillons par type de substrat) et quatre gouttes de diiodométhane ou d'eau Ultrapure™ sont déposées sur chaque surface : les valeurs d'angles de contact  $\theta$  représentent la moyenne de 36 mesures. Le diiodométhane est utilisé pour la détermination de  $\gamma_s^d$  et l'eau Ultrapure™ pour le calcul de l'interaction polaire  $I_{s/e}^p$ .

L'ensemble de ces expériences est réalisé à l'air et les surfaces sont sèches. Le but ultime de cette manipulation est de comparer la méthode de la goutte posée et la méthode en milieu liquide-liquide, où les surfaces sont hydratées. Nous souhaitons ainsi évaluer la répercussion de l'hydratation sur les valeurs des interactions polaires développées entre les surfaces et l'eau.

## ***10.2 Méthode de mesure en milieu liquide-liquide et calcul de l'interaction polaire $I_{s/e}^p$***

La méthode de mesure d'angles de contact en milieu liquide-liquide a été développée et décrite par Schultz afin de caractériser des solides de haute énergie de surface (Schultz *et al.* 1977b; Schultz *et al.* 1977a). Ces solides de haute énergie de surface sont habituellement mouillés par n'importe quel liquide de référence et leur énergie de surface ne peut être déterminée en utilisant des techniques de mesure d'angles de contact conventionnelles. Afin de décrire de telles surfaces, le montage doit être modifié : au lieu de mesurer l'angle de contact à l'air libre, la surface est immergée dans une phase liquide, une goutte d'un liquide de référence est déposée sur le substrat et l'angle de contact mesuré (Figure 17). Dans cette étude, la méthode en milieu liquide-liquide est choisie afin de mimer les conditions physiologiques et ainsi d'évaluer l'interaction polaire ( $I_{s/e}^p$ ) de biomatériaux ou de revêtements protéiques à leur surface. L'intérêt de cette méthode est aussi d'éviter

les problèmes liés à l'évaporation de la goutte posée, à sa contamination quand la goutte est à l'air libre et de s'affranchir de la pression d'étalement.



**Figure 17 - Mesure d'angle de contact en milieu liquide-liquide.**

L'équation de Young (I.4) adaptée à un système eau-liquide-solide – l'eau étant la phase dans laquelle le solide est immergé - devient :

$$\gamma_{s/e} = \gamma_{s/l} + \gamma_{l/e} \cdot \cos\theta_{l/e} \quad (II.3)$$

En adaptant l'équation (II.2) au système eau-liquide-solide, les deux équations suivantes sont obtenues, l'une pour le liquide testé, l'autre pour la phase aqueuse environnante :

$$\gamma_{s/l} = \gamma_s + \gamma_l - 2 \cdot (\gamma_s^d \cdot \gamma_l^d)^{1/2} - I_{s/l}^p \quad (II.4)$$

$$\gamma_{s/e} = \gamma_s + \gamma_e - 2 \cdot (\gamma_s^d \cdot \gamma_e^d)^{1/2} - I_{s/e}^p \quad (II.5)$$

Les termes  $I_{s/l}^p$  et  $I_{s/e}^p$  représentent les contributions polaires du travail d'adhésion pour les deux liquides : le liquide testé et la phase environnante, *i.e.* les interactions polaires entre un liquide donné et le solide.



En associant les équations (II.3), (II.4) et (II.5), la relation suivante est obtenue :

$$\gamma_l - \gamma_e + \gamma_{l/e} \cdot \cos\theta_{l/e} = 2 \cdot (\gamma_s^d)^{1/2} \cdot [(\gamma_l^d)^{1/2} - (\gamma_e^d)^{1/2}] + I_{s/l}^p - I_{s/e}^p \quad (\text{II.6})$$

Dans cette étude, le liquide de référence utilisé est un alcane pur qui n'a qu'une composante dispersive et qui ne présente qu'une très faible solubilité dans l'eau (Schultz *et al.* 1977a). Grâce au caractère apolaire de ce liquide de référence, le terme  $I_{s/l}^p$  de l'équation (II.6) peut être ignoré et on obtient :

$$I_{s/e}^p = 2 \cdot (\gamma_s^d)^{1/2} \cdot [(\gamma_l^d)^{1/2} - (\gamma_e^d)^{1/2}] - (\gamma_l - \gamma_e + \gamma_{l/e} \cdot \cos\theta_{l/e}) \quad (\text{II.7})$$

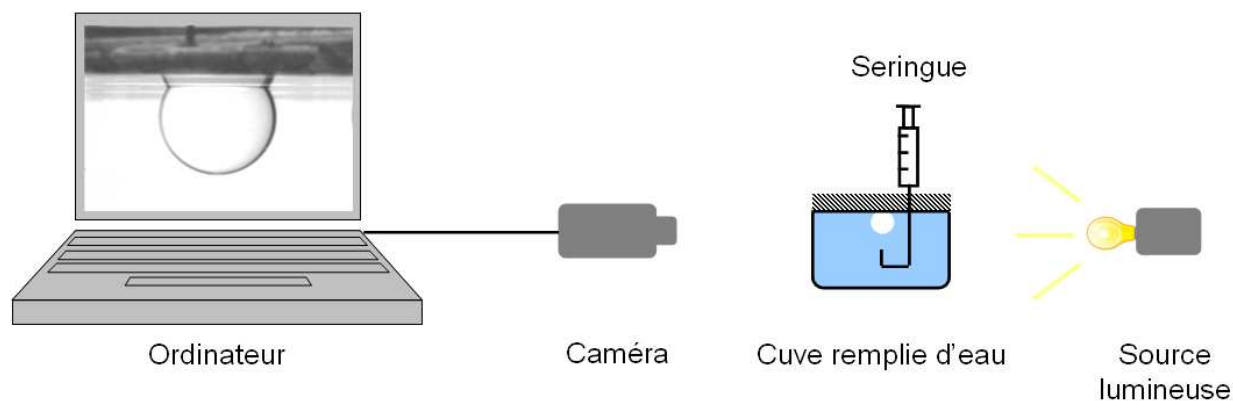
Afin de déterminer  $I_{s/e}^p$ , la composante dispersive de l'énergie de surface ( $\gamma_s^d$ ) doit être définie en premier lieu.  $\gamma_s^d$  ne peut pas être déterminé par la méthode de mesure d'angles de contact en milieu liquide-liquide en utilisant seulement un liquide de test purement dispersif. Pour déterminer directement ce terme, on pourrait penser à utiliser la méthode de la goutte posée en utilisant un liquide purement dispersif à haute tension de surface, comme le diiodométhane. Néanmoins, cela suppose de sécher les surfaces et de ne plus caractériser les biomatériaux ou les revêtements protéiques en conditions physiologiques.

En choisissant judicieusement le liquide test, on peut s'affranchir de la détermination de  $\gamma_s^d$  : si le liquide test a une composante dispersive ( $\gamma_l^d$ ) proche de la composante dispersive de l'eau ( $\gamma_e^d$ ), le terme " $2 \cdot (\gamma_s^d)^{1/2} \cdot [(\gamma_l^d)^{1/2} - (\gamma_e^d)^{1/2}]$ " de l'équation (II.7) peut être négligé par rapport à la contribution du second terme et l'équation (II.7) devient :

$$I_{s/e}^p \approx -\gamma_l + \gamma_e - \gamma_{l/e} \cdot \cos\theta_{l/e} \quad (\text{II.8})$$

Dans cette optique, l'octane a été choisi puisque sa composante dispersive ( $\gamma_l^d = 21,6\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) est très proche de la composante dispersive de l'eau ( $\gamma_e^d = 21,8\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ).

Afin de mesurer les angles de contact en milieu liquide, les échantillons bruts ou revêtus de Fn ( $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sont disposés sur un porte-échantillon inversé, adapté au positionnement du substrat dans un liquide *i.e.* la surface à analyser étant dirigée vers le bas (Figure 18).



**Figure 18 - Schéma du dispositif expérimental pour les mesures d'angles de contact en milieu liquide-liquide.**

Il est à noter qu'au cours des expérimentations suivantes, les surfaces brutes ou revêtues de protéines sont conservées en milieu aqueux pour éviter la désorption au contact de l'air : eau Ultrapure™ et PBS pH 7,4 respectivement. Les surfaces sont ensuite immergées horizontalement (Grundke *et al.* 1996) dans une cuve remplie d'eau Ultrapure™ (surfaces brutes) ou de PBS pH 7,4 (Fn pré-adsorbée). Afin d'empêcher la formation et le dépôt de bulles de gaz sur les surfaces, l'eau Ultrapure™ et le PBS sont dégazés grâce à une pompe à vide. Une microsiringue (Fluka, Sigma Aldrich) équipée d'une aiguille recourbée contenant de l'octane est positionnée dans la phase aqueuse et des gouttes d'alcane de  $10\mu\text{L}$  sont formées et déposées sur les surfaces à analyser. Les valeurs des composantes des tensions de surface des liquides employés sont fournies dans le Tableau 6. Les angles de contact sont déterminés à température ambiante ( $21\text{-}24^\circ\text{C}$ ) grâce à un dispositif de

mesure couplé à un ordinateur. L'angle de contact est déterminé d'après la même méthode citée précédemment.

La phase aqueuse dans laquelle ont été mesurés les angles de contact des surfaces revêtues de Fn est le PBS. Dans le calcul de l'interaction polaire de ces substrats, les valeurs des composantes de l'énergie interfaciale de l'eau sont utilisées. Il a été en effet vérifié que les angles de contact des gouttes d'octane déposées sur les surfaces brutes étaient similaires quelle que soit la phase aqueuse considérée (eau Ultrapure™ ou PBS). De plus, en mesurant la tension superficielle du PBS par la méthode de la lame de Wilhelmy et la tension interfaciale PBS/octane par la technique de l'anneau, on trouve pour le PBS :  $\gamma_{\text{PBS}} = 72,4\text{mJ.m}^{-2}$  et  $\gamma_{\text{I/PBS}} = 49,4\text{mJ.m}^{-2}$  (Tableau 6). Ces valeurs sont proches des valeurs de l'eau ( $\gamma_e = 72,8\text{mJ.m}^{-2}$  et  $\gamma_{\text{I/e}} = 50,8\text{mJ.m}^{-2}$ ), l'erreur commise dans les calculs devient alors négligeable.

Pour chaque matériau, trois expériences indépendantes sont réalisées en triplicata (*i.e.* neuf échantillons par type de substrat) et quatre gouttes d'octane sont déposées sur chaque surface : les valeurs d'angles de contact  $\theta$  représentent la moyenne de 36 mesures.

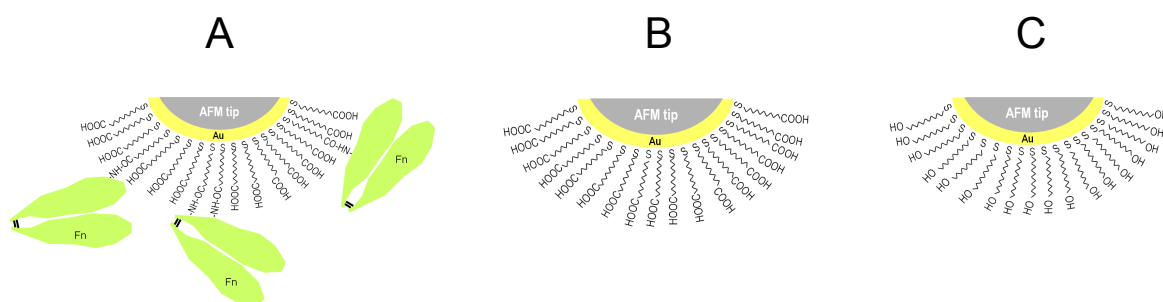
## 11 Spectroscopie de force

### *11.1 Greffage de la Fn sur les pointes AFM*

Les pointes AFM sont fonctionnalisées avec de la Fn selon la procédure suivante. Sur les pointes AFM sont déposées successivement une couche de chrome de 5nm d'épaisseur puis une couche d'or de 30nm d'épaisseur par évaporation par canon à électrons (FL400, Edwards, Crawley, Angleterre). Avant utilisation, les pointes revêtues d'or sont nettoyées par traitement UV-ozone pendant 5 minutes et rincées dans de l'eau Ultrapure™ et de l'éthanol absolu. Les pointes sont ensuite immergées pendant une nuit dans une solution d'éthanol contenant 1mM de thiols  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$  (11-mercapto undecanoic acid, Sigma Aldrich). Après lavages à l'éthanol et à l'eau Ultrapure™, les pointes sont activées pendant 30

minutes à température ambiante (21-24°C) avec de l'EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, Sigma Aldrich) et du NHS (N-hydroxysuccinimide, Sigma Aldrich) (El Kirat *et al.* 2005). Après cette étape d'activation, les pointes AFM sont très réactives, essentiellement vis-à-vis des amines primaires (NH<sub>2</sub>) présentes sur la chaîne latérale des lysines. Les pointes sont ainsi greffées durant 1 heure dans une solution de Fn à 10µg.mL<sup>-1</sup> (pointe-Fn, Figure 19A). Les pointes négatives témoin sont obtenues après les avoir immergées pendant une nuit dans une solution 1mM de thiols HS(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>COOH (pointe-COOH), Figure 19B) ou de thiols HS(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>OH (11-mercapto undecanol, pointe-OH, Figure 19C, Sigma Aldrich).

De plus, afin de prouver l'efficacité du greffage de Fn sur les pointes AFM, les courbes de force sont acquises avant et après digestion des pointes avec de la trypsine (concentration finale = 20µg.mL<sup>-1</sup>).



**Figure 19 - Schéma des pointes utilisées pour la spectroscopie de force.**

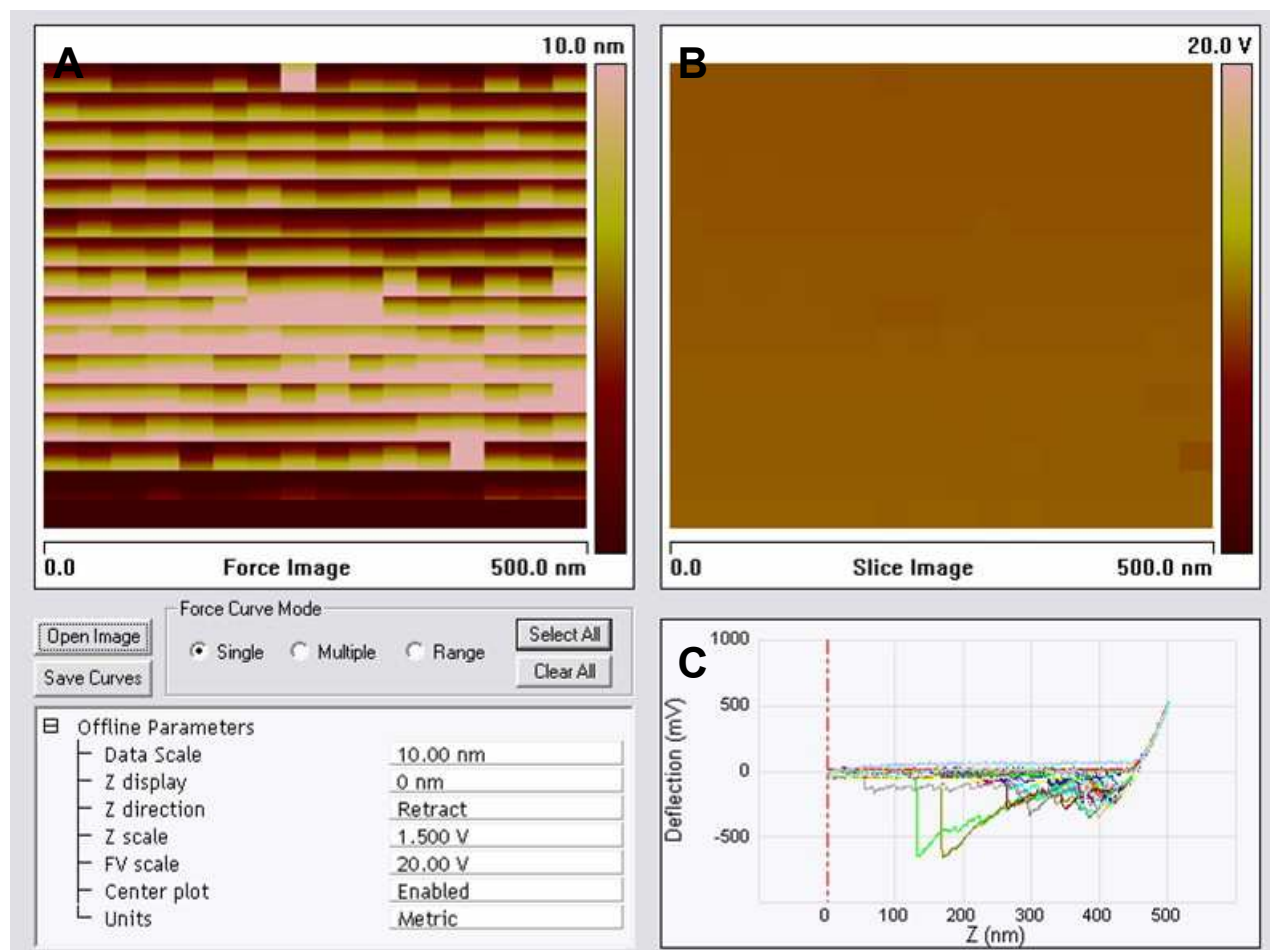
## 11.2 Acquisitions des forces en mode force-volume

Afin de caractériser l'affinité instantanée des différents types de pointes AFM pour les surfaces, des courbes de force sont acquises en milieu liquide (PBS pH 7,2) à l'aide d'un microscope à force atomique commercial (Nanoscope III AFM Multimode, Veeco Metrology LLC) en mode force volume. Le mode force volume permet l'acquisition des courbes de force en concomitance avec des données topographiques (Figure 20). L'ensemble de ces données peut être utilisé pour

caractériser les forces d'interaction entre un échantillon et une pointe AFM en 2 ou 3D et ainsi corrélérer les forces aux informations topographiques.

Les cartes d'adhésion et les images topographiques (16 × 16 points) ont été acquises à température ambiante (21-24°C). Les paramètres de départ imposés pour chaque enregistrement sont les suivants : Z scan start= 250nm et Ramp size= 500nm. D'autre part, les forces d'adhésion sont enregistrées sur trois zones de 500×500nm<sup>2</sup> pour une vitesse de scan comprise entre 1 et 2Hz.

Pour les pointes greffées avec la Fn, une série supplémentaire de manipulations est réalisée afin d'établir une relation entre le temps de contact de la pointe -Fn et la surface, et la force d'adhésion résultante. Ainsi, pour caractériser l'affinité de la Fn pour les surfaces à plus long-terme, différents temps de contact pointe/échantillon sont testés : 0ms, 50ms, 200ms, 500ms et 1000ms.



## **Figure 20 – Exemple d’acquisition de courbes de force en mode force – volume.**

(A) Carte d’adhésion. (B) Image topographique correspondant à la carte d’adhésion. (C) Courbes de forces correspondant à la carte d’adhésion.

## **12 Analyse statistique**

Une analyse statistique a été menée sur tous les résultats à l’exception des angles de contact et de la spectroscopie de force. Pour chaque analyse statistique, trois expériences indépendantes ont été réalisées en triplicata, soit neuf points par condition. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Nos travaux portant sur de petits échantillons et ne répondant pas à des lois Gaussiennes, des tests non-paramétriques ont été choisis pour comparer les résultats entre eux. Les données étant des variables continues et non appariées, les tests de Kruskal-Wallis (KW) et de Mann-Whitney (MW) ont permis, respectivement, l’analyse de groupes de données ou des comparaisons deux à deux (StatView SAS 2000, SAS Institute, Cary, NC).

## Chapitre III Résultats

---

## **1 Morphologie cellulaire sans revêtement de Fn**

Les fibroblastes Swiss 3T3, les pré-ostéoblastes MC-3T3 et les cellules de mélanome B16F10 ont été cultivées sur CEL durant 24 et 48h. La surface anti-adhésive contrôle est le PolyHEMA et le support adhésif témoin est le PSt. Toutes les lignées cellulaires s'attachent et s'étalent sur PSt alors qu'elles présentent une morphologie agrégée à la fois sur CEL et PolyHEMA (Figure 21). A 24h, les agrégats de B16F10 sont plus gros que ceux des deux autres lignées cellulaires.



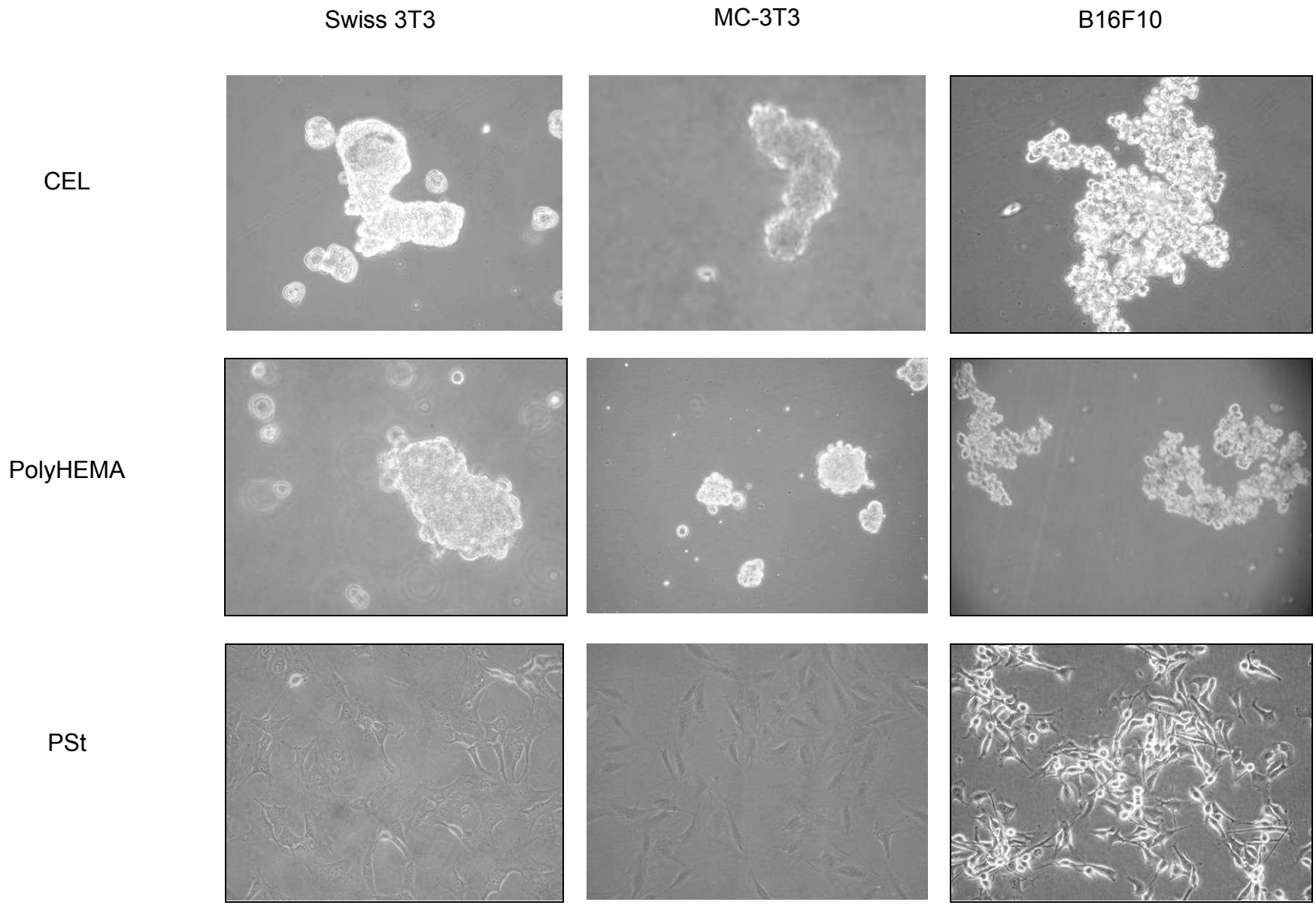


Figure 21 - Morphologie des trois lignées cellulaires sur CEL, PolyHEMA et PSt après 24h de culture sans Fn (objectif x20).

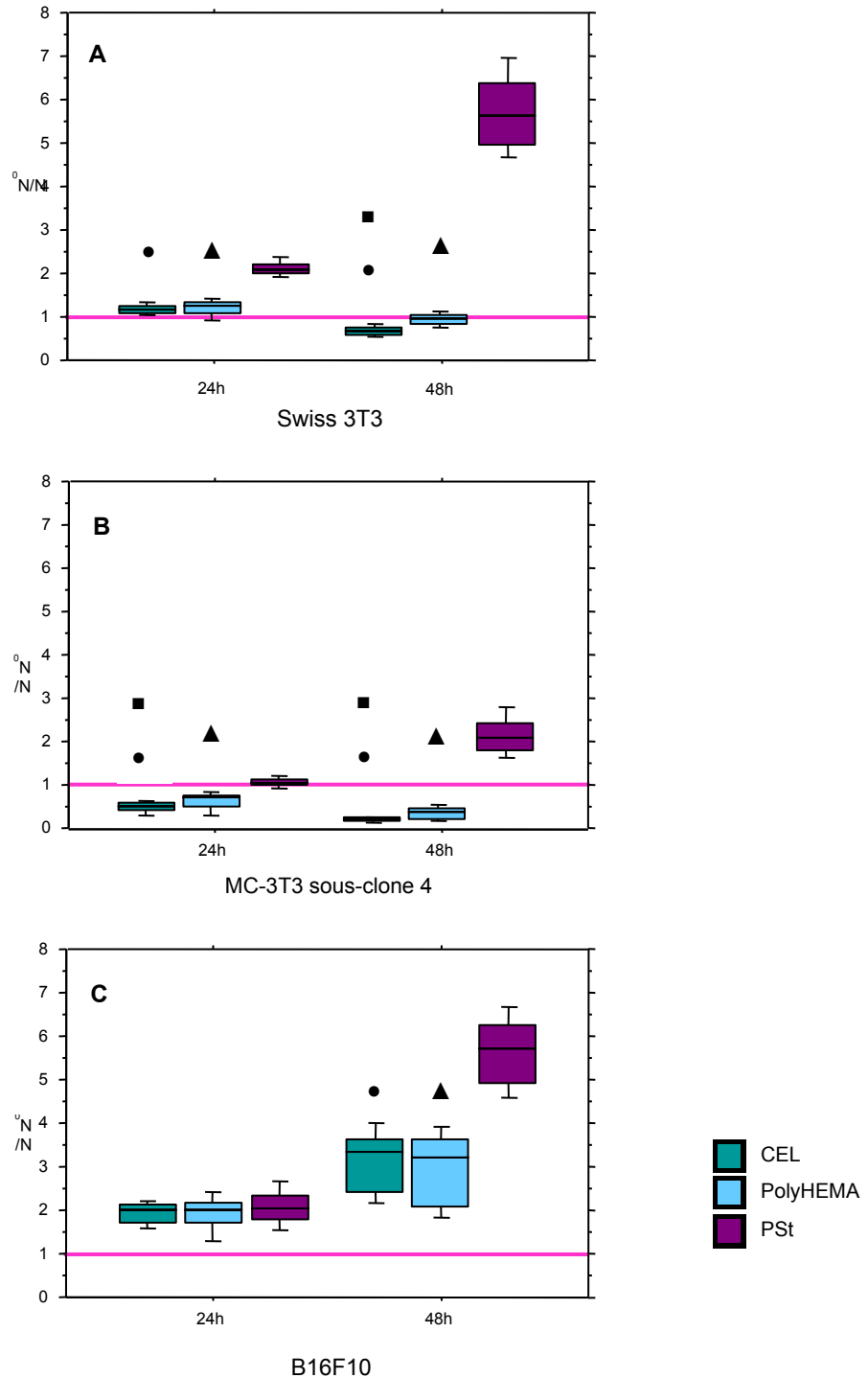
## 2 Evaluation de la prolifération

Les indices de prolifération ont été calculés. Des différences ont été mises en évidence entre les lignées cellulaires et les supports de culture utilisés (Figure 22).

24h après l'ensemencement, l'indice de prolifération des Swiss 3T3 (Figure 22A) est comparable sur CEL et PolyHEMA ( $1,2 \pm 0,1$  et  $1,2 \pm 0,2$ , respectivement,  $p=0,1646$  MW). Sur PSt, le taux de prolifération est significativement supérieur ( $2,1 \pm 0,2$ ,  $p<0,0001$ , MW, CEL vs PSt et PolyHEMA vs PSt) à ceux observés pour les deux supports anti-adhésifs. Après 48h de culture, la prolifération diminue significativement plus sur CEL ( $0,7 \pm 0,1$ ) que sur PolyHEMA ( $0,9 \pm 0,1$ ,  $p<0,0001$ , MW). Au contraire, sur PSt les cellules continuent à proliférer ( $5,7 \pm 0,9$ ,  $p<0,0001$ , MW, CEL vs PSt et PolyHEMA vs PSt).

L'indice de prolifération des pré-ostéoblastes MC-3T3 (Figure 22B) cultivés pendant 24h sur CEL ( $0,5 \pm 0,1$ ) est significativement inférieur à celui des cellules cultivées sur PolyHEMA ( $0,6 \pm 0,2$ ,  $p=0,0017$ , MW) ou sur PSt ( $1,1 \pm 0,1$ ,  $p<0,0001$ , MW). Sur CEL, 48h après l'ensemencement, cet indice est très fortement abaissé ( $0,2 \pm 0,1$ ) et est significativement différent de celui calculé pour PolyHEMA ( $0,4 \pm 0,1$ ,  $p=0,0004$ , MW) ou PSt ( $2,2 \pm 0,5$ ,  $p<0,0001$ , MW).

A 24h, les cellules de mélanome B16F10 (Figure 22C) présentent, un taux de prolifération similaire quel que soit le matériau considéré (CEL,  $1,9 \pm 0,3$  ; PolyHEMA,  $1,9 \pm 0,4$  ; PSt,  $2,1 \pm 0,4$ ,  $p=0,3713$ , NS, KW). Les indices de prolifération des B16F10 cultivées durant 48h sur CEL ( $3,1 \pm 0,7$ ) ou PolyHEMA sont également similaires ( $p=0,5326$ , MW). Sur PSt, au contraire, les cellules ont proliféré par rapport aux supports anti-adhésifs ( $5,7 \pm 0,8$ ,  $p<0,0001$ , MW, CEL vs PSt et PolyHEMA vs PSt).



**Figure 22 - Prolifération cellulaire sur CEL, PolyHEMA et PSt après 24 et 48h.**

La prolifération cellulaire est représentée par l'indice  $N/N_0$ .  $N$  est le nombre total de cellules comptées à 24 ou 48h et  $N_0$  le nombre à  $T=0$ . (A) Swiss 3T3, (B) MC-3T3, (C) B16F10. Les résultats sont présentés sous la forme de graphes en boîte représentant trois expériences indépendantes, chacune répétée trois fois. Une ligne pleine met en évidence l'indice de prolifération = 1, soit le nombre de cellules à l'ensemencement. Les symboles (■, ●, ▲) montrent des différences de prolifération significatives ( $p < 0.05$ , MW) entre les matériaux pour un temps donné : ■ CEL vs PolyHEMA, ● CEL vs PSt, ▲ PolyHEMA vs PSt. Nombre d'échantillons pour chaque condition :  $n=9$ .

### 3 Analyse du cycle cellulaire

La distribution des cellules dans le cycle cellulaire après 48h de culture a été étudiée sur les trois supports (Tableau 7).

La majorité des fibroblastes Swiss 3T3 cultivés sur CEL ( $82,6 \pm 2,9\%$ ) et sur PolyHEMA ( $81,7 \pm 2,6\%$ ) est bloquée en phase G1 du cycle cellulaire. Aucune différence significative n'est à noter entre ces deux matériaux ( $p=0,1715$ , NS, MW). Lorsque les cellules sont cultivées sur PSt, seulement  $54 \pm 5,2\%$  de la population totale se trouve en phase G1 du cycle cellulaire ( $p<0,0001$ , MW, CEL vs PSt et PolyHEMA vs PSt).

Sur CEL,  $67,6\% \pm 2,7$  de la population des MC-3T3 est bloquée en phase G1. Ce pourcentage s'élève à  $70,5 \pm 1,2\%$  ( $p<0,0001$ , MW) lorsque les cellules sont cultivées sur PolyHEMA et n'est que de  $61,8 \pm 3,2\%$  sur PSt ( $p<0,0001$ , MW).

La majorité des cellules de mélanome B16F10 est également bloquée en phase G1, après 48h de culture sur CEL ( $83,7 \pm 1,7\%$ ) ou sur PolyHEMA ( $85,4 \pm 2,4\%$ ,  $p=0,0089$ , MW). Sur PSt, seulement  $57,1 \pm 1,8\%$  de la population est dans cette phase du cycle cellulaire ( $p<0,0001$ , MW, CEL vs PSt et PolyHEMA vs PSt).

Pour les trois lignées, les pourcentages élevés de cellules en phase G1 sur CEL et PolyHEMA s'accompagnent d'une faible proportion de cellules en phase S-G2/M. Ces résultats sont ainsi en accord avec les taux de prolifération précédemment observés.

**Tableau 7 - Répartition des trois lignées dans le cycle cellulaire sur les trois supports de culture.**

|           |            | CEL          | PolyHEMA     | PSt        |
|-----------|------------|--------------|--------------|------------|
| Swiss 3T3 | % G1       | 82,6 • ± 2,9 | 81,7 ▲ ± 2,6 | 54 ± 5,2   |
|           | % S – G2/M | 17,4 • ± 2,9 | 18,3 ▲ ± 2,6 | 46 ± 5,2   |
| MC-3T3    | % G1       | 67,6 ■ ± 2,7 | 70,5 ▲ ± 1,2 | 61,8 ± 3,2 |
|           | % S – G2/M | 32,4 ■ ± 2,7 | 29,5 ▲ ± 1,2 | 38,2 ± 3,2 |
| B16F10    | % G1       | 83,7 ■ ± 1,7 | 85,4 ▲ ± 2,4 | 57,1 ± 1,8 |
|           | % S – G2/M | 16,3 ■ ± 1,7 | 14,6 ▲ ± 2,4 | 42,9 ± 1,8 |

Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) et sont présentés sous la forme Moyenne ± Déviation Standard de trois expériences indépendantes chacune répliquée trois fois. Les symboles (■, •, ▲) montrent des différences de prolifération significatives ( $p < 0.05$ , MW) entre les matériaux : ■ CEL vs PolyHEMA, • CEL vs PSt, ▲ PolyHEMA vs PSt. Nombre d'échantillons pour chaque condition :  $n=9$ .

## 4 Etude de l'apoptose

Les pourcentages de cellules en apoptose précoce ont été suivis par le marquage à l'annexine-V des phosphatidylsérines externalisées à la surface des cellules (Figure 23).

Le pourcentage de cellules Swiss 3T3 apoptotiques (Figure 23A) est significativement plus élevé sur CEL ( $4,6 \pm 0,8\%$ ) que sur PolyHEMA ( $3,7 \pm 0,8\%$ ,  $p=0,0305$ , MW) après 24h de culture. Seulement  $1,3 \pm 0,2\%$  de cellules positives à l'annexine-V ont été détectées sur PSt ( $p=0,0003$ , MW, CEL vs PSt). 48h après l'ensemencement, le nombre de cellules apoptotiques est augmenté sur CEL ( $4,9 \pm 1\%$ ) et ce résultat est supérieur à la population annexine-V positive trouvée sur PolyHEMA ( $3,5 \pm 0,8\%$ ,  $p=0,0071$ , MW) ou sur PSt ( $0,7 \pm 0,2\%$ ,  $p=0,0003$ , MW).

L'analyse de la prolifération des MC-3T3 montre que, cultivée sur CEL et PolyHEMA, la population des pré-ostéoblastes décroît très rapidement. Pour l'analyse de l'apoptose précoce, il a donc été décidé d'introduire un temps de culture supplémentaire, 6h (Figure 23B). 6h après l'ensemencement,  $4,2 \pm 1\%$  de cellules MC-3T3 positives sont détectées sur CEL,  $1,7 \pm 0,3\%$  sur PolyHEMA ( $p=0,0003$ ,

MW) et  $1,1 \pm 0,5\%$  sur PSt ( $p=0,0003$ , MW). A 24h,  $17,3 \pm 4,3\%$  de MC-3T3 sur CEL sont apoptotiques contre seulement  $10,9 \pm 3,2\%$  sur PolyHEMA ( $p=0,0031$ , MW). Sur le contrôle d'adhésion cellulaire, PSt, très peu de pré-ostéoblastes sont entrés dans un processus apoptotique ( $1,6 \pm 0,9\%$ ) et ce pourcentage est très significativement inférieur à celui observé sur CEL ( $p=0,0003$ , MW). Après 48h d'incubation sur CEL,  $14,6 \pm 1,8\%$  des cellules présentent une positivité au marquage contre seulement  $10,5 \pm 2,1\%$  pour PolyHEMA ( $p=0,0017$ , MW) et  $1,2 \pm 0,5\%$  sur PSt ( $p=0,0003$ , MW).

Le marquage à l'annexine-V des cellules de mélanome B16F10 (Figure 23C) sur CEL ( $2 \pm 0,3\%$ ), PolyHEMA ( $2,2 \pm 0,4\%$ ) et PSt ( $2 \pm 0,7\%$ ) est similaire à 24h pour les trois supports ( $p=0,3908$ , NS, KW) aussi bien qu'à 48h ( $1 \pm 0,5\%$  ;  $1,2 \pm 0,3\%$  ;  $0,8 \pm 0,5\%$ , respectivement,  $p=0,0894$ , NS, KW).

Le test à l'annexine-V met en évidence une sensibilité accrue à l'apoptose des pré-ostéoblastes MC-3T3 et des fibroblastes Swiss 3T3 lorsque ces cellules sont cultivées sur supports anti-adhésifs. Cependant, peu de cellules B16F10 entrent en apoptose quel que soit le support utilisé.

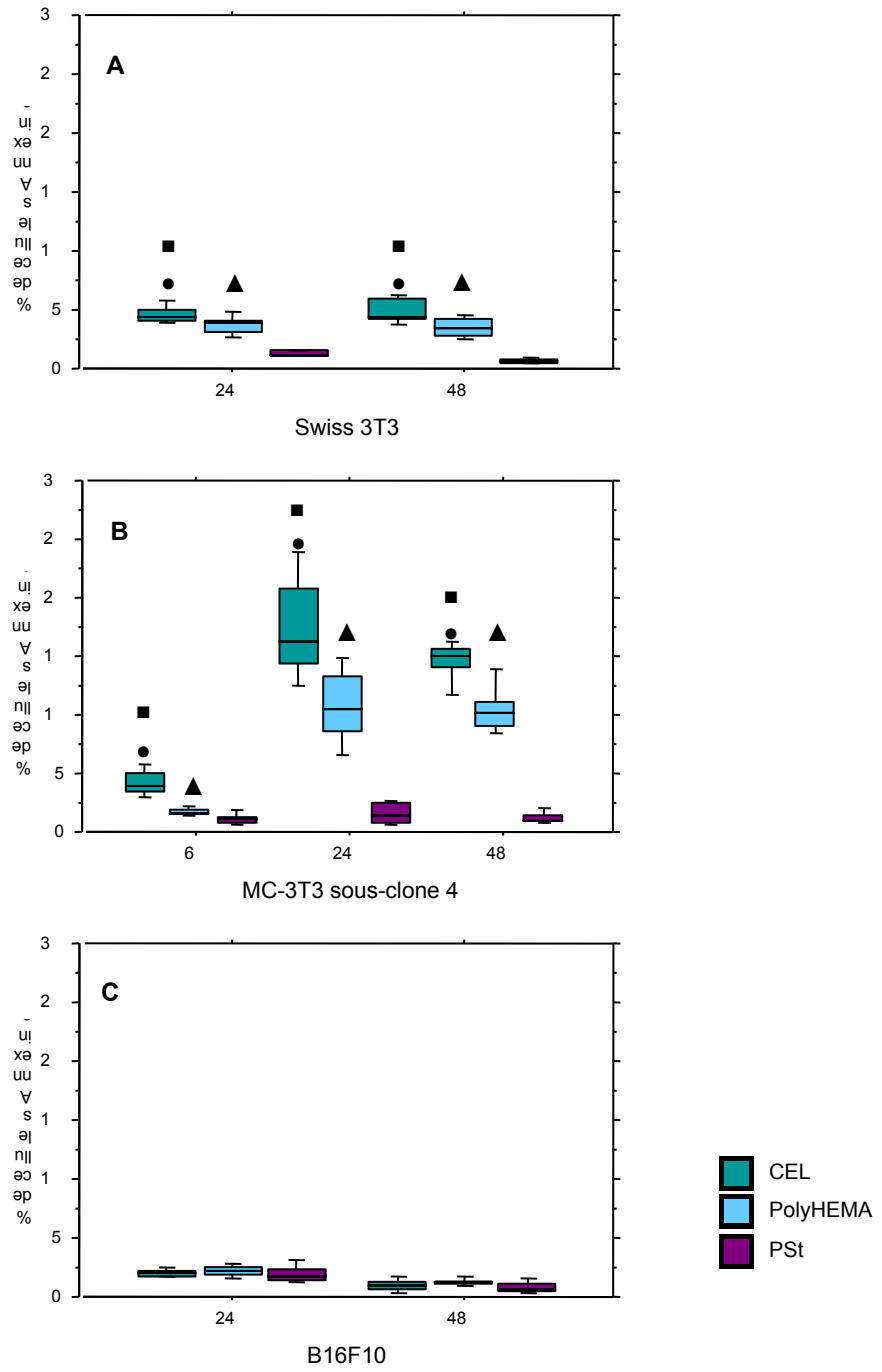


Figure 23 - Marquage à l'Annexine-V.

Mise en évidence des phosphatidylsérines sur la membrane externe des cellules par marquage à l'Annexine-V et analyse au cytomètre de flux (A) Swiss 3T3, (B) MC-3T3, (C) B16F10 cultivées sur CEL, PolyHEMA et PSt durant 6, 24 et 48h. Les résultats sont présentés sous la forme de graphes en boîte représentant trois expériences indépendantes, chacune répétée trois fois. Les symboles (■, ●, ▲) montrent des différences de prolifération significatives ( $p < 0.05$ , MW) entre les matériaux pour un temps donné : ■ CEL vs PolyHEMA, ● CEL vs PSt, ▲ PolyHEMA vs PSt. Nombre d'échantillons pour chaque condition :  $n=9$ .

Le test Apostain a également été utilisé pour détecter l'apoptose induite par les supports anti-adhésifs (Tableau 8).

Le pourcentage de fibroblastes Swiss 3T3 positifs à l'Apostain après 24h de culture sur CEL ( $11,3 \pm 4\%$ ) est significativement plus élevé que sur PolyHEMA ( $7,9 \pm 3,1\%$ ,  $p=0,0022$ , MW). Sur PSt, significativement moins de cellules ont été marquées ( $2,1 \pm 2,2\%$ ,  $p < 0,0001$ , MW, CEL vs PSt et PolyHEMA vs PSt). Après 48h d'incubation,  $12,9 \pm 5,8\%$  de cellules sur CEL sont apoptotiques contre seulement  $9,2 \pm 4,2\%$  sur PolyHEMA ( $p=0,0025$ , MW). Très peu de cellules sont marquées sur PSt à ce temps de culture ( $0,9 \pm 0,9\%$ ,  $p < 0,0001$ , MW, CEL vs PSt et PolyHEMA vs PSt).

Des résultats similaires sont trouvés pour les pré-ostéoblastes MC-3T3 : à 24h, plus de cellules positives sont mises en évidence sur CEL ( $11,9 \pm 4,4\%$ ) que sur PolyHEMA ( $9 \pm 5,2\%$ ,  $p=0,0102$ , MW) ou sur PSt ( $1,3 \pm 1,1\%$ ,  $p < 0,0001$ , MW). Des différences sont également observées à 48h. Les cellules apoptotiques observées sur CEL ( $9,5 \pm 3,8\%$ ) et sur PolyHEMA ( $9 \pm 4,8\%$ ,  $p=0,5115$ , NS, MW) sont plus nombreuses. Seulement  $0,6 \pm 0,7\%$  de marquage positif est décelé sur PSt ( $p < 0,0001$ , MW, CEL vs PSt et PolyHEMA vs PSt).

Le test Apostain confirme également les résultats obtenus par le marquage à l'annexine-V sur les cellules de mélanome B16F10. Les pourcentages de cellules apoptotiques à 24h ne sont pas significativement différents pour CEL, PolyHEMA et PSt ( $2,8 \pm 4,5\%$  ;  $2 \pm 1,7\%$  ;  $1,2 \pm 1,4\%$ , respectivement,  $p=0,4321$ , NS, KW). Après 48h de culture, le nombre de cellules positives à l'Apostain trouvé pour chacun des matériaux anti-adhésifs est similaire :  $2,5 \pm 2,8\%$  sur CEL et  $5,6 \pm 9,5\%$  sur



PolyHEMA ( $p=0,9513$ , NS, MW). Toutefois, moins de marquage est présent sur les cellules cultivées sur PSt ( $0,2 \pm 0,5\%$ ,  $p=0,0026$ , MW, CEL vs PSt).

Pris dans leur ensemble, les résultats suggèrent que les diminutions significatives des taux de prolifération des cellules Swiss 3T3 et MC-3T3 cultivées sur supports anti-adhésifs s'accompagnent d'un arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire ainsi que d'une induction de l'apoptose. Les cellules cancéreuses B16F10 semblent, quant à elles, présenter une résistance accrue à l'apoptose lorsqu'elles sont cultivées sur CEL ou PolyHEMA.

**Tableau 8 - Détection de l'apoptose tardive par immunomarquage Apostain.**

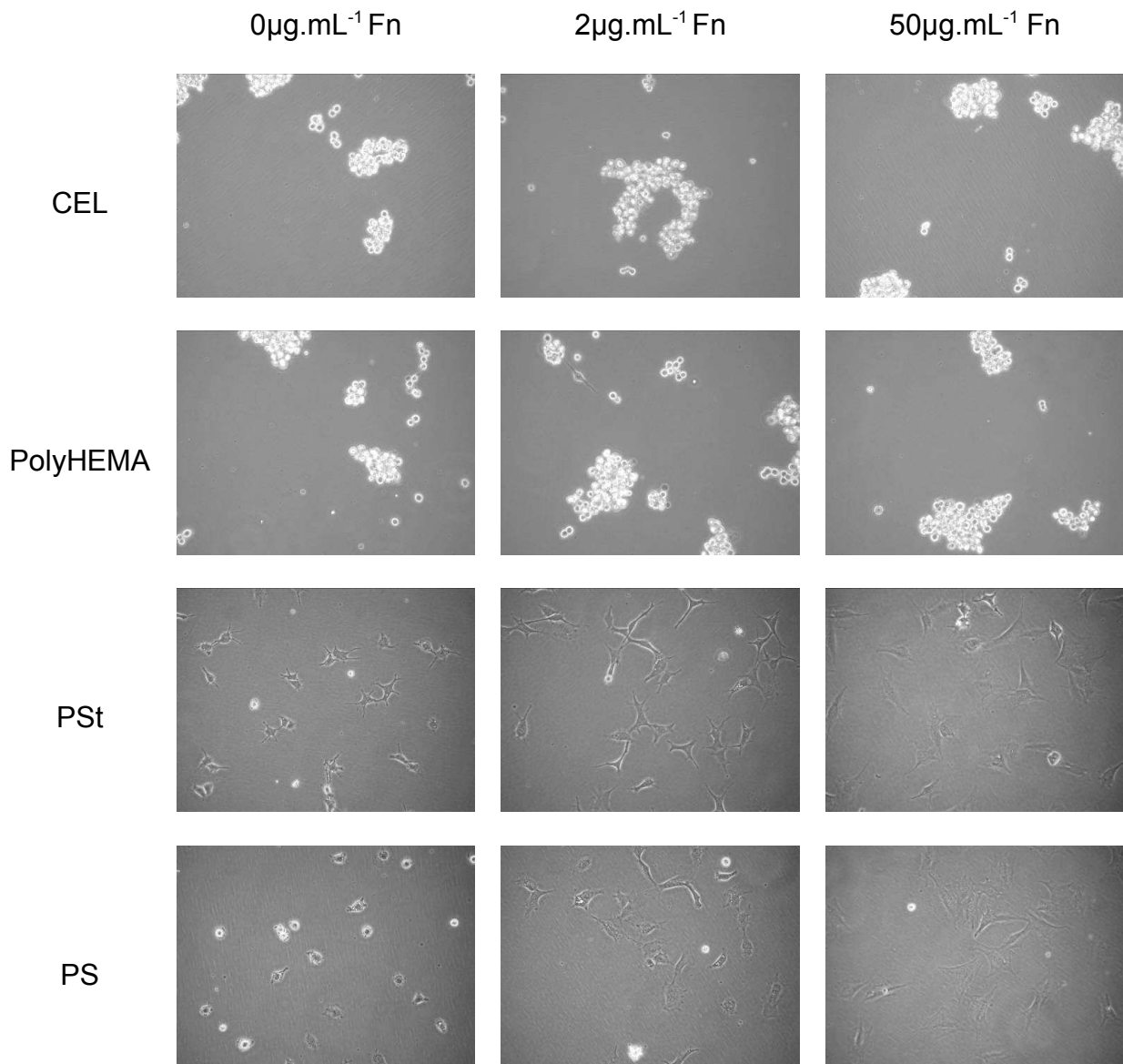
|           |     | CEL           | PolyHEMA    | PSt       |
|-----------|-----|---------------|-------------|-----------|
| Swiss 3T3 | 24h | 11,3 ■• ± 4   | 7,9 ▲ ± 3,1 | 2,1 ± 2,2 |
|           | 48h | 12,9 ■• ± 5,8 | 9,2 ▲ ± 4,2 | 0,9 ± 0,9 |
| MC-3T3    | 24h | 11,9 ■• ± 4,4 | 9 ▲ ± 5,2   | 1,3 ± 1,1 |
|           | 48h | 9,5 • ± 3,8   | 9 ▲ ± 4,8   | 0,6 ± 0,7 |
| B16F10    | 24h | 2,8 ± 4,5     | 2 ± 1,7     | 1,2 ± 1,4 |
|           | 48h | 2,5 • ± 2,8   | 5,6 ▲ ± 9,5 | 0,2 ± 0,5 |

Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) et sont présentés sous la forme Moyenne ± Déviation Standard de trois expériences indépendantes chacune répliquée trois fois. Les symboles (■, •, ▲) montrent des différences de prolifération significatives ( $p<0.05$ , MW) entre les matériaux pour un temps donné : ■ CEL vs PolyHEMA, • CEL vs PSt, ▲ PolyHEMA vs PSt. Nombre d'échantillons pour chaque condition :  $n=9$ .

## 5 Morphologie cellulaire sur les matériaux revêtus de Fn

Le comportement des pré-ostéoblastes est caractérisé sur chaque matériau avec ( $2$  et  $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ou sans revêtement de Fn après 4h de culture en milieu sans sérum (Figure 24). Sur CEL et PolyHEMA, quel que soit le revêtement considéré, les cellules n'adhèrent pas au support et s'organisent en agrégats de taille équivalente. Ces observations suggèrent que la Fn n'est pas capable de s'adsorber sur ces deux surfaces ou que les molécules de Fn adsorbées sont dans une conformation inappropriée à l'adhésion et à l'étalement des cellules.

Dans les expériences réalisées sans revêtement de Fn, les cellules ont la capacité de s'attacher sur les deux types de polystyrène (PSt et PS) mais elles ne s'étalent que sur PSt. Après adsorption de Fn et quelle que soit la concentration étudiée, les cellules s'attachent et s'étalent sur PSt et PS.



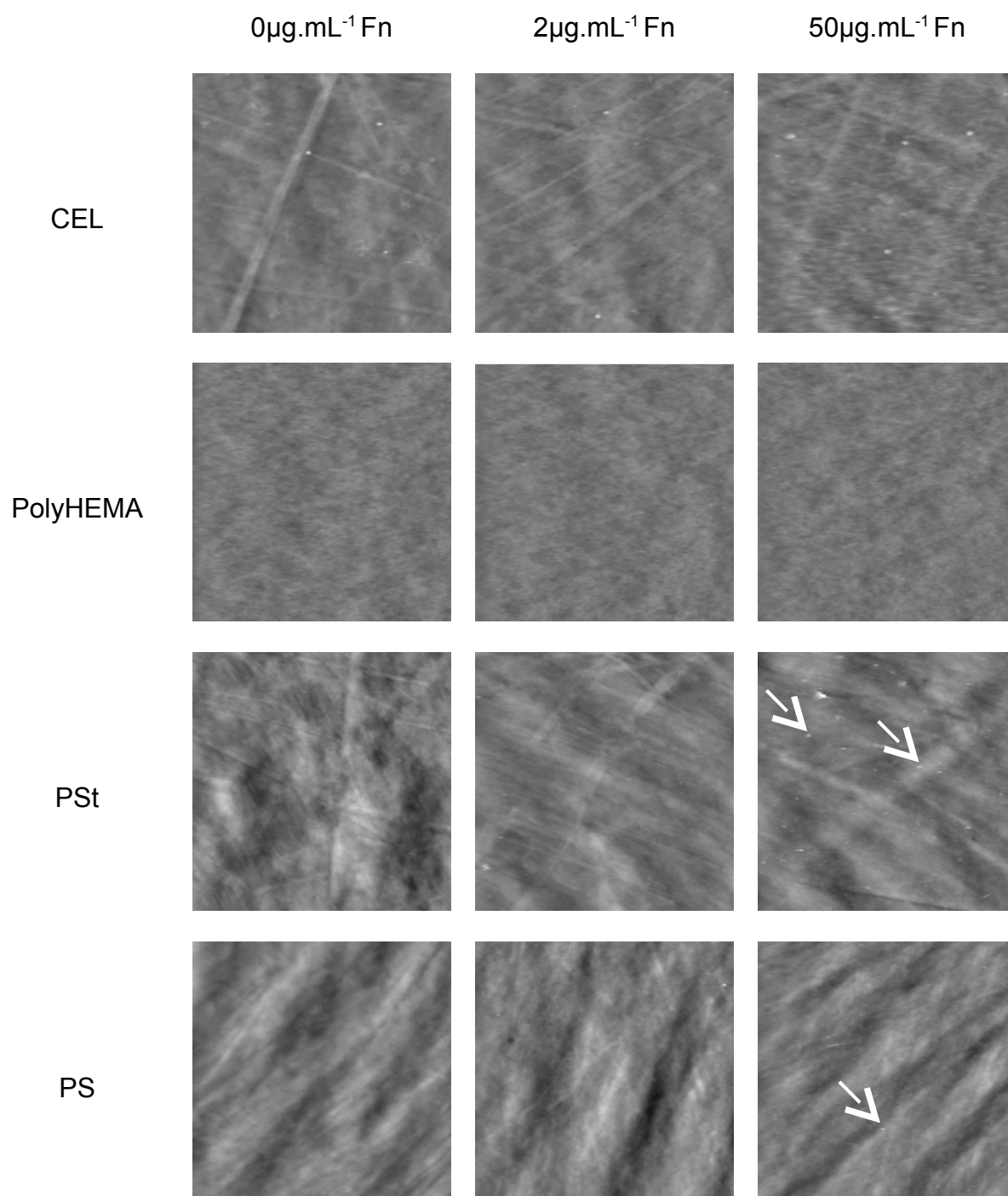
**Figure 24 - Morphologie cellulaire des pré-ostéoblastes MC-3T3, avec ou sans pré-adsorption de Fn (0, 2 et 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).**

Les cellules sont mises en culture sur CEL, PolyHEMA, PSt et PS pendant 4h en milieu sans sérum (objectif  $\times 20$ ).

## 6 Topographie et rugosité des surfaces

La topographie de chacun des substrats est analysée par AFM en milieu liquide (PBS pH 7,2). Les images AFM des substrats bruts révèlent la présence de longues fibres étendues de polystyrène sur CEL, PSt et PS (Figure 25). Sur CEL, quelques spots sont également visibles ce qui pourrait correspondre à la préparation initiale de la surface avec l'introduction de HPMC et CMC. La comparaison des images obtenues pour les deux matériaux à base de polystyrène (PSt et PS) montre que PSt est une surface plus homogène ( $R_{\text{rms PSt}} = 2,5 \pm 0,3\text{nm}$ ) et moins accidentée que PS ( $R_{\text{rms PS}} = 4,8 \pm 0,8\text{nm}$ ). La surface de PSt prend un aspect " fondu " et ce lissage est probablement induit par le traitement corona du substrat afin de le rendre utilisable pour la culture cellulaire. L'analyse AFM du PolyHEMA suggère que cette surface est homogène et lisse. Même si ce polymère a été initialement coulé sur du PS, aucune fibre de polystyrène n'est visible : le polymère est assez épais pour recouvrir les fibres de polystyrène.

Après adsorption de Fn à  $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ , la rugosité des différentes surfaces n'est pas significativement changée par rapport à leurs équivalents bruts (Tableau 9). En augmentant la concentration de Fn ( $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), la topographie ainsi que de le  $R_{\text{rms}}$  de CEL et PolyHEMA ne présentent aucune modification notable. Toutefois, quelques spots apparaissent sur PSt et PS ce qui pourrait correspondre à des agrégats de protéines. En terme de rugosité, aucun changement significatif n'est observé pour PS avec ou sans revêtement de Fn ( $R_{\text{rms PS}} = 4,8 \pm 0,8\text{nm}$  ;  $R_{\text{rms PS-}50\mu\text{g.mL}^{-1}\text{Fn}} = 4,0 \pm 0,4\text{nm}$ , NS, MW). Au contraire, sur PSt, une fine granulosité est mise en évidence s'accompagnant d'une augmentation significative du  $R_{\text{rms}}$  ( $R_{\text{rms PSt}} = 2,5 \pm 0,3\text{nm}$  ;  $R_{\text{rms PS-}50\mu\text{g.mL}^{-1}\text{Fn}} = 3,1 \pm 0,3\text{nm}$ ,  $p=0,0203$ , MW).



**Figure 25 - Images AFM acquises sur CEL, PolyHEMA, PSt et PS avec ou sans pré-adsorption de Fn (0, 2 et 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).**

Les substrats sont imagés en tampon PBS pH 7,2 (10 $\times$ 10 $\mu\text{m}^2$ , z=50nm). Les flèches indiquent de possibles molécules ou agrégats de Fn adsorbés.

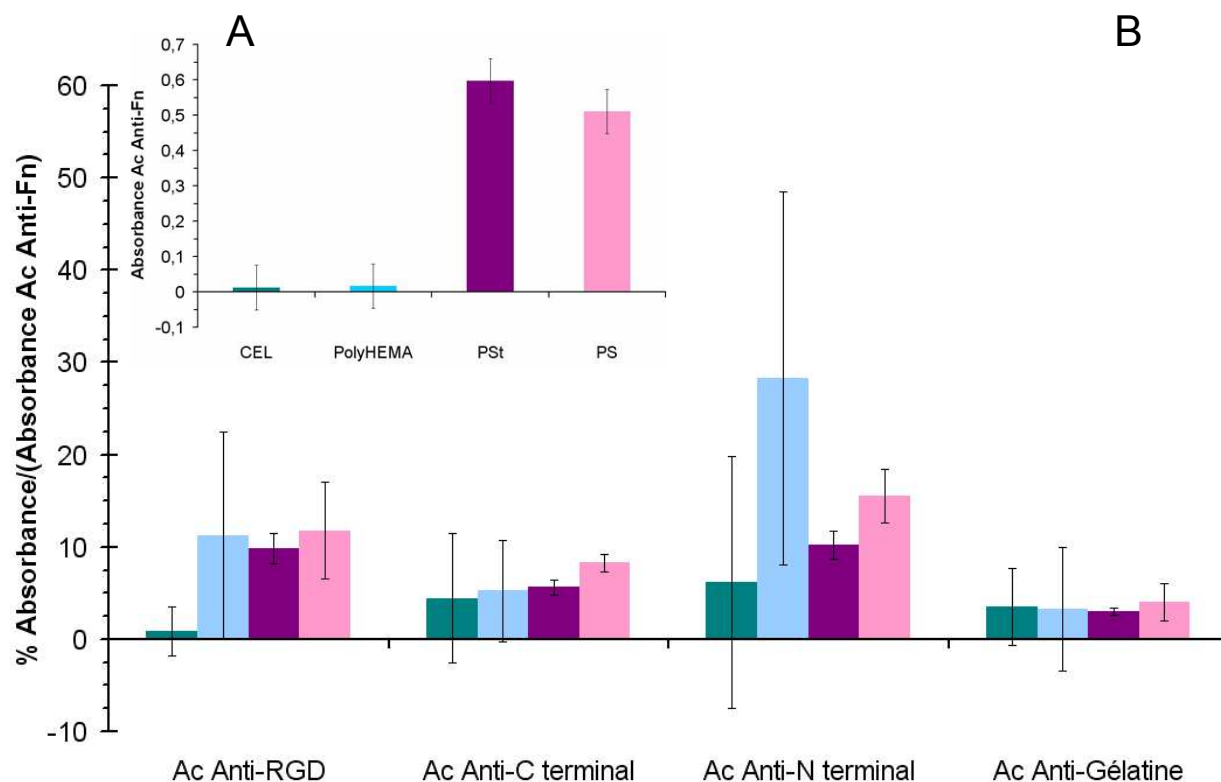
**Tableau 9 – Valeurs de  $R_{rms}$  pour chaque matériau revêtu ou non de Fn (0, 2 et  $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).**

| Substrat | $R_{rms}$ (nm)            | $R_{rms}$ (nm)            | $R_{rms}$ (nm)             | Statistiques   |
|----------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--|
|          | $0\mu\text{g.mL}^{-1}$ Fn | $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ Fn | $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ Fn |  |
| CEL      | $3,5 \pm 1,0$             | $2,5 \pm 1,2$             | $2,9 \pm 0,7$              | $p=0,2277$ , NS, KW  |
| PolyHEMA | $1,6 \pm 0,1$             | $1,6 \pm 0,1$             | $1,6 \pm 0,1$              | $p=0,5255$ , NS, KW  |
| PSt      | $2,5 \pm 0,3$             | $2,6 \pm 0,2$             | $3,1 \pm 0,3$              | $p=0,0203$ , KW<br>0 vs $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ Fn, $p=0,6547$ , NS, MW<br>0 vs $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ Fn, $p=0,0185$ , MW<br>2 vs $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ Fn, $p=0,0118$ , MW |
| PS       | $4,8 \pm 0,5$             | $4,5 \pm 0,6$             | $4,1 \pm 0,4$              | $p=0,0865$ , NS, KW  |

Nombre d'échantillons :  $5 < n < 9$ . Les tests statistiques sont considérés comme étant significatifs pour une valeur de  $p < 0.05$ . En premier lieu, un test global de KW est effectué. S'il se révèle être significatif, les matériaux sont comparés deux à deux (MW).

## 7 Quantification et conformation de la Fn adsorbée

Afin de quantifier la Fn adsorbée sur les surfaces et d'appréhender sa conformation, un test ELISA-modifié est réalisé. Différents Acs sont choisis : l'Ac polyclonal afin d'évaluer la quantité totale de Fn adsorbée sur chaque substrat et l'utilisation des Acs monoclonaux pour apprécier les modifications de conformation de la Fn ; les zones de reconnaissance spécifiques de ces Acs monoclonaux étant décrites sur la figure 15.



**Figure 26 - Quantification de la Fn adsorbée sur CEL, PolyHEMA, PSt et PS et caractérisation de sa conformation par test ELISA.**

(A) Quantification de l'adsorption de Fn par un Ac polyclonal sur les quatre matériaux. (B) Caractérisation de la conformation de la Fn adsorbée par des Ac monoclonaux : Ac anti-RGD, Ac anti-C terminal, Ac anti-N terminal, Ac anti-Gélatine. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un ratio normalisé : (Absorbance Ac monoclonal)/(Absorbance Ac polyclonal). Nombre d'échantillons pour chaque condition : n=9.

La figure 26A correspond à la quantification de la Fn adsorbée à la surface des quatre matériaux. Sur les échantillons hydrophiles, CEL et PolyHEMA, une quantité insignifiante de Fn est adsorbée. En revanche, la Fn a la capacité de s'adsorber particulièrement sur deux surfaces : PSt et PS avec une préférence pour PSt ( $p=0,0134$ , MW, Tableau 10).

Les résultats des Acs monoclonaux sont exprimés sous la forme d'un ratio, en divisant les absorbances brutes par les absorbances obtenues pour l'Ac polyclonal (Figure 26B). Ce ratio normalisé traduit l'accessibilité d'un domaine précis de la molécule de Fn par rapport à la quantité totale de protéines adsorbées sur un type de surface. La titration avec les différents Acs monoclonaux montre que les

accessibilités des sites C-terminal et gélatine sont similaires pour les quatre surfaces (Figure 26B et Tableau 10). L'accessibilité du site RGD aux Acs est comparable pour le PolyHEMA, le PSt et le PS ( $p=0,6071$ , KW). Sur CEL, le motif RGD est peu reconnu. Pour le domaine N-terminal, toutes les surfaces présentent une réponse différente.

**Tableau 10 – Statistiques relatives aux résultats des ELISA.**

| <b>Polyclonal</b> |     | p<0,0001, KW |             |          |          |
|-------------------|-----|--------------|-------------|----------|----------|
|                   | CEL | PolyHEMA     | PSt         | PS       |          |
| CEL               |     |              |             |          |          |
| PolyHEMA          |     |              | p=0,1120 NS | p=0,0003 | p=0,0003 |
| PSt               |     |              |             | p=0,0003 | p=0,0003 |
| PS                |     |              |             |          | p=0,0134 |

| <b>RGD / Polyclonal</b> |     | p=0,0170, KW |             |             |  |
|-------------------------|-----|--------------|-------------|-------------|--|
|                         | CEL | PolyHEMA     | PSt         | PS          |  |
| CEL                     |     |              |             |             |  |
| PolyHEMA                |     |              | p=0,0007    | p=0,0009    |  |
| PSt                     |     | p=0,0193     |             | p=0,6272 NS |  |
| PS                      |     |              | p=0,2332 NS | p=0,5078 NS |  |

| <b>N-terminal / Polyclonal</b> |     | p=0,0032, KW |          |          |  |
|--------------------------------|-----|--------------|----------|----------|--|
|                                | CEL | PolyHEMA     | PSt      | PS       |  |
| CEL                            |     |              |          |          |  |
| PolyHEMA                       |     |              | p=0,0469 | p=0,0152 |  |
| PSt                            |     | p=0,0305     |          | p=0,0469 |  |
| PS                             |     |              | p=0,0469 | p=0,0007 |  |

| <b>C-terminal / Polyclonal</b> |     | p=0,0584 NS, KW |     |    |  |
|--------------------------------|-----|-----------------|-----|----|--|
|                                | CEL | PolyHEMA        | PSt | PS |  |
| CEL                            |     |                 |     |    |  |
| PolyHEMA                       |     |                 |     |    |  |
| PSt                            |     |                 |     |    |  |
| PS                             |     |                 |     |    |  |

| <b>Gélatine / Polyclonal</b> |     | p=0,2102 NS, KW |     |    |  |
|------------------------------|-----|-----------------|-----|----|--|
|                              | CEL | PolyHEMA        | PSt | PS |  |
| CEL                          |     |                 |     |    |  |
| PolyHEMA                     |     |                 |     |    |  |
| PSt                          |     |                 |     |    |  |
| PS                           |     |                 |     |    |  |

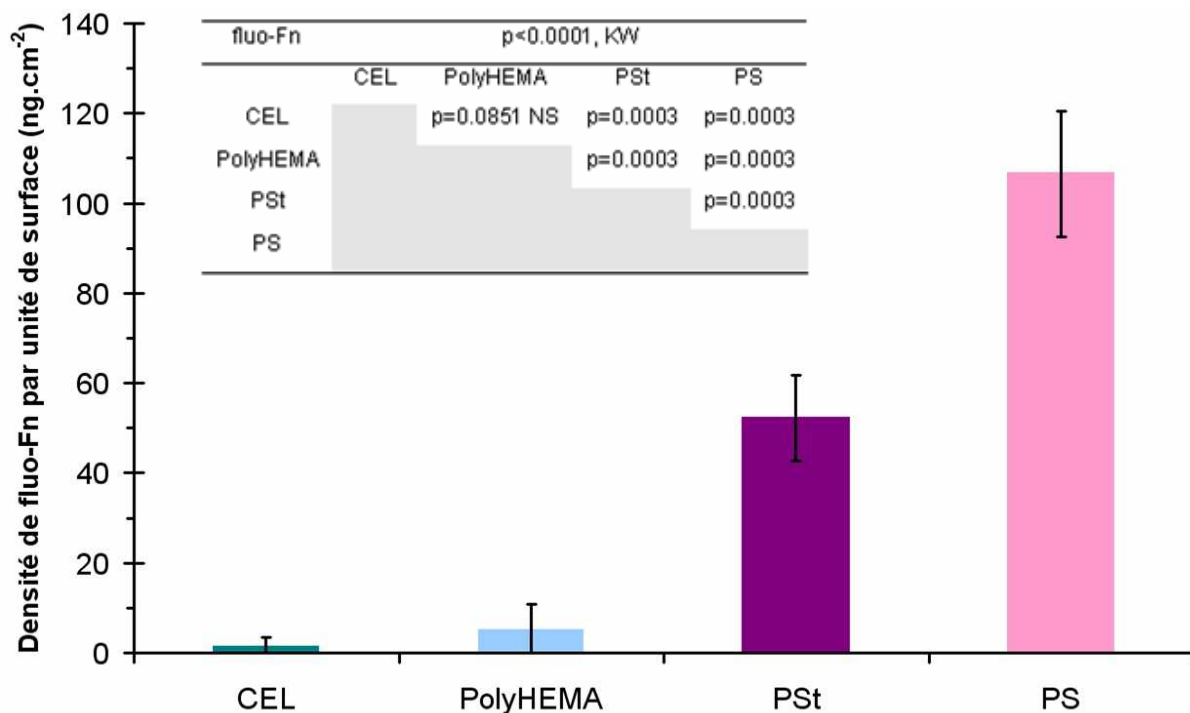
Le niveau de significativité des tests retenu est : p<0,05. En premier lieu, un test global de KW est effectué. S'il se révèle être significatif, les matériaux sont comparés deux à deux (MW). Nombre d'échantillons pour chaque condition : n=9.



## 8 Quantification de la fluo-Fn adsorbée

Les adsorptions de fluo-Fn sont réalisées sur CEL, PolyHEMA, PSt et PS à partir d'une solution mère de concentration initiale  $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Après adsorption, la fluo-Fn est désorbée selon deux protocoles différents et l'intensité de fluorescence est mesurée : le protocole classique où les surfaces sont rincées trois fois avant trypsination et le protocole de type-ELISA qui implique de nombreux lavages et une étape de saturation en BSA avant la digestion enzymatique. La quantité totale de fluo-Fn récupérée est déterminée à partir d'une courbe standard établie à l'aide de solutions de concentrations connues de fluo-Fn variant de 0 à  $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Les résultats obtenus en appliquant le protocole de désorption classique sont regroupés dans la figure 27 et la quantité de Fn digérée est présentée en ng par unité de surface. La fluo-Fn s'adsorbe moins sur les deux supports hydrophiles par rapport aux deux types de polystyrène. Une quantité insignifiante mais équivalente de fluo-Fn est désorbée de CEL et PolyHEMA ( $1,6 \pm 1,9\text{ng.cm}^{-2}$  ;  $5,3 \pm 5,5\text{ng.cm}^{-2}$  respectivement,  $p=0,0851$ , NS, MW) alors que deux fois plus de fluo-Fn est retrouvé sur PS ( $106,6 \pm 14\text{ng.cm}^{-2}$ ) par rapport à PSt ( $52,2 \pm 9,5\text{ng.cm}^{-2}$ ).

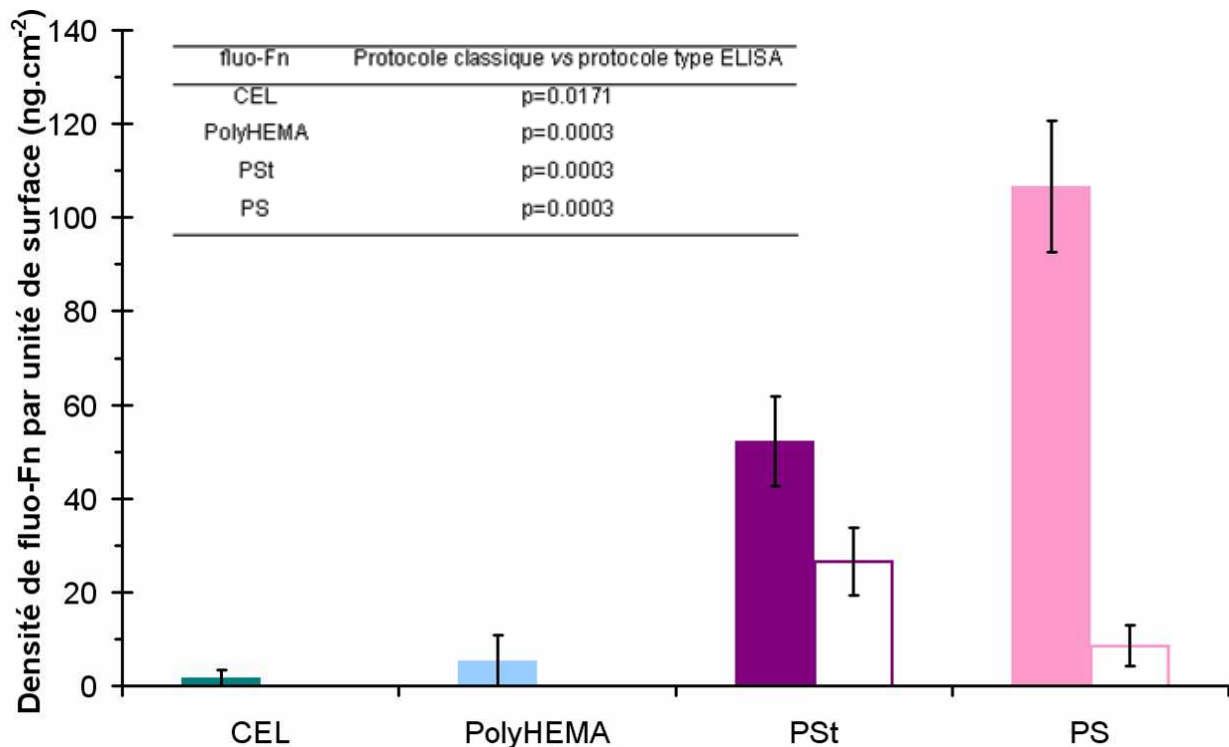


**Figure 27 - Adsorption de fluo-Fn sur les différents matériaux et désorption selon le protocole classique.**

Le niveau de significativité des tests retenu est :  $p < 0,05$ . En premier lieu, un test global de KW est effectué. S'il se révèle être significatif, les matériaux sont comparés deux à deux (MW). Nombre d'échantillons pour chaque condition :  $n=9$ .

En parallèle, un protocole de type-ELISA est également appliqué pour évaluer non seulement l'influence des rinçages mais également l'impact de l'étape de saturation en BSA-Tween20 sur la désorption de la couche protéique d'intérêt. La réalisation de ce test montre une déperdition totale de signal pour CEL et PolyHEMA (Figure 28). Contrairement au protocole classique qui met en évidence l'adsorption privilégiée de la fluo-Fn sur PS par rapport à PSt, le protocole de type-ELISA inverse cette tendance et révèle significativement plus de fluo-Fn sur PSt ( $26,5 \pm 7,2 \text{ ng.cm}^{-2}$ )

que sur PS ( $8,6 \pm 4,4 \text{ ng.cm}^{-2}$ ). En outre, quel que soit le matériau considéré, les étapes de lavages et de saturation inhérentes au protocole de type-ELISA induisent une perte de fluorescence et par conséquent une désorption de fluo-Fn.



**Figure 28 – Comparaison protocole classique et protocole type-ELISA.**

Avant la désorption de la fluo-Fn par 2 trypsinations successives, les surfaces sont rincées 3 fois (barres pleines) ou sont soumises à des protocoles de rinçage type-ELISA (barres blanches). Le niveau de significativité des tests retenu est :  $p < 0.05$ . En premier lieu, un test global de KW est effectué. S’il se révèle être significatif, les matériaux sont comparés deux à deux (MW). Nombre d’échantillons pour chaque condition :  $n=9$ .

## 9 Angles de contact et évaluation de l'interaction polaire $I_{s/e}^p$ des biomatériaux à l'état brut par la méthode de la goutte posée

Les interactions polaires  $I_{s/e}^p$  des matériaux pour l'eau sont caractérisées par deux méthodes distinctes. Dans un premier temps, les interactions polaires sont déterminées en utilisant la technique de la goutte posée qui présume de travailler sur des échantillons secs. Puis, dans une seconde partie, les interactions polaires seront calculées à partir d'angles de contact acquis en milieu aqueux. L'objectif étant d'étudier l'influence de l'immersion sur la polarité des surfaces.

Les angles de contact des gouttes de diiodométhane et d'eau Ultrapure™ sont déterminés sur chaque substrat sans revêtement protéique en utilisant la méthode de la goutte posée. Les résultats sont résumés dans le tableau 11. Tout d'abord, les angles de contact du diiodométhane sont mesurés afin de calculer la composante  $\gamma_s^d$  (selon le modèle de Owens-Wendt) de chacun des matériaux en appliquant l'équation simplifiée (I.16) ; le diiodométhane possédant une composante polaire nulle. Puis, en mesurant les angles à l'eau Ultrapure™ et en injectant  $\gamma_s^d$  dans l'équation (II.2), l'interaction polaire entre le substrat et l'eau ( $I_{s/e}^p$ ) peut être caractérisée.

**Tableau 11 - Angles de contact (diiodométhane et eau Ultrapure™), composantes dispersives de l'énergie libre de surface  $\gamma_s^d$  et interactions polaires  $I_{s/e}^p$  déterminés sur les différents substrats, à sec.**

| Substrat | $\theta_{\text{diiodo}}$ (°) | $\theta_{\text{eau}}$ (°) | $\gamma_s^d$ (mJ.m <sup>-2</sup> ) | $I_{s/e}^p$ (mJ.m <sup>-2</sup> ) |
|----------|------------------------------|---------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
|          |                              |                           |                                    | <i>A SEC</i>                      |
| CEL      | 49,7 ± 1,8                   | < 10                      | 34,4 ± 0,8                         | 90,8 ± 0,6                        |
| PolyHEMA | 37,6 ± 1,4                   | 44,9 ± 0,8                | 40,8 ± 0,4                         | 64,8 ± 0,8                        |
| PSt      | 37,5 ± 1,3                   | 70,8 ± 1,3                | 40,9 ± 0,5                         | 37,0 ± 1,4                        |
| PS       | 35,1 ± 1,2                   | 89,7 ± 0,9                | 42,0 ± 0,3                         | 12,7 ± 1,1                        |

L'interaction polaire est déterminée à partir de l'équation (II.2). Les valeurs des angles de contact représentent la moyenne ± l'écart-type. Nombre d'échantillons pour chaque surface : n=36.

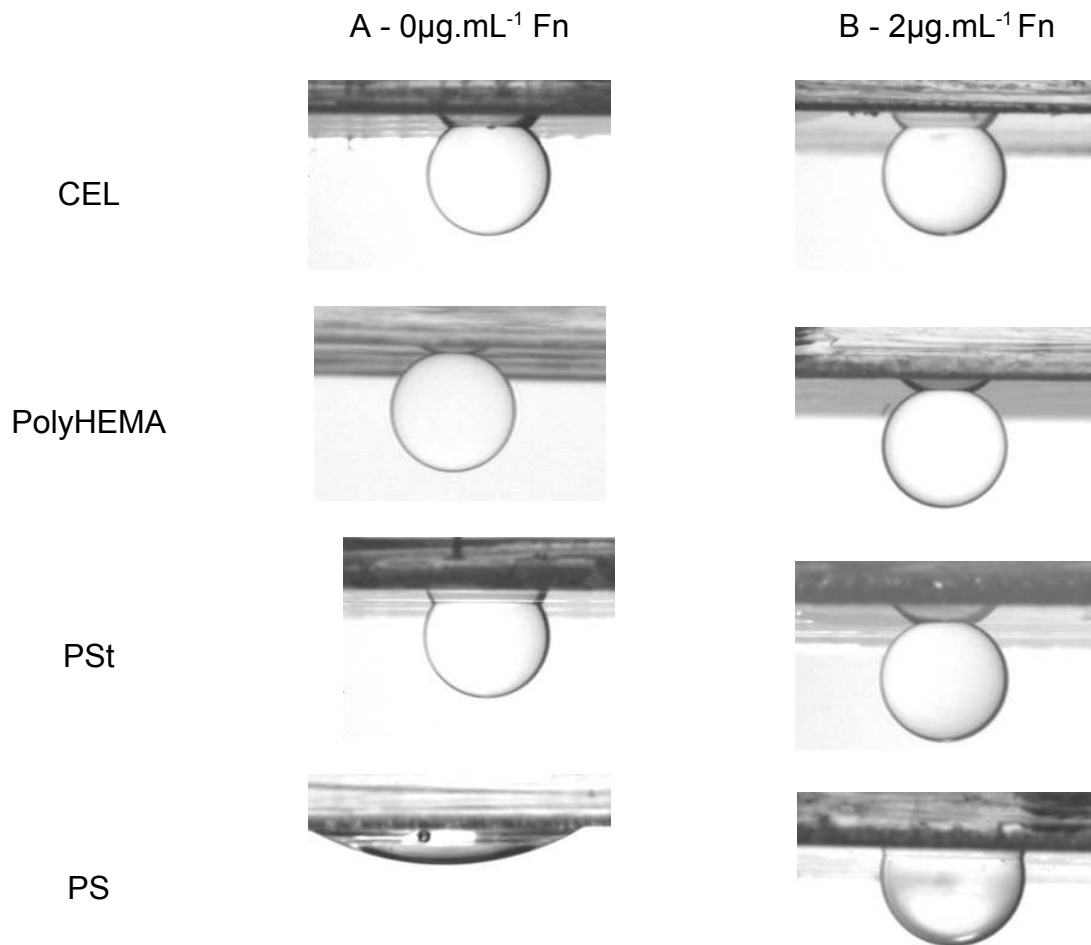
Quel que soit le substrat, les angles de contact du diiodométhane sont compris entre  $35,1^\circ$  et  $49,7^\circ$  pour un  $\gamma_s^d$  variant de  $34,4\text{mJ.m}^{-2}$  à  $42\text{mJ.m}^{-2}$ . Sur CEL, l'eau s'étale au cours du temps pour obtenir au final un angle de contact  $<10^\circ$  : la surface est entièrement mouillée par ce liquide polaire ce qui démontre son caractère fortement hydrophile. Le PolyHEMA est également hydrophile avec un angle de contact à l'eau de  $\theta=44,9 \pm 0,8^\circ$ . Sur le PSt, l'eau s'étale moins ( $\theta=70,8 \pm 1,3^\circ$ ) mettant ainsi en évidence le comportement faiblement hydrophile de ce matériau. Enfin, les gouttes d'eau conservent une forme sphérique au contact de PS ( $\theta=89,7 \pm 0,9^\circ$ ) : cette surface est la plus hydrophobe des quatre testées.

Le calcul de  $I_{s/e}^p$  illustre la partie polaire de l'énergie d'adhésion des interactions polaires développées entre l'eau Ultrapure™ et chaque matériau. Plus un matériau présente une valeur de  $I_{s/e}^p$  élevée, plus le matériau est hydrophile. Ainsi en considérant la technique de la goutte posée -avec comme liquide de test l'eau Ultrapure™- le profil d'hydrophilicité suivant peut être établi : CEL est la surface la plus hydrophile, suivie de PolyHEMA, PSt et PS.

## 10 Mesures d'angles de contact en milieu liquide-liquide

Les angles de contact des gouttes d'octane sont déterminés sur chaque substrat avant et après adsorption de Fn ( $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) en utilisant la technique de mesure d'angles en milieu aqueux (Tableau 12). La figure 29A montre des clichés représentatifs de gouttes d'octane obtenus après immersion des surfaces brutes en eau Ultrapure™. Sur CEL et PolyHEMA, les gouttes d'octane adoptent une forme ronde avec un angle de contact de  $\theta=140,3 \pm 1,6^\circ$  et  $\theta=152,6 \pm 3,1^\circ$  respectivement. La surface de contact entre les gouttes d'octane et ces matériaux est réduite laissant un mouillage à l'eau important. Cette observation révèle le caractère fortement hydrophile de CEL et PolyHEMA. Sur PSt, les gouttes d'octane s'étalent plus, montrant une hydrophilicité prononcée avec un angle de contact de  $\theta=115,9 \pm 2,4^\circ$ . Sur PS, les gouttes d'alcane sont étalées ( $\theta=31,3 \pm 3,5^\circ$ ) ce qui reflète la faible mouillabilité de PS à l'eau et le caractère hydrophobe de ce matériau. La Figure 29A illustre clairement la différence d'aire de contact des gouttes d'octane obtenue avec PSt ou PS : l'aire de contact de l'alcane est réduite sur PSt par rapport à PS,

démontrant ainsi l'augmentation du caractère hydrophile de PSt. Cette augmentation significative de l'hydrophilicité de surface de PSt est due au traitement corona. L'ensemble de ces informations dévoile que PolyHEMA est la surface la plus hydrophile, suivie de CEL, PSt et PS.



**Figure 29 - Dépôt de gouttes d'octane en milieu aqueux sur les différentes surfaces avant (A) et après (B) adsorption de Fn.**

Après adsorption de Fn, les angles de contact à l'octane sont mesurés en PBS pH 7,4 (Figure 29B). Les angles de contact mesurés après adsorption de Fn sur CEL et PolyHEMA ne sont pas significativement différents de ceux obtenus à partir des surfaces brutes. Suite à cette observation, l'hypothèse suivante peut être émise : l'importante polarité initiale de CEL et PolyHEMA inhibe l'adsorption de Fn, ce qui n'entraîne pas de répercussion sur l'étalement de la goutte d'octane et donc de modification de l'angle de contact. Une fois les deux surfaces de polystyrène revêtues de Fn, les valeurs des angles de contact augmentent significativement par rapport aux matériaux nus. Sur PSt, les angles évoluent d'une valeur initiale de  $\theta = 115,9 \pm 5,1^\circ$  pour une surface brute à une valeur finale de  $\theta = 154,4 \pm 1,5^\circ$  pour la même surface présentant un revêtement de Fn. De même pour PS, les angles

évoluent de  $\theta=31,3 \pm 3,5^\circ$  à  $\theta=97,5 \pm 4,6^\circ$ , respectivement pour le substrat brut et revêtu. Comme le démontre la figure 29B, la diminution de l'aire de contact des gouttes d'octane avec PSt et PS après adsorption de Fn révèle que la protéine augmente significativement l'hydrophilicité du polystyrène non traité et du polystyrène traité pour la culture cellulaire.

**Tableau 12 - Angles de contact octane/eau sur les différents substrats avec ou sans pré-adsorption de Fn ( $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).**

| Substrat | $\theta_{l/e}$ ( $^\circ$ ) | Substrat + Fn adsorbée | $\theta_{l/e}$ ( $^\circ$ ) |
|----------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|
| CEL      | $140,3 \pm 1,6$             | CEL + Fn               | $137,3 \pm 1,3$             |
| PolyHEMA | $152,6 \pm 3,1$             | PolyHEMA + Fn          | $155 \pm 1,7$               |
| PSt      | $115,9 \pm 5,1$             | PSt + Fn               | $154,4 \pm 1,5$             |
| PS       | $31,3 \pm 3,5$              | PS + Fn                | $97,5 \pm 4,6$              |

Les valeurs des angles de contact représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type. Nombre d'échantillons pour chaque surface : n=36.

## 11 Evaluation de l'interaction polaire $I_{s/e}^p$ des biomatériaux en milieu liquide à l'état brut ou revêtus de Fn

L'interaction polaire  $I_{s/e}^p$  entre un substrat donné (brut ou revêtu de Fn) et la phase aqueuse est déterminée en appliquant l'équation (II.8). La première étape de l'étude a consisté à valider cette équation en vérifiant que le premier terme de l'équation (II.7) est négligeable pour le calcul de  $I_{s/e}^p$ . La valeur de la composante dispersive de l'énergie de surface des substrats biologiques comme des protéines excède rarement  $45\text{mJ.m}^{-2}$  aussi bien à l'état sec (van Oss 1995) qu'à l'état hydraté (van Oss 1994). D'autre part, en disposant des gouttes de diiodométhane sur les surfaces par la méthode de la goutte posée, il est montré que la composante dispersive ( $\gamma_s^d$ ) de CEL, PolyHEMA, PSt et PS est comprise entre  $34,4$  et  $42\text{mJ.m}^{-2}$  (Tableau 13). En prenant une valeur maximale de  $50\text{mJ.m}^{-2}$  pour  $\gamma_s^d$ , le premier terme de l'équation (II.7) devient égal à  $-0,3\text{mJ.m}^{-2}$ . Cette valeur est négligeable par rapport aux valeurs obtenues pour  $I_{s/e}^p$  : l'erreur sur la valeur finale de  $I_{s/e}^p$  devient insignifiante.



Les valeurs de  $I_{s/e}^p$  trouvées sont regroupées dans le tableau 13. Les matériaux étudiés peuvent être classés en fonction de leur caractère hydrophile respectif en utilisant  $I_{s/e}^p$  comme mesure de la contribution des interactions polaires à l'énergie d'adhésion entre la surface et la phase aqueuse. Lorsque  $I_{s/e}^p$  augmente, l'hydrophilicité du substrat augmente également. En considérant les surfaces sans revêtement protéique, CEL et PolyHEMA sont les surfaces les plus hydrophiles avec  $I_{s/e}^p > 90 \text{mJ.m}^{-2}$ . Au contraire PS développe une interaction polaire pour l'eau de  $I_{s/e}^p = 7,7 \pm 1,5 \text{mJ.m}^{-2}$ . Cette faible interaction polaire met en évidence le fait que PS est la surface la plus hydrophobe des biomatériaux considérés dans cette étude. PSt présente une affinité pour l'eau intermédiaire avec une valeur de  $I_{s/e}^p = 73,3 \pm 4,3 \text{mJ.m}^{-2}$ .

Après adsorption de Fn, l'interaction polaire développée par CEL et PolyHEMA vis-à-vis de la phase aqueuse reste inchangée par rapport aux substrats bruts. Pour les deux types de polystyrène (PSt et PS), les valeurs de  $I_{s/e}^p$  sont significativement augmentées après traitement avec la Fn. Cette augmentation de l'interaction polaire indique une affinité accrue des matériaux pour la phase aqueuse. L'interaction polaire évolue de  $I_{s/e}^p = 73,3 \pm 4,3 \text{mJ.m}^{-2}$  pour PSt brut à  $I_{s/e}^p = 97,2 \pm 0,3 \text{mJ.m}^{-2}$  pour PSt + Fn pour obtenir une interaction polaire équivalente à celle calculée pour le PolyHEMA (avec ou sans Fn). De la même manière,  $I_{s/e}^p$  augmente pour PS évoluant de  $7,7 \pm 1,5 \text{mJ.m}^{-2}$  pour le matériau brut à  $57,9 \pm 4,1 \text{mJ.m}^{-2}$  pour PS + Fn démontrant une augmentation de l'hydrophilicité de PS en présence de Fn.

**Tableau 13 - Interactions polaires du travail d'adhésion ( $I_{s/e}^p$ ) entre la phase aqueuse et les différents substrats, avec ou sans pré-adsorption de Fn ( $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).**

| Substrat | $I_{s/e}^p$ ( $\text{mJ.m}^{-2}$ ) | Substrat + Fn adsorbée | $I_{s/e}^p$ ( $\text{mJ.m}^{-2}$ ) |
|----------|------------------------------------|------------------------|------------------------------------|
| CEL      | $90,5 \pm 0,7$                     | CEL + Fn               | $88,7 \pm 0,5$                     |
| PolyHEMA | $96,5 \pm 1,1$                     | PolyHEMA + Fn          | $97,4 \pm 0,4$                     |
| PSt      | $73,3 \pm 4,3$                     | PSt + Fn               | $97,2 \pm 0,3$                     |
| PS       | $7,7 \pm 1,5$                      | PS + Fn                | $57,9 \pm 4,0$                     |

Les interactions polaires sont déterminées à partir de l'équation (II.8). Nombre d'échantillons pour chaque surface :  $n=9$ .

## 12 Comparaison des interactions polaires $I_{s/e}^p$ des surfaces brutes obtenues à sec ou en milieu aqueux

En considérant la technique de la goutte posée ou la méthode de mesure d'angles de contact en milieu liquide-liquide, deux profils distincts d'hydrophilicité des surfaces (non revêtues de Fn *i.e.* brutes) peuvent être établis :

- Technique de la goutte posée : CEL > PolyHEMA > PSt > PS ;
- Technique en milieu liquide-liquide : PolyHEMA > CEL > PSt > PS.

La principale différence entre les deux techniques d'acquisition est la condition d'hydratation des échantillons. Dans le cas de la goutte posée, les angles de contact sont mesurés sur des surfaces sèches alors qu'en milieu liquide-liquide, les surfaces sont immergées dans une phase aqueuse. Le tableau 14 illustre les différences d'interactions polaires des surfaces pour l'eau en fonction des conditions d'hydratation : mesures à sec ou en milieu aqueux. Quelle que soit la technique de mesure considérée, les interactions polaires entre l'eau et CEL ou PS sont équivalentes : l'immersion ne change pas l'affinité des surfaces pour l'eau. En contrepartie, le caractère polaire de PolyHEMA et PSt semble être significativement sous-évalué lorsque les surfaces sont sèches.

**Tableau 14 - Interactions polaires du travail d'adhésion ( $I_{s/e}^p$ ) entre l'eau et les différents substrats bruts obtenues par la méthode de la goutte posée (à sec) ou par la méthode en milieu liquide-liquide (surfaces immergées).**

| Substrats bruts | $I_{s/e}^p$ (mJ.m <sup>-2</sup> ) | $I_{s/e}^p$ (mJ.m <sup>-2</sup> ) |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|                 | <i>A SEC</i>                      | <i>EN MILIEU LIQUIDE-LIQUIDE</i>  |
| CEL             | 90,8 ± 0,6                        | 90,5 ± 0,7                        |
| PolyHEMA        | 64,8 ± 0,8                        | 96,5 ± 1,1                        |
| PSt             | 37,0 ± 1,4                        | 73,3 ± 4,3                        |
| PS              | 12,7 ± 1,1                        | 7,7 ± 1,5                         |

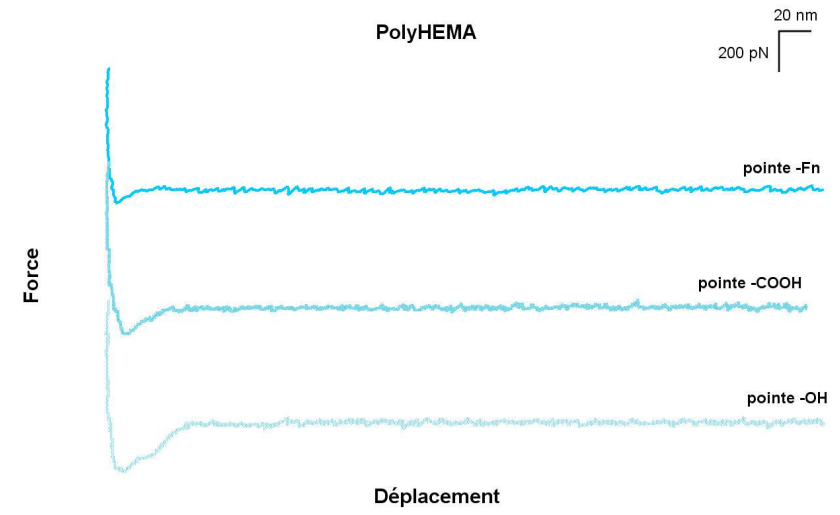
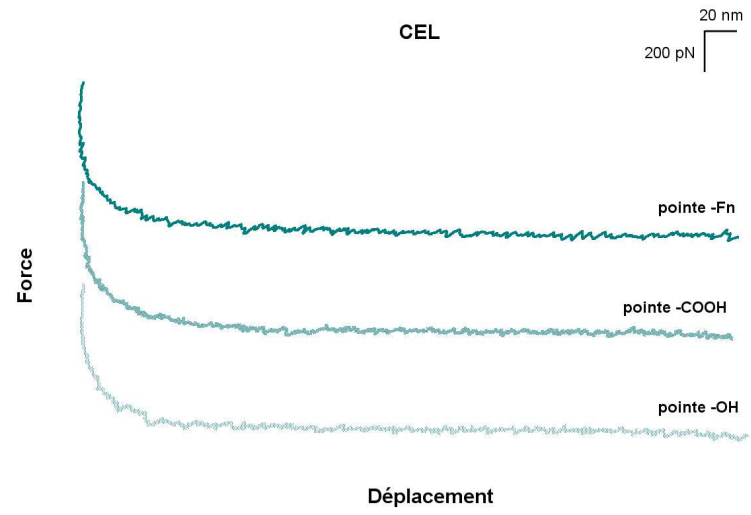
Avec la méthode de la goutte posée ou en milieu liquide-liquide, les interactions polaires sont déterminées à partir des équations (II.2) ou (II.8) respectivement. Nombre d'échantillons pour chaque surface : n=9.

### 13 Quantification de l'affinité instantanée de la Fn pour les surfaces par spectroscopie de force

Afin de quantifier plus précisément l'affinité de la Fn pour les différents types de surface, la protéine est greffée à l'apex de pointes AFM et les courbes de force sont acquises et exploitées. Deux pointes ont servi de témoins : la pointe -COOH, soit la pointe -Fn sans traitement au NHS-EDC et sans la protéine, et la pointe -OH mimant le comportement d'une protéine hydrophile neutre. Les pointes AFM considérées et les courbes de force typiques obtenues pour les différentes surfaces sont présentées dans les figures 19 et 30, respectivement. Les courbes de forces sont acquises en PBS pH 7,2.

L'analyse "morphologique" des courbes de force typiques (Figure 30) peut donner des indices pour la caractérisation des échantillons (type d'adhésion, dureté, élasticité). Brièvement, les courbes obtenues sur CEL avec les pointes -Fn, -COOH et -OH sont représentatives des courbes obtenues pour des échantillons mous avec un appui progressif à courte distance. L'introduction de la double couche de HPMC-CMC est certainement à l'origine de cette propriété. Pour PolyHEMA et PSt, les courbes présentent de petits pics d'adhésion alors que de grandes adhésions sont visibles sur PS.

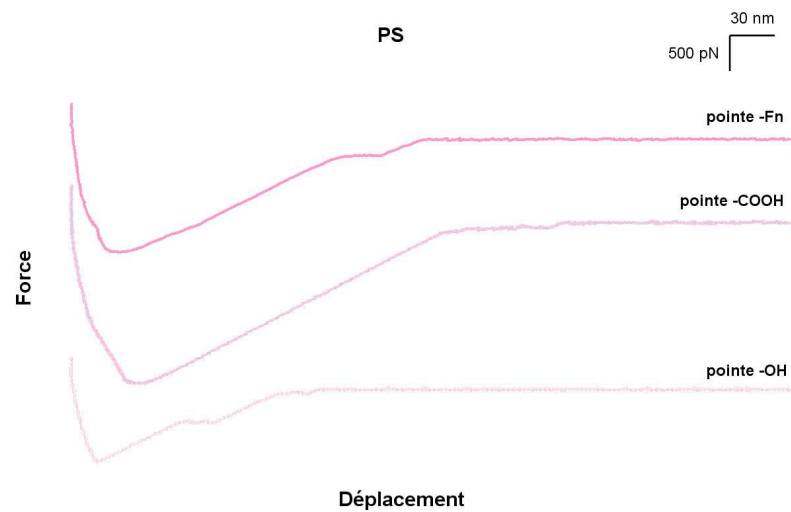
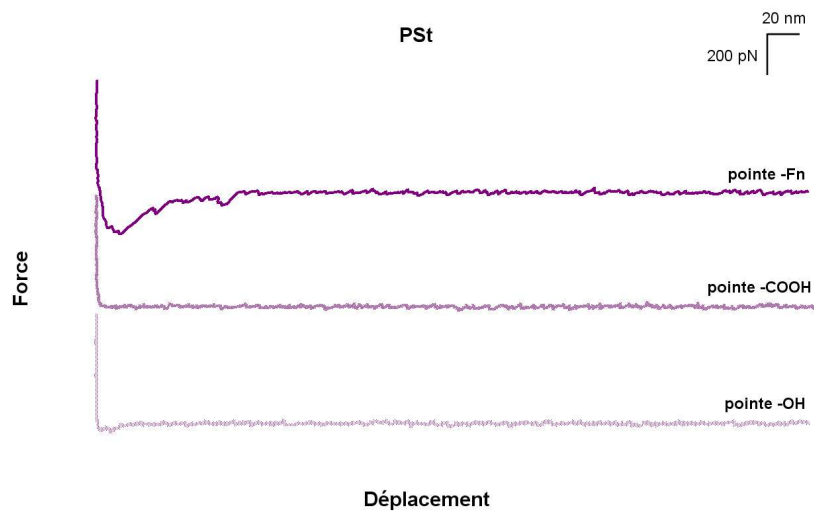
A



B

D

C



**Figure 30 – Courbes de force typiques obtenues pour les pointes –Fn, -COOH et –OH sur chaque matériau.**

Courbes de rétraction acquises sur les différentes surfaces en PBS pH 7,2 avec des pointes -Fn (lignes pleines), des pointes -COOH (lignes intermédiaires) et des pointes -OH (lignes claires).

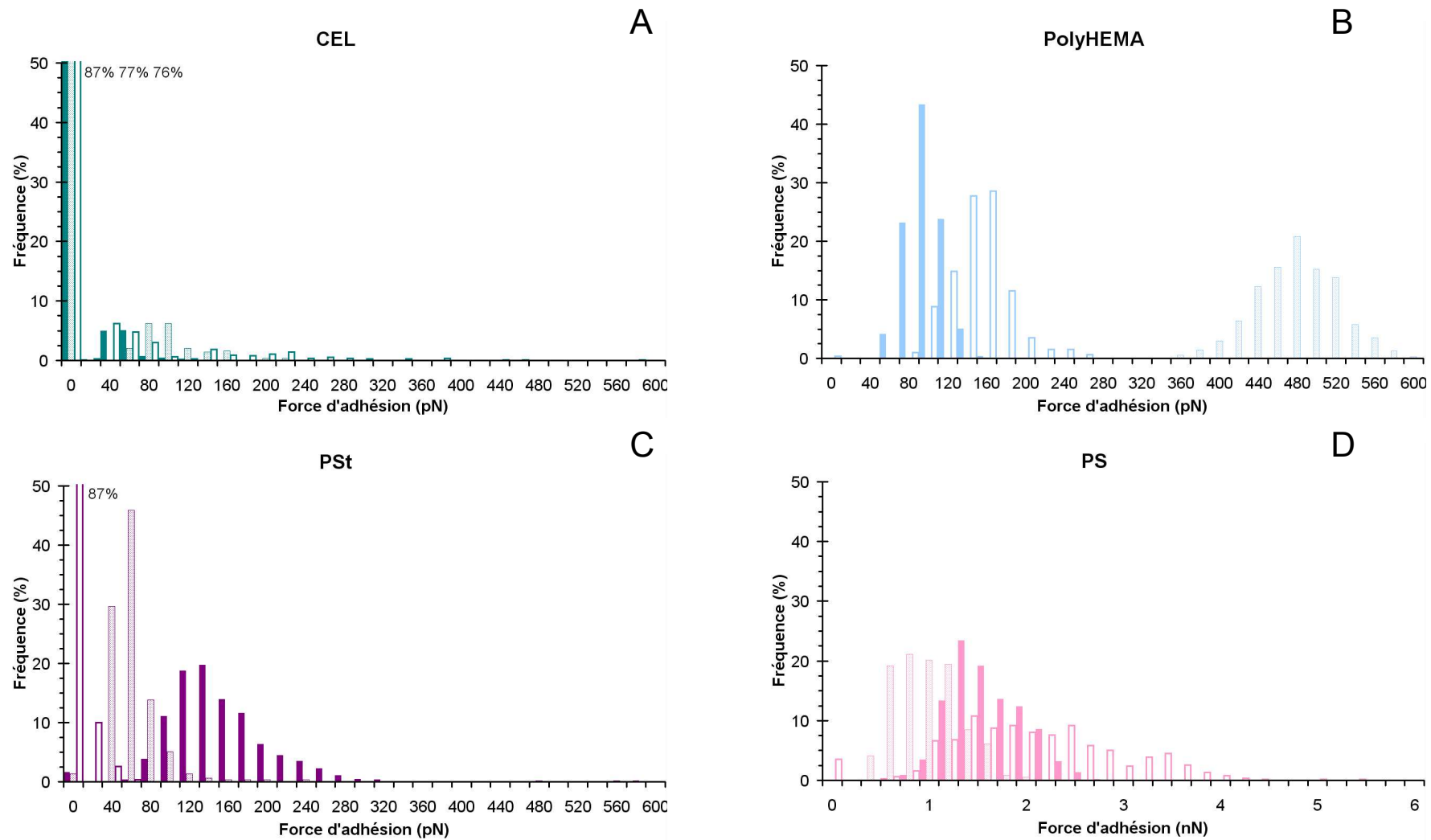
Après traitement des courbes de force, nous avons représenté la fréquence d'adhésion pour chaque intervalle de force.

Sur CEL (Figure 31A) et quel que soit le type de pointe, une part importante des courbes de forces ne présente aucune adhésion : 87%, 76% et 77% pour les pointes –Fn, –COOH et –OH, respectivement.

Sur PolyHEMA (Figure 31B), au contraire, toutes les pointes sont adhésives (on note 100% d'évènements adhésifs quelle que soit la pointe) mais la force d'adhésion pour la pointe –Fn ( $91 \pm 18\text{pN}$ ) est significativement réduite par rapport aux pointes contrôles –COOH ( $138 \pm 31\text{pN}$ ) et –OH ( $470 \pm 42\text{pN}$ ).

Sur PSt (Figure 31C), l'histogramme révèle une augmentation significative de la force d'adhésion pour les pointes greffées avec de la Fn ( $143 \pm 57\text{pN}$ ) par rapport aux pointes –COOH ( $7 \pm 12\text{pN}$ ) et –OH ( $54 \pm 44\text{pN}$ ). De plus, le nombre d'évènements adhésifs pour la pointe –COOH chute de manière importante ; seulement 13% des évènements sont adhésifs. L'ensemble de ces résultats suggère une affinité spécifique et accrue de la Fn pour PSt.

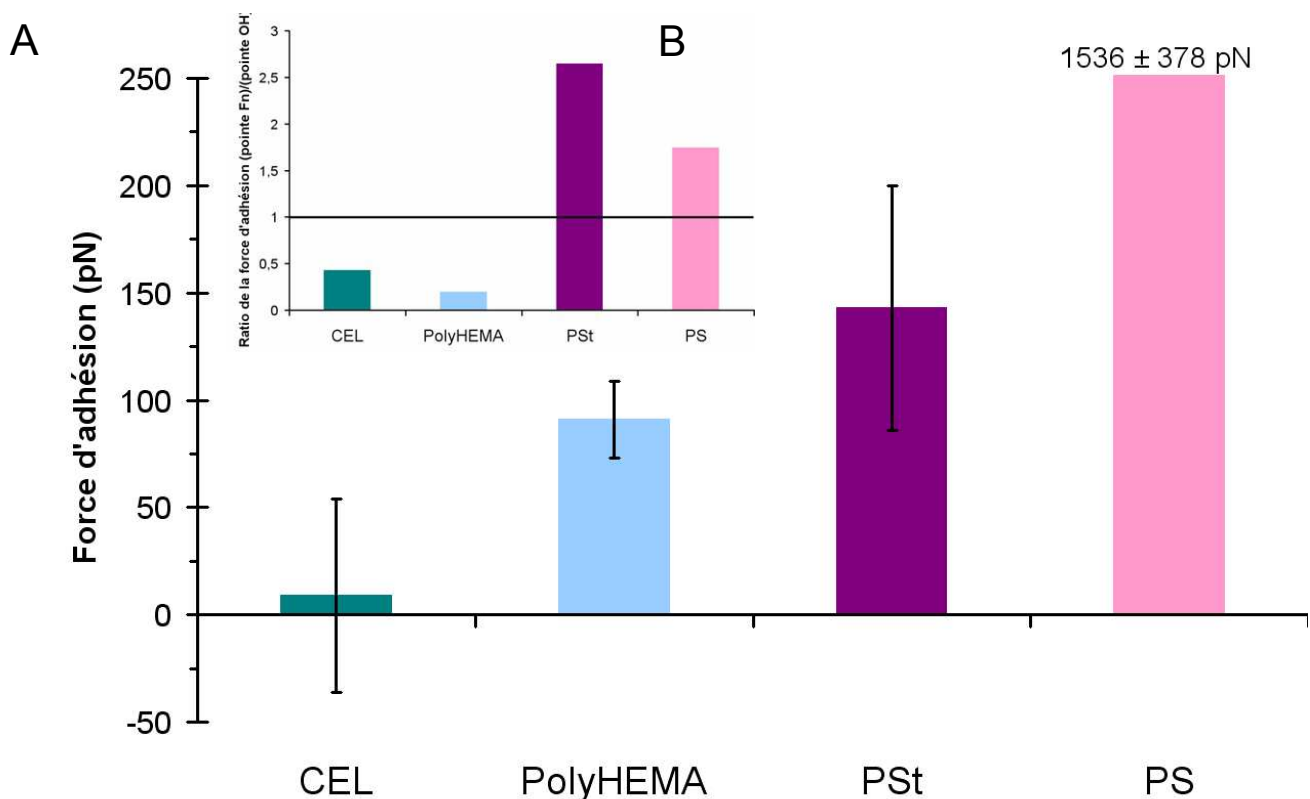
La surface PS (Figure 31D), qui est très hydrophobe, induit une forte adhésion quel que soit le type de pointe ( $\sim 1\text{nN}$ ). L'affinité des pointes pour PS peut être résumée de la manière suivante : pointe –COOH ( $1930 \pm 882\text{pN}$ ) > pointe –Fn ( $1536 \pm 378\text{pN}$ ) > pointe –OH ( $880 \pm 325\text{pN}$ ). Toutefois, les trois histogrammes se chevauchent et il n'est pas possible, pour cette surface, de mettre en évidence la contribution de la Fn sur la force résultante en comparaison avec les pointes témoin. PS étant un matériau très hydrophobe, il peut être envisagé que cette surface soit toujours adhésive en milieu aqueux quel que soit la pointe utilisée.



**Figure 31 - Mesure des forces d'adhésion entre les différents matériaux et les pointes AFM greffées Fn, COOH ou OH.**

Les forces sont obtenues d'après les courbes de rétraction acquises sur les différentes surfaces en PBS pH 7,2 avec des pointes -Fn (barres pleines), des pointes -COOH (barres blanches) et des pointes -OH (barres hachurées). Chaque histogramme est représentatif d'au moins 512 courbes.

La figure 32A présente la force moyenne d'adhésion enregistrée pour les pointes -Fn pour chacune des surfaces. A première vue, les matériaux hydrophiles développent une affinité instantanée amoindrie par rapport aux deux types de polystyrène : une corrélation entre la force d'adhésion et l'hydrophobicité des surfaces peut être distinguée. La figure 32B montre, pour chaque surface, les ratios de force d'adhésion entre une pointe -Fn et une pointe -OH. Avec cette représentation, il devient alors possible d'évaluer l'impact de la présence de la Fn à l'apex de la pointe par rapport à une pointe mimant le comportement d'une protéine hydrophile neutre. Ainsi, un ratio supérieur à 1 suggère une affinité accrue de la Fn pour la surface au regard d'une protéine neutre. CEL et PolyHEMA ont un ratio inférieur à 1, ce qui reflète une affinité diminuée de ces surfaces pour la Fn par rapport à une protéine hydrophile modélisée ici avec une pointe contrôle -OH. A l'opposé, PSt et PS ont un ratio supérieur à 1, suggérant une affinité importante de la Fn pour ces surfaces.



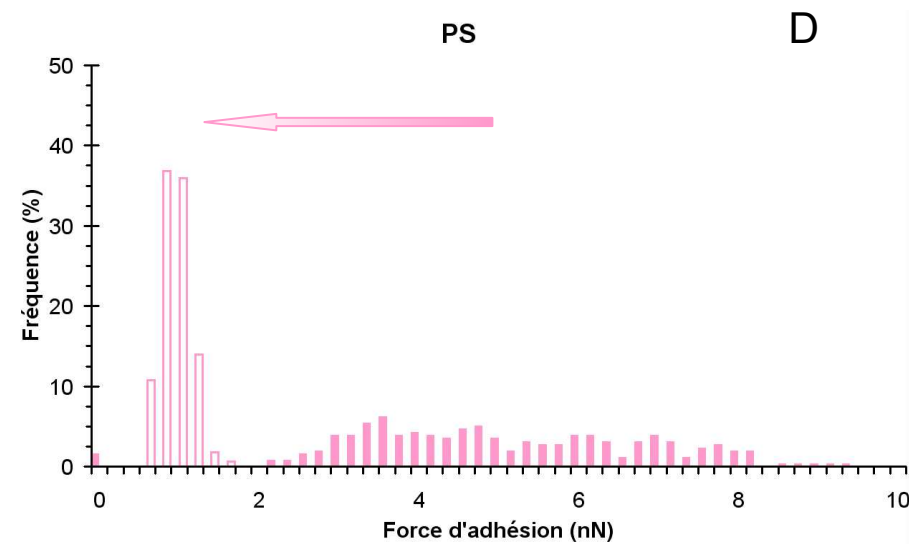
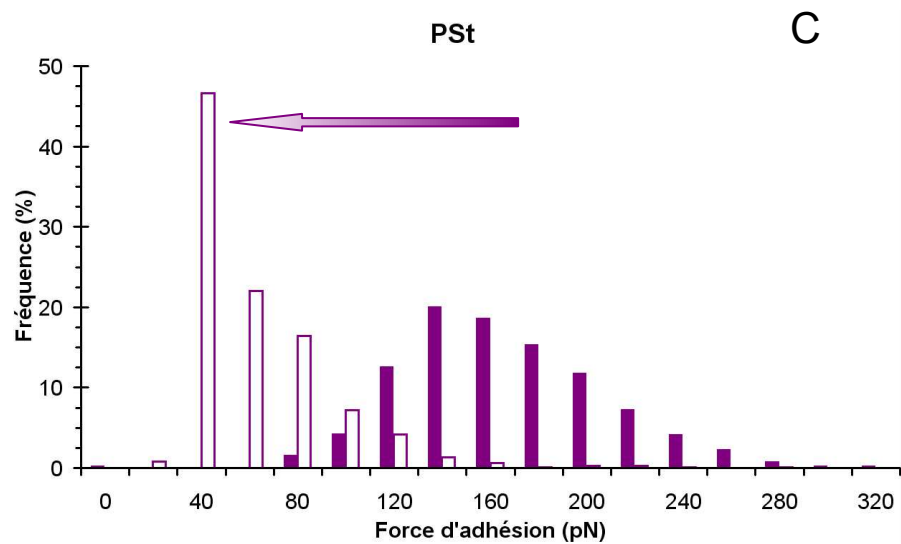
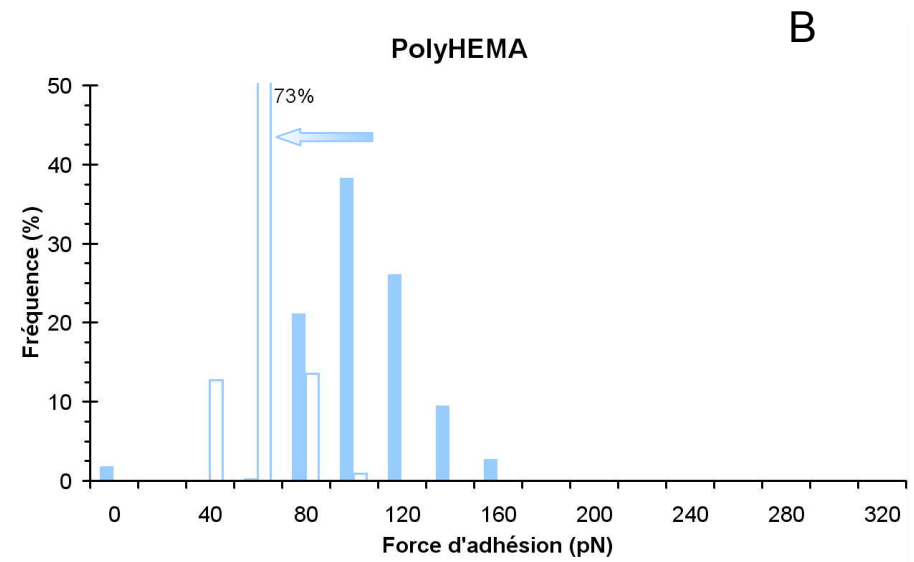
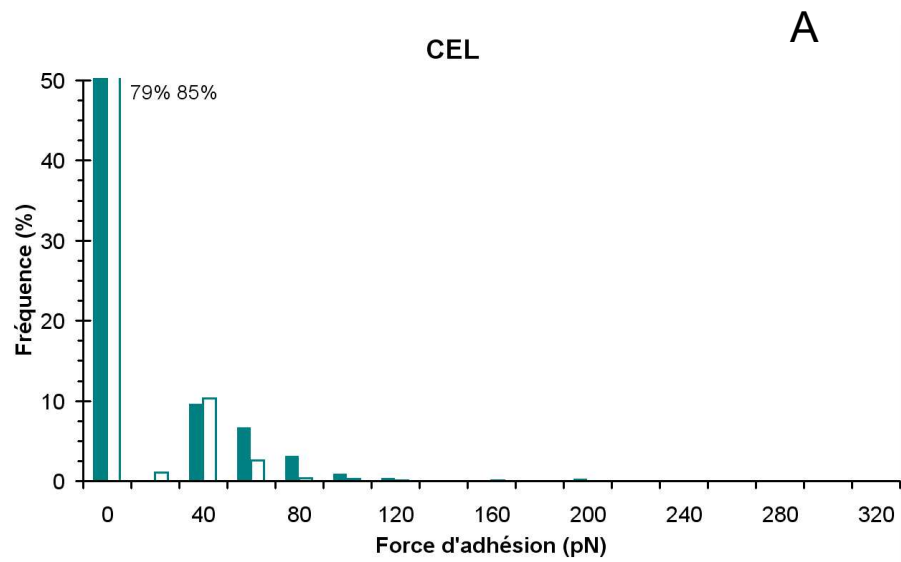
**Figure 32 - Représentation graphique des forces d'adhésion.**

(A) Données brutes des forces d'adhésion obtenues avec une pointe -Fn sur CEL, PolyHEMA, PSt et PS. (B) Graphique représentant le ratio (force d'adhésion pointe -Fn)/(force d'adhésion pointe -OH). Un ratio égal à 1 représente une force d'adhésion similaire pour les deux types de pointes.



En AFM, afin de suivre la spécificité des forces entre un ligand et son récepteur, il est recommandé de faire appel à des manipulations contrôlées. La plupart sont des expériences dites de " blocage " où un ligand libre est introduit dans le milieu et entre directement en compétition avec le ligand greffé sur l'apex de la pointe ; le récepteur présent à la surface interagit préférentiellement avec le ligand libre ; ce dernier étant présent à haute concentration. Cependant, prouver une interaction entre une protéine et une surface par spectroscopie de force n'est pas si simple. En effet, les interactions ne sont pas du type récepteur/ligand et de simples expériences de " blocage " ne sont plus envisageables.

Ainsi, afin de démontrer l'efficacité du greffage de la Fn à l'apex de la pointe et pour mettre en évidence l'influence de la protéine sur l'affinité instantanée, les courbes de force ont été enregistrées avant et après traitement des pointes à la trypsine (Figure 33). Suite au traitement enzymatique, les molécules de Fn sont digérées en petits peptides relargués dans la phase aqueuse. Comme le montre la figure 34, la trypsination des pointes greffées provoque une diminution significative de la force moyenne d'adhésion et on note un déplacement du pic de distribution des forces d'adhésion vers des valeurs plus faibles. Les résultats obtenus après traitement des pointes à la trypsine mettent en exergue la contribution de la Fn dans l'affinité instantanée de la pointe pour la surface. Les forces enregistrées pour PolyHEMA, PSt et PS sont réellement générées par le greffage de la protéine sur le levier. Quant à CEL, avant ou après trypsination, le profil reste inchangé, dans la mesure où la force moyenne reste négligeable.

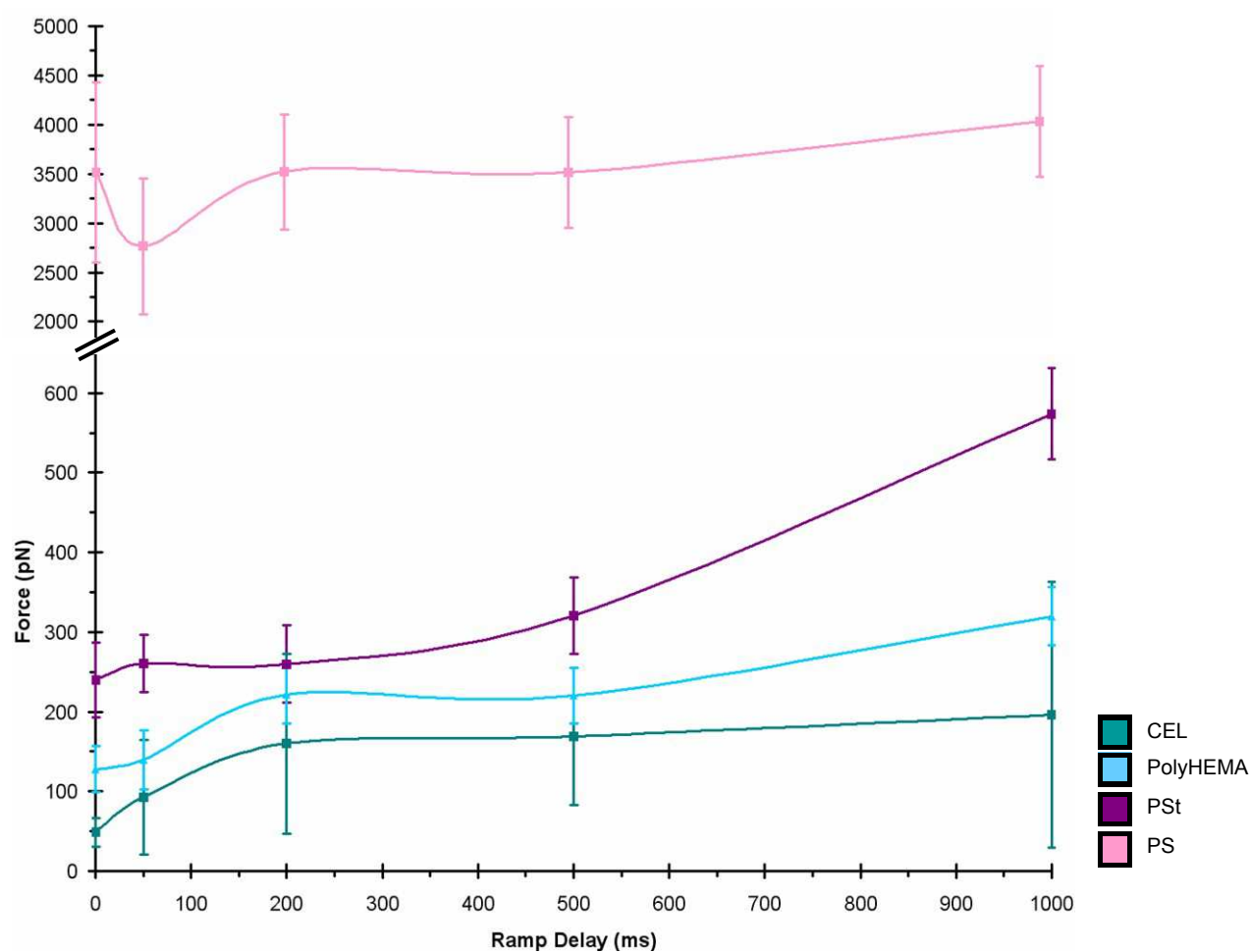


**Figure 33 - Mesure des forces d'adhésion entre les différents matériaux et les pointes greffées Fn avant ou après trypsination.**

Les forces sont obtenues d'après les courbes de rétraction acquises sur les différentes surfaces en PBS pH 7,2 avec des pointes -Fn (barres pleines) puis les mêmes pointes trypsinées (barres blanches). Chaque histogramme est représentatif d'au moins 256 courbes de force. Les flèches indiquent un déplacement du pic d'adhésion vers des forces plus faibles après digestion enzymatique.

## 14 Evolution de l'affinité de la Fn pour les surfaces en fonction du temps

Une seconde série de manipulations a permis d'évaluer l'évolution de la force d'adhésion entre la pointe AFM greffée Fn et les surfaces au cours du temps. Les durées de contact choisies entre les pointes AFM et les échantillons sont comprises entre 0 et 1000ms (Figure 34). La figure 35, quant à elle, illustre l'évolution de la fréquence d'adhésion en fonction de ces mêmes temps.



**Figure 34 - Mesure des forces d'adhésion entre les différents matériaux et les pointes greffées  $F_n$  avec des temps de contact entre la pointe et la surface variant de 0 à 1000ms.**

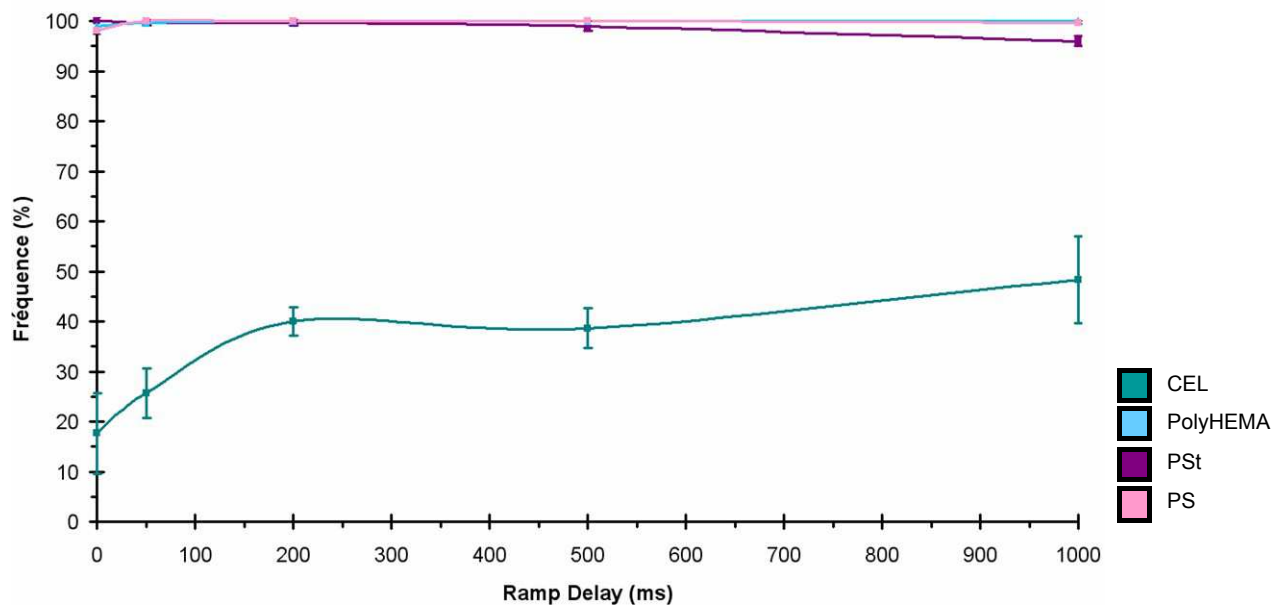
Les forces d'adhésion sont obtenues en PBS pH 7,2. Chaque histogramme est représentatif d'au moins 256 courbes de force. Les temps de contact considérés entre les pointes et les surfaces sont : 0ms, 50ms, 200ms, 500ms et 1000ms.

L'affinité instantanée de la  $F_n$  pour CEL est relativement faible ( $\sim 50$ pN). Entre 0 et 200ms de temps de contact, la force d'interaction entre la  $F_n$  et la surface augmente pour atteindre un maximum de 200pN. Cette force reste ensuite constante pour des temps plus élevés. Conjointement, la fréquence des événements adhésifs double entre 0 et 1000ms (passant de  $\sim 20\%$  à  $\sim 40\%$  d'après la Figure 34).

Les profils d'évolution des forces d'adhésion avec le temps sur CEL et PolyHEMA sont similaires. Après une augmentation de la force d'interaction entre 0 et 200ms, un plateau s'installe. Au final, il semblerait que les forces d'adhésion de CEL et PolyHEMA à 1000ms soient semblables. Toutefois, contrairement à CEL où seulement  $\sim 40\%$  des événements sont adhésifs, la fréquence d'adhésion sur PolyHEMA est de 100% quel que soit le temps de contact étudié.

La force moyenne d'interaction entre la pointe greffée et PSt à 0ms est de  $\sim 250$ pN. Jusqu'à 200ms, l'interaction de la  $F_n$  pour la surface ne semble pas évoluer. Par contre, à partir de 500ms, la force d'adhésion croît considérablement. Entre 0 et 1000ms, la force d'interaction est multipliée par deux et on pourrait penser que cette force pourrait encore être augmentée pour des temps de contact plus longs. D'autre part, quel que soit le temps de contact considéré, on note 100% d'adhésion.

La forte hydrophobicité de PS induit 100% d'adhésion ainsi que des forces de l'ordre de grandeur du nanonewton. Cependant, quelle que soit la durée de contact entre la pointe et la surface, la force d'interaction n'évolue pas et semble rester constante.



**Figure 35 - Représentation des fréquences d'adhésion entre les différents matériaux et les pointes greffées Fn avec des temps de contact entre la pointe et la surface variant de 0 à 1000ms.**

Les forces d'adhésion sont obtenues en PBS pH 7,2. Chaque histogramme est représentatif d'au moins 256 courbes de force. Les temps de contact considérés entre la pointe et les surfaces sont : 0ms, 50ms, 200ms, 500ms et 1000ms.

## Chapitre IV Discussion

---

# 1 Caractérisation biologique des échantillons

Pour survivre et proliférer, la plupart des cellules non cancéreuses doivent adhérer à la MEC. Les cellules incapables de s'étaler subissent l'anoïkis, processus hautement régulé induisant la mort cellulaire tout en évitant la mise en place d'une réponse inflammatoire (Meredith *et al.* 1993; Frisch and Francis 1994). La dérégulation de ce type d'apoptose induit la dégénérescence des cellules et/ou la survie de cellules anormales.

Des cellules adhérentesensemencées sur une surface cellulosique anti-adhésive ne peuvent trouver de sites de fixation et s'agrègent (Faucheux *et al.* 2001; Faucheux *et al.* 2004). Le PolyHEMA, matériau présent dans les lentilles de contact ou les implants intra-oculaires, empêche l'adhésion et l'étalement cellulaires (Folkman and Moscona 1978; Gilmore *et al.* 2000; Krylov and Dovichi 2000; Bretland *et al.* 2001; Diaz-Montero and McIntyre 2005; Ghosh *et al.* 2005; Feder-Mengus *et al.* 2007). Les études conduites précédemment au sein du laboratoire ont démontré l'utilité d'un nouveau substrat cellulosique (CEL) dans l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions cellules-cellules et cellules-surfaces (Hindie *et al.* 2005; Hindie *et al.* 2006). Cette surface, composée d'une double-couche stérile d'HPMC-CMC, a été conçue pour étudier des comportements cellulaires à long-terme. Ce double revêtement est original et nécessaire car une simple couche d'HPMC est valable seulement pour des essais à court-terme (< 24h) et le revêtement de CMC au fond des boîtes de Pétri n'est pas homogène. Des études de cytocompatibilité sur des biomatériaux composés de dérivés cellulosiques ont montré que selon les lignées cellulaires considérées, la viabilité et la prolifération pouvaient être altérées (Draye *et al.* 1998). Dans cette étude l'efficacité de CEL comme support anti-adhésif a été mise en évidence, en comparant le comportement de trois lignées cellulaires adhérentes (les fibroblastes Swiss 3T3, les pré-ostéoblastes MC-3T3-E1 et les cellules de mélanome B16F10 à haut pouvoir métastatique). En parallèle, un témoin d'adhésion et d'étalement (PSt) et un polymère contrôle (PolyHEMA) induisant l'agrégation des cellules ont été testés.

Les trois types cellulaires s'étaient sur PSt mais forment des agrégats sur CEL et PolyHEMA. La taille et la forme des agrégats sur CEL et PolyHEMA sont



similaires. L'agrégation de toutes les lignées cellulaires sur CEL après 24 ou 48h d'incubation démontre comment un substrat cellulosique peut fournir des cultures cellulaires en 3-D de manière efficace. Il est par ailleurs reconnu que la forme des cellules induites par les interactions cellules-surface influence les voies de signalisation et gouverne en partie les processus de mort cellulaire (Chen *et al.* 1997; Lukashev and Werb 1998; Boudreau and Jones 1999; Huang and Ingber 2000; Goldmann 2002; Chen *et al.* 2003). Ainsi, nous avons étudié la croissance de ces trois types cellulaires sur CEL, PolyHEMA et PSt. Toutes les lignées ont un taux de prolifération optimal sur PSt alors que sur CEL et PolyHEMA, l'indice de prolifération est significativement diminué à 48h. Les MC-3T3 ont une prolifération moindre sur PSt que les Swiss 3T3 ou les B16F10 et leur indice de prolifération est inférieur à 1 sur CEL et PolyHEMA à 24 et 48h, ce qui suggère la mise en place d'un processus de mort cellulaire. La croissance des B16F10 sur les deux supports anti-adhésifs est inhibée mais seulement à 48h alors que pour les deux autres lignées, ce phénomène s'observe dès 24h.

L'analyse du cycle cellulaire à 48h confirme les résultats des comptages : les pourcentages de cellules en phase S-G2/M sont significativement supérieurs sur PSt alors que pour CEL et PolyHEMA les cellules sont bloquées en phase G1. Les sphéroïdes, cultures cellulaires en suspension et en 3-D (Shiras *et al.* 2002), ont été introduits comme un modèle expérimental pour la tumorigénèse ainsi que la culture d'agrégats de cellules de mélanome et sont utilisés par de nombreuses équipes (De Pauw-Gillet *et al.* 1988; LaRue *et al.* 2004; Ghosh *et al.* 2005; Jorgensen *et al.* 2005). En fonction des conditions de culture, les cellules issues des sphéroïdes ont la capacité de proliférer. Au contraire, dans nos conditions expérimentales, les agrégats cultivés sur CEL et PolyHEMA sont accrochés à la surface par quelques cellules isolées et le pourcentage de cellules bloquées en phase G1 à 48h est plus important que celui reporté par d'autres auteurs qui ont cultivé des cellules de mélanome humain ou de cellules de carcinome mammaire murin en sphéroïdes sur de l'agarose (LaRue *et al.* 2004).

L'initiation et la progression de l'apoptose ont été suivis par la mise en évidence des phosphatidylsérines sur la face externe de la membrane cellulaire (Fadok *et al.* 1992; Verhoven *et al.* 1995; Vermes *et al.* 1995). L'annexine-V est une protéine qui

se lie spécifiquement à la phosphatidylsérine en présence d'ions  $Ca^{2+}$ . La phosphatidylsérine est un phospholipide qui se situe sur le feuillet interne de la membrane plasmique des cellules saines mais qui est externalisé sur le feuillet externe dès la mise en place d'un processus apoptotique. Les évènements apoptotiques plus tardifs ont été détectés par le test Apostain. Cette méthode est basée sur la sensibilité accrue de l'ADN des cellules apoptotiques à la dénaturation thermique. L'ADN dénaturé par la chaleur en présence de formamide est ensuite reconnu par un Ac monoclonal spécifique de l'ADN simple-brin. Cette technique est plus sensible que la méthode TUNEL pour discriminer les évènements apoptotiques et nécrotiques (Frankfurt and Krishan 2001). Les résultats obtenus par le test à l'annexine-V et l'Apostain sont complémentaires : ils démontrent clairement la présence de cellules apoptotiques à 24 et 48h sur les deux supports anti-adhésifs quel que soit le type cellulaire non-cancéreux considéré (Swiss 3T3 et MC-3T3). Ces résultats sont en accord avec des travaux précédents qui montraient que des fibroblastes de la lignée Swiss 3T3 s'agrégeaient sur une membrane cellulosique - le Cuprophan – et entraient en apoptose *via* la voie mitochondriale (Gekas *et al.* 2004; Fauchoux *et al.* 2006a). Concernant les MC-3T3, nos résultats suggèrent que les pré-ostéoblastes entrent très tôt en apoptose lorsqu'ils sont cultivés sur un support anti-adhésif, ce qui explique que leur prolifération et leur nombre soient très significativement diminués 24 et 48h après l'ensemencement (respectivement 50% et 25% du nombre de cellules ensemencées sont retrouvées). Toutefois, parmi les cellules MC-3T3 survivantes, la proportion de cellules vivantes en phase S-G2/M du cycle cellulaire reste importante. D'autres études sont requises pour étudier ce phénomène, qui semble indiquer l'existence d'une sous-population plus résistante à l'apoptose.

Au contraire, cultivées sur supports anti-adhésifs, les cellules de mélanome à haut pouvoir métastatique - les B16F10 - résistent à l'apoptose même 48h après l'ensemencement. Il a en effet été montré qu'une protéine inhibitrice de l'apoptose ("melanoma inhibitor of apoptosis protein") est sur-exprimée dans les cellules de mélanome (Mousavi-Shafaei *et al.* 2006). Néanmoins, des résultats préliminaires suggèrent que CEL ne fasse que retarder la mise en place du processus apoptotique pour les B16F10. L'apoptose semble en effet être initiée dès 4 à 5 jours (communication personnelle d'Oumou GOUNDIAM, résultats de thèse).

## 2 Analyse des interactions polaires avant et après adsorption de Fn

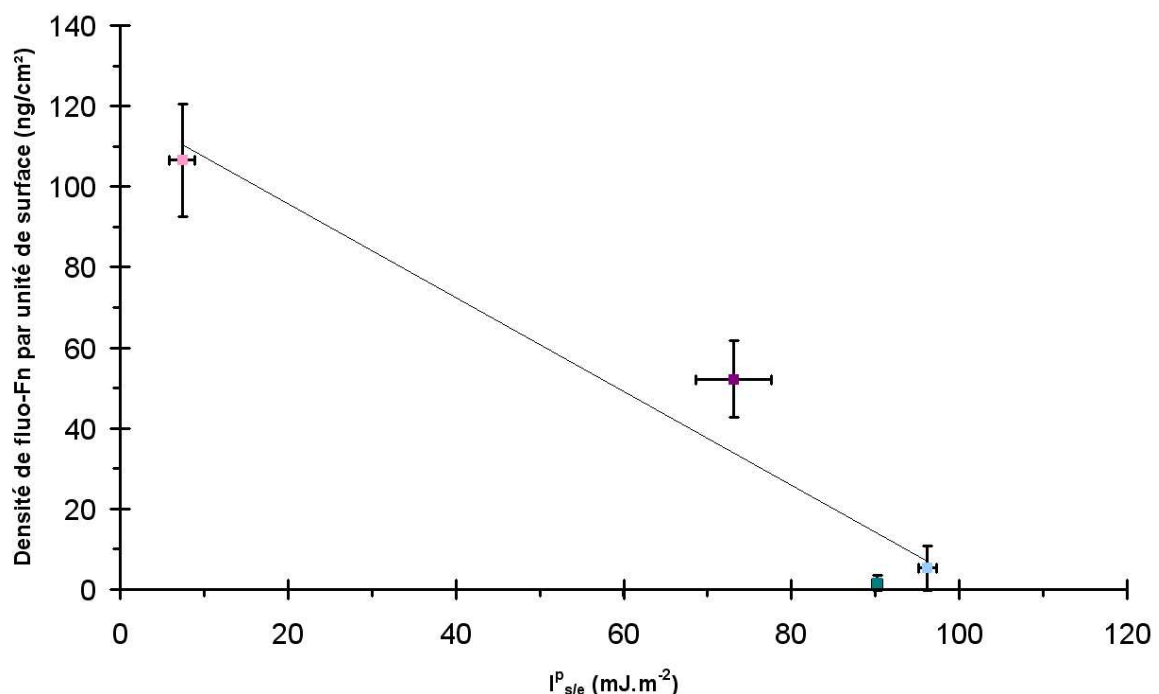
Il est reconnu que la polarité d'une surface est un facteur déterminant pour l'adsorption de protéines et l'adhésion cellulaire consécutive (van der Valk *et al.* 1983; van Wachem *et al.* 1985; Schakenraad *et al.* 1986; Webb *et al.* 1998; Webb *et al.* 2000). Afin de décrire l'énergie de surface de couches de protéines adsorbées sur un substrat, il est courant de sécher ces surfaces et de mesurer les angles de contact à l'eau avec la méthode de la goutte posée (Toworfe *et al.* 2004; Chang *et al.* 2007; Harnett *et al.* 2007). Cette technique peut néanmoins introduire des artefacts ; le séchage à l'air pouvant induire une réorganisation de la couche protéique adsorbée avec un changement de conformation (van Oss 1995). Dans ce travail, nous avons caractérisé l'interaction polaire présente entre quatre biomatériaux différents - revêtus ou non de Fn - et une phase aqueuse (eau Ultrapure™ ou PBS pH 7,4). Grâce à l'immersion de substrats dans une solution, il devient alors possible de caractériser des biomatériaux ou des couches de protéines dans un environnement physiologique.

En mesurant les angles de contact en milieu liquide, l'interaction polaire existant entre chaque matériau à l'état brut et la phase aqueuse a pu être déterminée. Il apparaît alors le profil d'hydrophilicité suivant : PolyHEMA > CEL > PSt > PS. Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus avec la méthode de la goutte posée (mesure des angles de contact à l'air libre). Les interactions polaires entre l'eau et CEL ou PS sont équivalentes quelle que soit la technique de mesure considérée. Toutefois, le caractère polaire de PolyHEMA et PSt apparaît sous-estimé en utilisant la méthode de la goutte posée. Ainsi avec cette technique, le profil d'hydrophilicité suivant est obtenu : CEL > PolyHEMA > PSt > PS.

De nombreux matériaux peuvent subir une modification de surface en fonction de l'environnement immédiat. Il a été notamment reporté que le PolyHEMA exhibe à l'air libre des groupements méthyle (-CH<sub>3</sub>, issus de la chaîne carbonée du polymère), alors que cette surface devient riche en groupements hydroxyle (-OH) lorsqu'elle est

immergée en solution aqueuse (Ratner *et al.* 1978; Chen *et al.* 1999b). Nos observations illustrent clairement que la méthode de la goutte posée n'est pas adéquate pour la caractérisation de surfaces qui sont vouées à être au contact de fluides biologiques puisque la polarité des surfaces est sous-estimée.

Suite à l'adsorption de Fn, les interactions polaires de CEL et PolyHEMA sont similaires à celles obtenues pour les matériaux bruts. Ces observations mises en parallèle avec la quantification de fluo-Fn adsorbée mettent en évidence la faible affinité de la Fn pour les surfaces très hydrophiles. Au contraire, l'adsorption de Fn sur PSt et PS induit une considérable augmentation des interactions polaires. Ces résultats sont confirmés par les quantités respectives de fluo-Fn adsorbées sur ces surfaces plus hydrophobes. Ainsi, la quantité de fluo-Fn (désorbée selon le protocole classique, *cf* Chapitre II pp.77-78) est inversement corrélée à l'interaction polaire des surfaces brutes (Figure 36) : plus l'interaction polaire est faible (*i.e.* matériau hydrophobe) plus la Fn s'adsorbe. Ceci est en accord avec la littérature qui reporte l'adsorption privilégiée de molécules de Fn sur des surfaces hydrophobes par rapport à des surfaces hydrophiles (Chang *et al.* 2007).



**Figure 36 - Corrélation inverse entre l'interaction polaire des matériaux bruts et la densité de fluo-Fn adsorbée (protocole classique, cf Chapitre II pp.77-78).**

Le revêtement de Fn sur PSt et PS induit une augmentation de l'interaction polaire de ces matériaux vis-à-vis de l'eau, c'est-à-dire une augmentation de l'hydrophilicité. Ce résultat est en contradiction avec plusieurs résultats issus de la littérature ; plusieurs équipes ont montré, dans le cadre de leurs études, une augmentation de l'hydrophobicité de leurs surfaces suite à l'adsorption de Fn (MacDonald *et al.* 1998; Toworfe *et al.* 2004; Chang *et al.* 2007; Harnett *et al.* 2007). Harnett *et al.* ont notamment observé une augmentation significative de l'angle de contact à l'eau après adsorption de Fn sur du polystyrène de grade bactérien ( $\theta_{e, \text{polystyrène brut}} = 65,9^\circ$  vs  $\theta_{e, \text{polystyrène + Fn}} = 97,6^\circ$ ). Dans la plupart de ces études, la méthode de la goutte posée est utilisée et les résultats sont interprétés à l'aide du modèle de Good-van Oss pour déterminer les différentes composantes de l'énergie libre de surface (*i.e.* composante acide, basique et de Lifshitz-van der Waals) de substrats polymériques (Bismarck *et al.* 1999) ou protéiques (De Bartolo *et al.* 2001; De Bartolo *et al.* 2002; Harnett *et al.* 2007). L'utilisation de la technique de la goutte posée implique la nécessité de sécher les surfaces et en particulier les revêtements de protéines. Au cours de son adsorption sur une surface hydrophobe, une protéine tend à orienter ses sites hydrophobes vers le substrat. Au cours de l'étape du séchage, l'air (qui est modérément hydrophobe) et la surface entrent en compétition ce qui induit une fragilisation du revêtement protéique (van Oss 1995). Les protéines peuvent changer de conformation en réorientant leurs résidus hydrophobes vers l'air et le système surface / protéines devient hydrophobe (van Oss 1994; van Oss 1995). Ainsi, la combinaison de l'immersion de biomatériaux revêtus ou non de couches protéiques et de la technique de mesure d'angles de contact en milieu liquide fournit un excellent modèle dans la caractérisation de surfaces biologiques et permet une interprétation plus réaliste des paramètres impliqués dans les interactions protéine-surface et l'adhésion cellulaire résultante.

### **3 Analyse de l'interaction Fn-surface à long-terme**

De nombreux auteurs ont étudié les mécanismes d'interaction entre la Fn et des surfaces variées. Sousa *et al.* (Sousa *et al.* 2007) ont suivi l'adsorption de Fn sur des surfaces de TiO<sub>2</sub> par AFM (analyse de la topographie), ellipsométrie, XPS et radiomarquage par iodination des tyrosines (<sup>125</sup>I) de la Fn. Les résultats obtenus mettent en évidence la capacité de la Fn à s'adsorber spontanément et à former des agrégats à la surface des échantillons de TiO<sub>2</sub>. Les expériences avec la Fn radiomarquée révèlent l'adsorption très rapide de la Fn sur les matériaux mais les auteurs spécifient que le fait de greffer une sonde radioactive sur la protéine peut modifier significativement la structure et/ou le comportement de la protéine.

García *et al.* (Garcia *et al.* 1999) ont évalué l'impact des changements de conformation de la Fn sur la prolifération cellulaire et la différenciation après adsorption de la protéine sur du polystyrène de grade bactérien, du polystyrène traité pour la culture cellulaire et sur des couches de collagène. La quantité de Fn adsorbée et la conformation ont été suivies par radiomarquage à <sup>125</sup>I et des tests ELISA (en utilisant des Acs monoclonaux) respectivement. En fonction des surfaces étudiées, les auteurs ont observé des changements de conformation notables de la Fn qui influencent directement le nombre de cellules attachées et leur prolifération. Sur chaque surface, ils ont également établi les isothermes d'adsorption de <sup>125</sup>I-Fn après saturation en BSA. Cependant, il est à noter que le greffage de la sonde <sup>125</sup>I peut changer la conformation de la protéine native et que l'albumine peut entrer en compétition avec la Fn radiomarquée, ce qui peut changer la quantité initiale de protéines adsorbées (Nonckreman *et al.* 2007).

Faucheux *et al.* (Faucheux *et al.* 2006b) ont examiné l'influence de la composition chimique de différentes surfaces auto-assemblées de silanes (groupements amine ou carboxylique) sur l'adsorption de Fn marquée à la fluorescéine et l'étalement consécutif de fibroblastes par adhésion fibrillaire. Leurs observations indiquent que la composition chimique du substrat a une forte influence sur l'adsorption de Fn et sur la formation de la matrice en favorisant ou en inhibant les adhésions focales et fibrillaires. Toutefois, le marquage fluorescent de la Fn n'est pas sans conséquence sur la structure et la fonction biologique de la protéine (Hoffmann *et al.* 2008).

Ainsi, tous les auteurs cités ci-dessus utilisent des techniques de marquage (radiomarquage ou fluorescent) pour la caractérisation des interactions Fn-surface. Ces protocoles peuvent induire des changements de conformation de la protéine avec le greffage de <sup>125</sup>I ou de fluorescéine. Quant au protocole ELISA, basé sur la reconnaissance spécifique de sites particuliers par des Acs monoclonaux, les nombreuses étapes de rinçages et de saturation aboutissent à la désorption de la protéine d'intérêt. Ainsi, nous proposons d'évaluer les avantages et les limites de différentes approches sur l'analyse de l'affinité instantanée et à long-terme de la Fn pour nos surfaces anti- et pro-adhésives en ayant, au préalable, analysé le comportement de cellules adhésives sur ces surfaces revêtues ou non de Fn.

Mises en culture sur les substrats bruts en l'absence de sérum, les MC-3T3 adhèrent sur les deux matériaux à base de polystyrène mais ne s'étalent que sur tPS. Nous avons mis en évidence un phénomène similaire avec les Swiss 3T3 qui sécrètent alors immédiatement de la Fn (immunomarquages, résultats non publiés). Sans doute des protéines de la MEC sont-elles aussi immédiatement sécrétées par les MC-3T3 sur PSt et pas sur PS. L'étalement des cellules adhérentes est fréquemment observé sur les matériaux modérément hydrophiles (ici le tPS) par rapport aux surfaces complètement hydrophobes (ici le PS) (Steele *et al.* 1995). Plusieurs travaux ont d'ailleurs reporté l'existence d'une corrélation entre l'hydrophilicité et l'adhésion cellulaire de matériaux à base de polystyrène mais modifiés par hydroxylation (Lee *et al.* 1991), carbonylation (Ertel *et al.* 1991) et sulfonation (Kowalczyńska and Kaminski 1994). Après adsorption de Fn (2 et 50µg/mL), les cellules adhèrent et s'étalent sur tPS et PS. Cette observation est en accord avec d'autres études qui démontrent l'adsorption effective de Fn sur tPS et PS et son effet inducteur sur l'adhésion des cellules ainsi que sur leur étalement (Garcia *et al.* 1999; van der Zijpp *et al.* 2003).

Dans la section précédente, les interactions polaires développées entre les matériaux et l'eau ont été caractérisées. Il est établi que l'association de la mouillabilité et de la topographie des surfaces est de première importance dans le contrôle du comportement cellulaire (Kim *et al.* 2007; Khang *et al.* 2008). Ainsi, nous avons évalué la rugosité des différentes surfaces avant et après adsorption de Fn pour mieux comprendre comment le comportement de cellules adhérentes peut être

influencé. Sur CEL et PolyHEMA, avec ou sans protéines pré-adsorbées, aucune modification topographique n'a été observée. Deux hypothèses peuvent étayer ce résultat : les molécules de Fn s'adsorbent sur ces matériaux mais sont dénaturées ou la Fn n'a pas la capacité d'interagir avec ces supports. Sur PSt, le  $R_{rms}$  augmente significativement à mesure que la concentration des solutions de Fn utilisées pour les adsorptions s'accroît. La topographie est ainsi modifiée avec l'apparition d'une certaine granulosité. Ces observations suggèrent que la protéine s'adsorbe sur PSt sous forme globulaire ou a tendance à former des agrégats ; la Fn ayant la capacité de s'auto-assembler. L'adsorption de Fn ne semble pas changer la topographie de PS et les  $R_{rms}$  ne varient pas significativement. Or d'après le comportement cellulaire des MC-3T3 sur ce matériau après adsorption de Fn, il semblerait que la protéine se lie de manière effective à la surface. Ainsi, les mécanismes impliqués dans l'adsorption de la Fn sur PS et PSt sont différents. Lors de travaux précédents, l'hypothèse suivante a été émise : les matériaux hydrophobes engendrent une dénaturation des protéines ; les molécules de Fn se déplient et adoptent une conformation allongée (Baujard-Lamotte *et al.* 2008). En effet, les aa hydrophobes de la molécule de Fn qui sont normalement dirigés vers l'intérieur de la protéine globulaire, sont exposés à la surface hydrophobe et peuvent ainsi interagir avec elle. La Fn va alors s'adsorber sur PS mais en formant une monocouche de molécules allongées. La forme et la taille de molécules de Fn pré-adsorbées sur différentes surfaces ont été largement documentées dans la littérature. Pour des molécules de Fn dépliées, Bergkvist *et al.* (Bergkvist *et al.* 2003) ont trouvé qu'une molécule possédait une longueur de  $121 \pm 25$ nm alors que Erickson *et al.* (Erickson and Carrell 1983) trouvaient une longueur comprise entre 110 et 160nm. Sous forme globulaire, les molécules de Fn adsorbées sur du titane ont une longueur de  $16,5 \pm 1$ nm, une hauteur de  $2,5 \pm 0,5$ nm et une largeur de  $9,6 \pm 1,2$ nm (MacDonald *et al.* 1998). Vallières *et al.* (Vallieres *et al.* 2007) ont observé des molécules de Fn pré-adsorbées ou greffées sur du verre de silice et ont trouvé que les molécules avaient un diamètre variant de 29 à 32nm et une hauteur comprise entre 0,9 et 3nm.

L'ensemble de ces résultats démontre la nécessité de pouvoir quantifier l'interaction de la protéine avec la surface pour répondre à la question suivante : est-ce la conformation et/ou la quantité de Fn qui va influencer le comportement cellulaire ? Les résultats des tests ELISA donnent une information quant à la quantité



de Fn adsorbée ainsi que la conformation qu'elle adopte sur les différentes surfaces. Concernant les échantillons hydrophiles, CEL et PolyHEMA, la quantité de Fn adsorbée reste négligeable ; cela démontre effectivement les propriétés anti-adhésives de ces deux matériaux. Toutefois nous avons calculé le ratio (Absorbance Ac monoclonal)/(Absorbance Ac polyclonal) afin d'évaluer l'accessibilité de certains sites précis par rapport à la quantité totale de Fn effectivement présente sur les surfaces, même si la quantité de Fn adsorbée sur les surfaces hydrophiles est très faible. Les conformations adoptées par les molécules de Fn sur PolyHEMA, PSt et PS sont similaires (accessibilités RGD, C-terminal, Gélatine semblables). Il est donc compréhensible que sur PSt et PS, les cellules s'étalent en présence de Fn puisqu'une quantité non négligeable de protéines s'adsorbe dans une conformation rendant le domaine RGD est accessible. Sur CEL, pour les quelques molécules de Fn qui s'adsorbent, le site RGD reste inaccessible : les cellules cultivées sur ce support n'ont donc pas la capacité de s'accrocher. Concernant l'Ac N-terminal, toutes les surfaces présentent une réponse différente. Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'extrémité N-terminale de la molécule de Fn est très flexible, au contraire de l'extrémité C-terminale où la présence des deux ponts disulfure fournit une certaine rigidité au dimère (Figure 15). Toutefois, le protocole ELISA inclut une étape de saturation en BSA pour assurer une meilleure reconnaissance des sites antigéniques par les Acs. La BSA peut alors entrer en compétition avec les molécules de Fn pré-adsorbées. De plus, la nature de la surface, sa charge, sa rugosité et son hydrophobicité/hydrophilicité sont autant de paramètres qui peuvent moduler cette compétition (Nonckreman *et al.* 2007).

Une méthode simple pour quantifier l'adsorption de protéines sur les surfaces sans étape de saturation est le greffage de sondes fluorescentes sur la protéine d'intérêt. Deux protocoles ont été comparés : le protocole basique (pour avoir la quantité totale de Fn adsorbée) et le protocole type-ELISA pour évaluer l'effet des rinçages et de la saturation inhérents au protocole ELISA. En considérant le protocole basique, la Fn semble s'adsorber préférentiellement sur le polystyrène de grade bactérien, certainement grâce à l'importante hydrophobicité de ce matériau qui va donc présenter une très forte activité de surface en milieu aqueux. L'adsorption massive de Fn sur PS va donc contribuer à abaisser son énergie de surface en tampon PBS pH 7,2. Contrairement au protocole ELISA qui démontrait une affinité

plus grande de la Fn pour PSt par rapport à PS, le protocole basique de fluo-Fn révèle plus de Fn adsorbée sur PS. La comparaison des deux protocoles souligne l'influence de la saturation et des rinçages sur la désorption de la Fn. Suite à l'application du protocole ELISA, la Fn est désorbée de manière significative sur PS. Le fort caractère hydrophobe de PS peut augmenter sa capacité à adsorber des molécules amphiphiles telles que de la BSA ou du Tween 20. Ainsi, les résultats obtenus pour les tests ELISA doivent être considérés avec prudence car les effets de saturation et de démoillage peuvent être plus ou moins prononcés suivant le type de surface.

Cependant, comme de nombreux auteurs l'ont spécifié, le greffage de sondes fluorescentes (ou radioactives) peut modifier la conformation de la protéine native (Nonckreman *et al.* 2007; Hoffmann *et al.* 2008). Nous avons donc essayé d'appréhender par une technique complémentaire l'affinité de la Fn pour les surfaces par SF.

## 4 Analyse de l'interaction instantanée Fn-surface

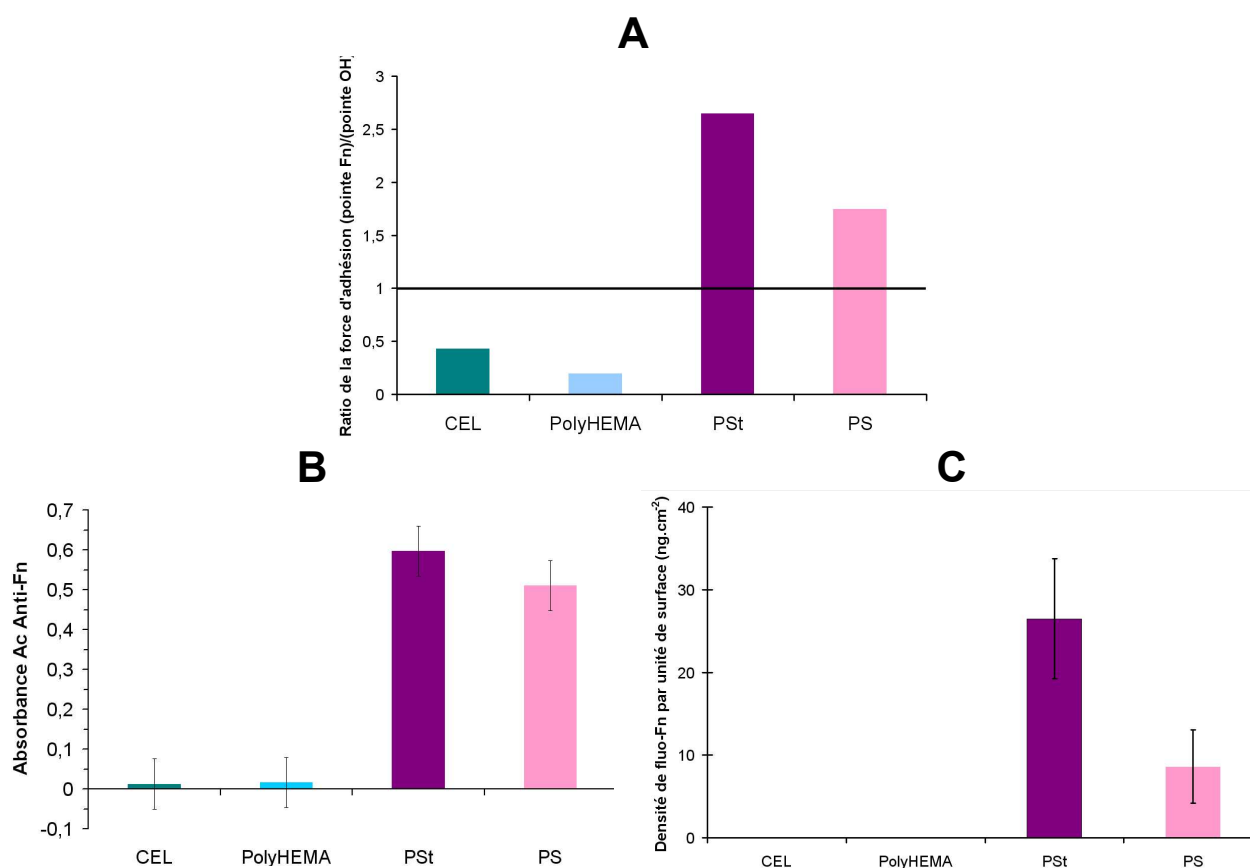
L'utilisation de la SF donne accès à l'affinité instantanée de la Fn pour les surfaces. Ce paramètre n'était pas disponible jusqu'alors puisque les adsorptions de Fn supposaient un temps d'incubation d'une durée de 45 minutes.

Aucun évènement adhésif n'est observé sur CEL quel que soit le type de pointe utilisée. En augmentant le temps de contact entre la pointe -Fn et la surface, la force moyenne et le pourcentage d'adhésion évoluent peu. On peut supposer que la formation d'une couche d'hydratation présente sur le substrat cellulosique empêche l'accès des protéines à la surface. Par contre, PolyHEMA est adhésif pour les trois types de pointe. Cependant, ce substrat présente une affinité accentuée pour les pointes contrôle et notamment la pointe -OH qui mime le comportement d'une protéine neutre hydrophile. Nous pouvons donc supposer qu'en milieu complet (solution protéique complexe), d'autres protéines s'adsorberont avant que la Fn entre en contact avec le substrat. Même en augmentant le temps de contact entre la pointe -Fn et la surface, la force d'adhésion reste constante sur PolyHEMA. Par les

techniques classiques (et à long-terme) de caractérisation des interactions protéine-surface, nous avons pu mettre en évidence le caractère anti-adhésif de CEL et PolyHEMA vis-à-vis de la Fn. Toutefois, la SF apporte des informations supplémentaires qui suggèrent que l'adhésion de la Fn sur CEL et PolyHEMA est inhibée par des propriétés de surface différentes.

Sur PSt, les histogrammes des forces d'adhésion montrent une augmentation significative de l'affinité de la pointe -Fn. De plus, en augmentant le temps de contact entre la pointe et la surface, la protéine est plus fortement adsorbée sur PSt avec une augmentation significative de la force d'adhésion. Plus le temps de contact entre la protéine et la surface est long et plus il devient difficile de séparer les deux entités.

PS est un matériau hydrophobe qui induit pour toutes les pointes des forces d'adhésion de l'ordre du  $\sim 1\text{nN}$ , soit environ dix fois plus que les autres forces considérées dans l'étude. En mesurant des forces en conditions dynamiques, Meyer *et al.* (Meyer *et al.* 2005) ont suggéré que les forces induites par les surfaces hydrophobes sont dues à une combinaison de forces hydrophobes à courte-portée et des forces à longue distance. Miklavic *et al.* (Miklavic *et al.* 1994) montrent que la théorie prédit que l'interaction entre deux surfaces non-uniformes neutres sera toujours attractive et d'un ordre de grandeur similaire ou supérieur à celui des forces d'attraction de van der Waals. D'autre part, Alsteens *et al.* (Alsteens *et al.* 2007) mettent en évidence que l'interaction hydrophobe entre une pointe AFM et des surfaces, toutes deux riches en groupements  $-\text{CH}_3$  (sous eau), est de l'ordre de grandeur du nanonewton. Cette équipe montre également que l'enrichissement d'une surface en groupement  $-\text{CH}_3$  induit une augmentation significative de l'interaction hydrophobe en système immergé (sous eau) avec une corrélation entre l'hydrophobicité et la force d'adhésion (Alsteens *et al.* 2007). L'ensemble de ces observations peuvent expliquer l'ordre de grandeur obtenu pour les forces d'attraction induites par PS.

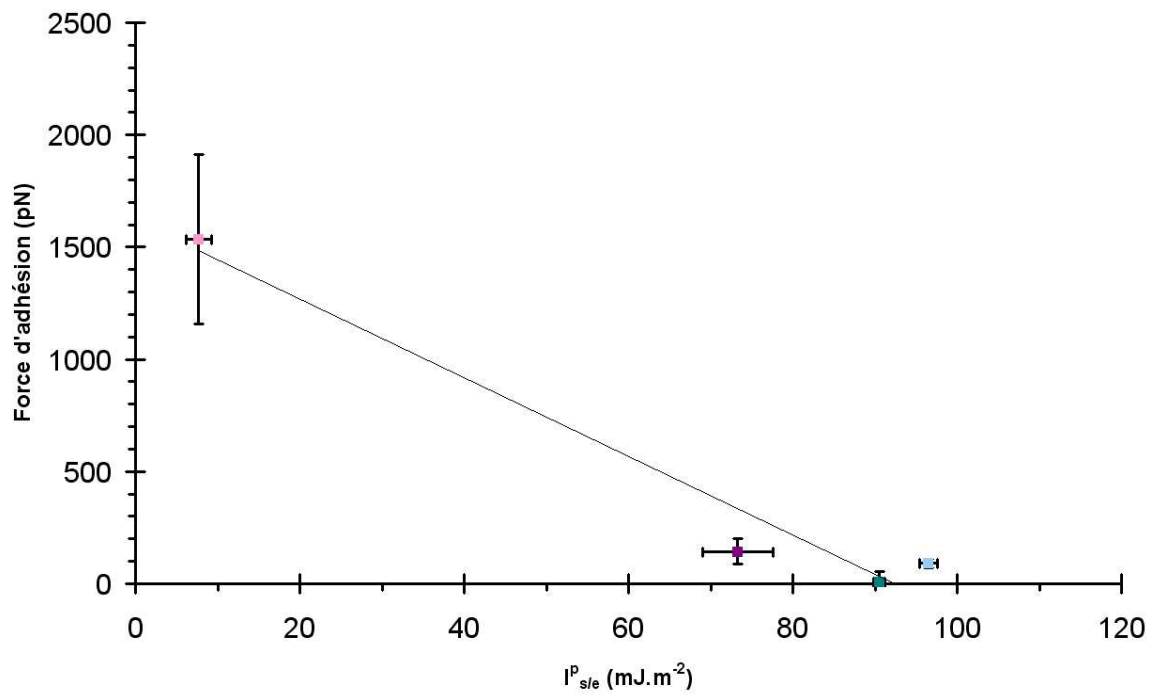


**Figure 37 – Comparaison des interactions instantanées et à long-terme de la Fn pour les surfaces.**

A- SF : graphique représentant le ratio (force d'adhésion pointe -Fn) / (force d'adhésion pointe -OH) ; B- test ELISA : quantification de l'adsorption de Fn par un Ac polyclonal ; C- Fluo-Fn : quantification de l'adsorption de Fn en appliquant le protocole type-ELISA.

En considérant les ratios (force d'adhésion pointe -Fn) / (force d'adhésion pointe -OH), deux surfaces sont pro-adhésives pour la Fn, PSt et PS, avec une affinité accrue de la protéine pour PSt (Figure 37). CEL et PolyHEMA sont quant à elle anti-adhésives (ratio < 1). En comparant le graphe des ratios avec les graphes obtenus pour les ELISA (Ac polyclonal) et la fluo-Fn en utilisant un protocole type-ELISA (Figure 37), les profils sont similaires. Les trois techniques fournissent des résultats comparables quant à l'affinité instantanée ou à plus long-terme. Malgré les avantages et les inconvénients de chacune des techniques, l'ensemble des informations conduit aux mêmes conclusions. Enfin, tout comme la quantité de Fn adsorbée sur les surfaces est inversement corrélée à l'interaction polaire, de même,

les forces d'adhésion sont inversement corrélées aux interactions polaires des matériaux bruts (Figure 38).



**Figure 38 – Corrélation inverse entre l'interaction polaire des matériaux bruts et la force d'adhésion.**

## Conclusions et perspectives

---

Ce travail a démontré le caractère anti-adhésif de CEL en tant que revêtement de boîtes pour cultures cellulaires. CEL est anti-adhésif à la fois d'un point de vue protéique et cellulaire (Tableau 15). L'adsorption de Fn sur CEL a été caractérisée à l'aide de différentes techniques. Malgré certains inconvénients des méthodes utilisées, toutes donnent des résultats complémentaires et illustrent la capacité de CEL à empêcher l'adsorption de Fn. Cette étude pluri-disciplinaire démontre l'intérêt de combiner de multiples outils pour améliorer la compréhension des mécanismes d'adsorption des protéines sur des surfaces. En outre, ces travaux ont mis en évidence l'intérêt des mesures d'angles de contact en milieu liquide pour évaluer les interactions polaires de biomatériaux ou revêtements protéiques en milieu physiologique.

**Tableau 15 – Tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus pour CEL**

|   |  |
|---|--|
| Culture cellulaire                          | Morphologie agrégée<br>Induction de l'apoptose<br>Cellules bloquées en phase G1 du cycle cellulaire  |
| Angles de contact en milieu liquide-liquide | Matériau hydrophile<br>Forte interaction polaire entre l'eau et CEL<br>Aucune modification de l'interaction polaire après adsorption de Fn |
| fluo-Fn                                     | Quantité négligeable de Fn adsorbée  |
| ELISA                                       | Mauvaise accessibilité du site RGD   |
| SF  | Affinité instantanée négligeable de la Fn pour CEL<br>Faible pourcentage d'adhésion protéique  |

En empêchant l'adsorption des protéines adhésives du sérum (et notamment la Fn), CEL va induire l'agrégation des cellules adhérentes et va les diriger vers un processus apoptotique, *i.e.* la mort cellulaire programmée. Cette étude montre que CEL est un biomatériau anti-adhésif donnant des résultats démonstratifs et reproductibles. Son principal avantage en tant que revêtement pour dispositifs de culture cellulaire est sa longue durée de vie (au moins deux ans) par rapport à celle du PolyHEMA (deux semaines). Non seulement la CMC représente un matériau alternatif pour des applications de culture cellulaire nécessitant une surface empêchant l'adhésion cellulaire mais elle constitue également un excellent

biomatériau pour des dispositifs médicaux devant prévenir l'adhésion, l'étalement et la colonisation des cellules.

Afin de compléter la caractérisation des nombreuses propriétés de surface des différents substrats utilisés, il serait nécessaire d'effectuer des études XPS. Nous n'avons également considéré que la Fn comme protéine adhésive du milieu physiologique. Il est évidemment indispensable de renouveler l'ensemble des expériences avec d'autres protéines adhésives ou non et de finir par un mélange complexe de protéines, type sérum ou milieu complet. Les techniques ainsi développées (en particulier la méthode de mesures d'angles de contact en milieu liquide et la SF) ont montré leur utilité dans la caractérisation de surfaces destinées à être en contact avec des fluides biologiques et sont ainsi adaptables à la caractérisation de biomatériaux entrant dans la composition de dispositifs médicaux variés.



## Références

---

- Absolom, D. R., C. J. Van Oss, et al. (1981). "Determination of surface tensions of proteins. II. Surface tension of serum albumin, altered at the protein-air interface." Biochim Biophys Acta 670(1): 74-8.
- Absolom, D. R., W. Zingg, et al. (1987). "Protein adsorption to polymer particles: role of surface properties." J Biomed Mater Res 21(2): 161-71.
- Ahimou, F., A. Touhami, et al. (2003). "Real-time imaging of the surface topography of living yeast cells by atomic force microscopy." Yeast 20(1): 25-30.
- Akiyama, S. K. and K. M. Yamada (1987). "Fibronectin." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 59: 1-57.
- Alsteens, D., E. Dague, et al. (2007). "Direct measurement of hydrophobic forces on cell surfaces using AFM." Langmuir 23(24): 11977-9.
- Altankov, G., F. Grinnell, et al. (1996). "Studies on the biocompatibility of materials: fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability." J Biomed Mater Res 30(3): 385-91.
- Altankov, G. and T. Groth (1994). "Reorganization of substratum-bound fibronectin on hydrophilic and hydrophobic materials is related to biocompatibility." J. Mater. Sci. Mater. Med 5: 732-7.
- Arai, T. and W. Norde (1990a). "The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces 1. Adsorption from single protein solutions." Colloids and Surfaces 51: 1-15.
- Arai, T. and W. Norde (1990b). "The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces 2. Sequential and competitive adsorption." Colloids and Surfaces 51: 17-28.
- Ashkin, A. (1997). "Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers." Proc Natl Acad Sci U S A 94(10): 4853-60.

- Ashkin, A., K. Schutze, et al. (1990). "Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser trap." Nature 348(6299): 346-8.
- Bagambisa, F. B., H. F. Kappert, et al. (1994). "Cellular and molecular biological events at the implant interface." J Craniomaxillofac Surg 22(1): 12-7.
- Baier, R. E. and R. C. Dutton (1969). "Initial events in interactions of blood with a foreign surface." J Biomed Mater Res 3(1): 191-206.
- Baker, A. A., W. Helbert, et al. (2000). "New insight into cellulose structure by atomic force microscopy shows the i(alpha) crystal phase at near-atomic resolution." Biophys J 79(2): 1139-45.
- Bale, M. D., L. A. Wohlfahrt, et al. (1989). "Identification of vitronectin as a major plasma protein adsorbed on polymer surfaces of different copolymer composition." Blood 74(8): 2698-706.
- Barbucci, R., G. Leone, et al. (2004). "Novel carboxymethylcellulose-based microporous hydrogels suitable for drug delivery." J Biomater Sci Polym Ed 15(5): 607-19.
- Baszkin, A. and D. J. Lyman (1980). "The interaction of plasma proteins with polymers. I. Relationship between polymer surface energy and protein adsorption/desorption." J Biomed Mater Res 14(4): 393-403.
- Baujard-Lamotte, L., S. Noinville, et al. (2008). "Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 63(1): 129-137.
- Beck, D. E. (1997). "The role of Seprafilm bioresorbable membrane in adhesion prevention." Eur J Surg Suppl(577): 49-55.
- Benoit, M., D. Gabriel, et al. (2000). "Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy." Nat Cell Biol 2(6): 313-7.

- Benya, P. D. and J. D. Shaffer (1982). "Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels." Cell 30(1): 215-24.
- Ben-Ze'ev, A., S. R. Farmer, et al. (1980). "Protein synthesis requires cell-surface contact while nuclear events respond to cell shape in anchorage-dependent fibroblasts." Cell 21(2): 365-72.
- Bergkvist, M., J. Carlsson, et al. (2003). "Surface-dependent conformations of human plasma fibronectin adsorbed to silica, mica, and hydrophobic surfaces, studied with use of Atomic Force Microscopy." J Biomed Mater Res A 64(2): 349-56.
- Bezanilla, M., B. Drake, et al. (1994). "Motion and enzymatic degradation of DNA in the atomic force microscope." Biophys J 67(6): 2454-9.
- Birdi, K. S. (1981). "Cell adhesion on solids and the role of surface forces." J Theor Biol 93(1): 1-5.
- Bismarck, A., M. E. Kumru, et al. (1999). "Characterization of Several Polymer Surfaces by Streaming Potential and Wetting Measurements: Some Reflections on Acid-Base Interactions." J Colloid Interface Sci 217(2): 377-387.
- Blanco, E. M., M. A. Horton, et al. (2008). "Simultaneous investigation of the influence of topography and charge on protein adsorption using artificial nanopatterns." Langmuir 24(6): 2284-7.
- Bohnert, J. L. and T. A. Horbett (1986). "Changes in adsorbed fibrinogen and albumin interactions with polymers indicated by decreases in detergent elutability." Journal of Colloid and Interface Science 111(2): 363-377.
- Bork, P. and R. F. Doolittle (1992). "Proposed acquisition of an animal protein domain by bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A 89(19): 8990-4.

- Bottaro, D. P., A. Liebmann-Vinson, et al. (2002). "Molecular signaling in bioengineered tissue microenvironments." Ann N Y Acad Sci 961: 143-53.
- Boudreau, N. J. and P. L. Jones (1999). "Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come." Biochem J 339 ( Pt 3): 481-8.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-54.
- Brash, J. L. (1983). Mechanism of adsorption of proteins to solid surfaces and its relationship to blood compatibility. In: Szycher, M., ed. Biocompatible Polymers, Metals, and Composites. Lancaster, PA: Technomic: 35-52.
- Brash, J. L. and T. A. Horbett (1995). Proteins at interfaces: An overview. In: Horbett, T.A. and Brash, J.L., eds. Proteins at Interfaces II: Fundamentals and Applications. Washington, D.C.: American Chemical Society: 1-23.
- Bren, L., L. English, et al. (2004). "Hydrophilic/electron-acceptor surface properties of metallic biomaterials and their effect on osteoblast cell activity." Journal of Adhesion Science and Technology 18(15-16): 1711-1722.
- Bretland, A. J., J. Lawry, et al. (2001). "A study of death by anoikis in cultured epithelial cells." Cell Prolif 34(4): 199-210.
- Brock, A., E. Chang, et al. (2003). "Geometric determinants of directional cell motility revealed using microcontact printing." Langmuir 19(5): 1611-7.
- Buckenmaier, C. C., 3rd, M. A. Summers, et al. (2000). "Effect of the antiadhesive treatments, carboxymethylcellulose combined with recombinant tissue plasminogen activator and Seprafilm, on bowel anastomosis in the rat." Am Surg 66(11): 1041-5.
- Burridge, K. and K. Fath (1989). "Focal contacts: transmembrane links between the extracellular matrix and the cytoskeleton." Bioessays 10(4): 104-8.

- Busscher, H. J., W. van der Vegt, et al. (1991). "Interfacial free energy changes occurring during BSA adsorption in solution droplets on FEP-Teflon surfaces as measured by ADSA-P." Colloids and Surfaces 58(3): 229-237.
- Caruso, D. M., K. N. Foster, et al. (2006). "Randomized clinical study of Hydrofiber dressing with silver or silver sulfadiazine in the management of partial-thickness burns." J Burn Care Res 27(3): 298-309.
- Chang, T. Y., V. G. Yadav, et al. (2007). "Cell and protein compatibility of parylene-C surfaces." Langmuir 23(23): 11718-25.
- Chen, C. S., J. L. Alonso, et al. (2003). "Cell shape provides global control of focal adhesion assembly." Biochem Biophys Res Commun 307(2): 355-61.
- Chen, C. S., C. Brangwynne, et al. (1999a). "Pictures in cell biology: squaring up to the cell-shape debate." Trends Cell Biol 9(7): 283.
- Chen, C. S., M. Mrksich, et al. (1997). "Geometric control of cell life and death." Science 276(5317): 1425-8.
- Chen, C. S., M. Mrksich, et al. (1998). "Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function." Biotechnol Prog 14(3): 356-63.
- Chen, Q., D. Zhang, et al. (1999b). "Probing the Surface Structural Rearrangement of Hydrogels by Sum-Frequency Generation Spectroscopy." J. Am. Chem. Soc. 121(2): 446-447.
- Cheng, S. L., C. F. Lai, et al. (2001). "Bone mineralization and osteoblast differentiation are negatively modulated by integrin alpha(v)beta3." J Bone Miner Res 16(2): 277-88.
- Chiarugi, P. (2008). "From anchorage dependent proliferation to survival: lessons from redox signalling." IUBMB Life 60(5): 301-7.

- Chiumiento, A., A. Dominguez, et al. (2006). "Anti-inflammatory properties of superoxide dismutase modified with carboxymetil-cellulose polymer and hydrogel." J Mater Sci Mater Med 17(5): 427-35.
- Chou, L., J. D. Firth, et al. (1995). "Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts." J Cell Sci 108 ( Pt 4): 1563-73.
- Cicchetti, S., M. S. Leone, et al. (2002). "[Evaluation of the tolerability of Hydrogel breast implants: a pilot study]." Minerva Chir 57(1): 53-7.
- Clausen-Schaumann, H., M. Seitz, et al. (2000). "Force spectroscopy with single bio-molecules." Curr Opin Chem Biol 4(5): 524-30.
- Clover, J., R. A. Dodds, et al. (1992). "Integrin subunit expression by human osteoblasts and osteoclasts in situ and in culture." J Cell Sci 103 ( Pt 1): 267-71.
- Colton, R. J., D. R. Baselt, et al. (1997). "Scanning probe microscopy." Curr Opin Chem Biol 1(3): 370-7.
- Cui, Y. and C. Bustamante (2000). "Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher-order structure." Proc Natl Acad Sci U S A 97(1): 127-32.
- Dalton, B. A., C. D. McFarland, et al. (1998). "Polymer surface chemistry and bone cell migration." J Biomater Sci Polym Ed 9(8): 781-99.
- Dalton, S. L., E. E. Marcantonio, et al. (1992). "Cell attachment controls fibronectin and alpha 5 beta 1 integrin levels in fibroblasts. Implications for anchorage-dependent and -independent growth." J Biol Chem 267(12): 8186-91.
- Damsky, C. H. and D. Ilic (2002). "Integrin signaling: it's where the action is." Curr Opin Cell Biol 14(5): 594-602.

- Damsky, C. H., A. Moursi, et al. (1997). "The solid state environment orchestrates embryonic development and tissue remodeling." Kidney Int 51(5): 1427-33.
- Datta, N., H. L. Holtorf, et al. (2005). "Effect of bone extracellular matrix synthesized in vitro on the osteoblastic differentiation of marrow stromal cells." Biomaterials 26(9): 971-7.
- De Bartolo, L., S. Morelli, et al. (2001). "The influence of polymeric membrane surface free energy on cell metabolic functions." J Mater Sci Mater Med 12(10-12): 959-63.
- De Bartolo, L., S. Morelli, et al. (2002). "Evaluation of cell behaviour related to physico-chemical properties of polymeric membranes to be used in bioartificial organs." Biomaterials 23(12): 2485-97.
- de Gennes, P. G., F. Brochard-Wyart, et al. (2002). Gouttes, bulles, perles et ondes. Paris, France.
- De Marino, S., M. A. Morelli, et al. (1999). "An immunoglobulin-like fold in a major plant allergen: the solution structure of Phl p 2 from timothy grass pollen." Structure 7(8): 943-52.
- De Pauw-Gillet, M. C., Y. M. Christiane, et al. (1988). "Analysis of tridimensional mixed cultures of mouse B16 melanoma cells and 3T3 fibroblasts." Anticancer Res 8(1): 153-60.
- Degasne, I., M. F. Basle, et al. (1999). "Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces." Calcif Tissue Int 64(6): 499-507.
- Dewez, J.-L., A. Doren, et al. (1999). "Competitive adsorption of proteins: Key of the relationship between substratum surface properties and adhesion of epithelial cells." Biomaterials 20(6): 547-559.



- Dewez, J.-L., J.-B. Lhoest, et al. (1998). "Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces: from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns." Biomaterials 19(16): 1441-1445.
- Diaz-Montero, C. M. and B. W. McIntyre (2005). "Acquisition of anoikis resistance in human osteosarcoma cells does not alter sensitivity to chemotherapeutic agents." BMC Cancer 5(1): 39.
- Dike, L. E., C. S. Chen, et al. (1999). "Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates." In Vitro Cell Dev Biol Anim 35(8): 441-8.
- DiMilla, P. A., J. A. Stone, et al. (1993). "Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength." J Cell Biol 122(3): 729-37.
- dos Santos, E. A., M. Farina, et al. (2008). "Surface energy of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion." J Mater Sci Mater Med 19(6): 2307-16.
- Draye, J. P., B. Delaey, et al. (1998). "In vitro and in vivo biocompatibility of dextran dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel films." Biomaterials 19(18): 1677-87.
- Dunlap, D. D., A. Maggi, et al. (1997). "Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery." Nucleic Acids Res 25(15): 3095-101.
- Dupont-Gillain, C. C. and P. G. Rouxhet (2001). "AFM Study of the Interaction of Collagen with Polystyrene and Plasma-Oxidized Polystyrene." Langmuir 17(23): 7261-7266.
- Dupré (1869). Théorie mécanique de la chaleur. Gauthier-Villars. Paris, France: pp.367-370.
- Dupres, V., F. D. Menozzi, et al. (2005). "Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesins on living bacteria." Nat Methods 2(7): 515-20.

- Ebner, A., L. Wildling, et al. (2007). "A new, simple method for linking of antibodies to atomic force microscopy tips." Bioconjug Chem 18(4): 1176-84.
- El Kirat, K., Y. F. Dufrene, et al. (2006). "The SIV tilted peptide induces cylindrical reverse micelles in supported lipid bilayers." Biochemistry 45(30): 9336-41.
- El Kirat, K., L. Lins, et al. (2005). "Nanoscale Modification of Supported Lipid Membranes: Synergetic Effect of Phospholipase D and Viral Fusion Peptides." Journal of Biomedical Nanotechnology 1(1): 39-46(8).
- El Kirat, K. and S. Morandat (2007). "Cholesterol modulation of membrane resistance to Triton X-100 explored by atomic force microscopy." Biochim Biophys Acta 1768(9): 2300-9.
- Ellingsen, J. E. (1991). "A study on the mechanism of protein adsorption to TiO<sub>2</sub>." Biomaterials 12(6): 593-6.
- Elwing, H. B., L. Li, et al. (1995). Protein displacement phenomena in blood plasma and serum studied by the wettability gradient method and the lens-on-surface method. In: Horbett, T.A. and Brash, J.L., eds. Proteins at Interfaces II: Fundamentals and Applications. Washington, D.C.: American Chemical Society: 138-149.
- Erickson, H. P. and N. A. Carrell (1983). "Fibronectin in extended and compact conformations. Electron microscopy and sedimentation analysis." J Biol Chem 258(23): 14539-44.
- Ertel, S. I., A. Chilkoti, et al. (1991). "Endothelial cell growth on oxygen-containing films deposited by radio-frequency plasmas: the role of surface carbonyl groups." J Biomater Sci Polym Ed 3(2): 163-83.
- Ertel, S. I., B. D. Ratner, et al. (1994). "In vitro study of the intrinsic toxicity of synthetic surfaces to cells." J Biomed Mater Res 28(6): 667-75.

- Evans, E. (2001). "Probing the relation between force--lifetime--and chemistry in single molecular bonds." Annu Rev Biophys Biomol Struct 30: 105-28.
- Evans, E., K. Ritchie, et al. (1995). "Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces." Biophys J 68(6): 2580-7.
- Fabrizius-Homan, D. J. and S. L. Cooper (1991a). "A comparison of the adsorption of three adhesive proteins to biomaterial surfaces." J Biomater Sci Polym Ed 3(1): 27-47.
- Fabrizius-Homan, D. J. and S. L. Cooper (1991b). "Competitive adsorption of vitronectin with albumin, fibrinogen, and fibronectin on polymeric biomaterials." J Biomed Mater Res 25(8): 953-71.
- Fabrizius-Homan, D. J., S. L. Cooper, et al. (1992). "The ex vivo effect of preadsorbed vitronectin on platelet activation." Thromb Haemost 68(2): 194-202.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, et al. (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." J Immunol 148(7): 2207-16.
- Faucheux, N., C. Correze, et al. (2001). "Accumulation of cyclic AMP in Swiss 3T3 cells adhering to a cellulose biomaterial substratum through interaction with adenylyl cyclase." Biomaterials 22(22): 2993-8.
- Faucheux, N., J. Duval, et al. (2006a). Behavior of Cells Cultured on Cuprophan. Modified Fibers with Medical and Specialty Applications: 35-47.
- Faucheux, N., R. Tzoneva, et al. (2006b). "The dependence of fibrillar adhesions in human fibroblasts on substratum chemistry." Biomaterials 27(2): 234-45.

- Faucheux, N., J. M. Zahm, et al. (2004). "Gap junction communication between cells aggregated on a cellulose-coated polystyrene: influence of connexin 43 phosphorylation." Biomaterials 25(13): 2501-6.
- Feder-Mengus, C., S. Ghosh, et al. (2007). "Multiple mechanisms underlie defective recognition of melanoma cells cultured in three-dimensional architectures by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes." Br J Cancer.
- Ffrench-Constant, C. and R. O. Hynes (1988). "Patterns of fibronectin gene expression and splicing during cell migration in chicken embryos." Development 104(3): 369-82.
- Fisher, T. E., P. E. Marszalek, et al. (2000). "Stretching single molecules into novel conformations using the atomic force microscope." Nat Struct Biol 7(9): 719-24.
- Florin, E. L., V. T. Moy, et al. (1994). "Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs." Science 264(5157): 415-7.
- Folkman, J. and A. Moscona (1978). "Role of cell shape in growth control." Nature 273(5661): 345-9.
- Fowkes, F. M. (1962). "Determination of interfacial tensions, contact angles, and dispersion forces in surfaces by assuming additivity of intermolecular interactions in surfaces." J. Phys. Chem. 66(2): 382-382.
- Fowkes, F. M. (1964a). "Attractive forces at interfaces." Ind. Eng. Chem. 56(12): 40-52.
- Fowkes, F. M. (1964b). Contact angle, Wettability and Adhesion. Washington DC, US, American Chemical Society.
- Francis, S. E., K. L. Goh, et al. (2002). "Central roles of alpha5beta1 integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies." Arterioscler Thromb Vasc Biol 22(6): 927-33.

- Frankfurt, O. S. and A. Krishan (2001). "Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin." J Histochem Cytochem 49(3): 369-78.
- Frisch, S. M. and H. Francis (1994). "Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis." J Cell Biol 124(4): 619-26.
- Frisch, S. M. and E. Ruoslahti (1997). "Integrins and anoikis." Curr Opin Cell Biol 9(5): 701-6.
- Frisch, S. M. and R. A. Screaton (2001). "Anoikis mechanisms." Curr Opin Cell Biol 13(5): 555-62.
- Fuse, Y., I. Hirata, et al. (2007). "Cell adhesion and proliferation patterns on mixed self-assembled monolayers carrying various ratios of hydroxyl and methyl groups." Dent Mater J 26(6): 814-9.
- Garcia, A. J., M. D. Vega, et al. (1999). "Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation." Mol Biol Cell 10(3): 785-98.
- Gekas, J., M. Hindie, et al. (2004). "The inhibition of cell spreading on a cellulose substrate (cuprophan) induces an apoptotic process via a mitochondria-dependent pathway." FEBS Lett 563(1-3): 103-7.
- Ghosh, S., R. Rosenthal, et al. (2005). "Culture of melanoma cells in 3-dimensional architectures results in impaired immunorecognition by cytotoxic T lymphocytes specific for Melan-A/MART-1 tumor-associated antigen." Ann Surg 242(6): 851-7, discussion 858.
- Giacomelli, C. E. and W. Norde (2001). "The Adsorption-Desorption Cycle. Reversibility of the BSA-Silica System." J Colloid Interface Sci 233(2): 234-240.

- Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti (1999). "Integrin signaling." Science 285(5430): 1028-32.
- Gilmore, A. P. (2005). "Anoikis." Cell Death Differ 12 Suppl 2: 1473-7.
- Gilmore, A. P., A. D. Metcalfe, et al. (2000). "Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization." J Cell Biol 149(2): 431-46.
- Globus, R. K., S. B. Doty, et al. (1998). "Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts." J Cell Sci 111 ( Pt 10): 1385-93.
- Goldmann, W. H. (2002). "Mechanical aspects of cell shape regulation and signaling." Cell Biol Int 26(4): 313-7.
- Good, R. J. (1993). Contact angle, wetting and adhesion: a critical review. Contact angle, wetting and adhesion. K. L. M. Ed. Utrecht, The Netherlands, VSP: pp.3-36.
- Green, R. J., M. C. Davies, et al. (1999). "Competitive protein adsorption as observed by surface plasmon resonance." Biomaterials 20(4): 385-91.
- Grinnell, F. (1986). "Focal adhesion sites and the removal of substratum-bound fibronectin." J Cell Biol 103(6 Pt 2): 2697-706.
- Grinnell, F. and M. K. Feld (1982). "Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium." J Biol Chem 257(9): 4888-93.
- Gronowicz, G. and M. B. McCarthy (1996). "Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion." J Orthop Res 14(6): 878-87.
- Gronthos, S., P. J. Simmons, et al. (2001). "Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix." Bone 28(2): 174-81.

- Grossmann, J. (2002). "Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis"." Apoptosis 7(3): 247-60.
- Grundke, K., T. Bogumil, et al. (1996). "Liquid-fluid contact angle measurements on hydrophilic cellulosic materials." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 116(1-2): 79-91.
- Grundke, K., C. Werner, et al. (1999). "Characterization of adsorbed protein layers by low-rate dynamic liquid-fluid contact angle measurements using axisymmetric drop shape analysis (part II)." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 156(1-3): 19-31.
- Grzesik, W. J. (1997). "Integrins and bone--cell adhesion and beyond." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 45(4): 271-5.
- Grzesik, W. J. and P. G. Robey (1994). "Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro." J Bone Miner Res 9(4): 487-96.
- Guest, J. F. and F. J. Ruiz (2005). "Modelling the cost implications of using carboxymethylcellulose dressing compared with gauze in the management of surgical wounds healing by secondary intention in the US and UK." Curr Med Res Opin 21(2): 281-90.
- Guest, J. F., F. J. Ruiz, et al. (2005). "Cost effectiveness of using carboxymethylcellulose dressing compared with gauze in the management of exuding venous leg ulcers in Germany and the USA." Curr Med Res Opin 21(1): 81-92.
- Guthold, M., X. Zhu, et al. (1999). "Direct observation of one-dimensional diffusion and transcription by Escherichia coli RNA polymerase." Biophys J 77(4): 2284-94.
- Han, W., S. M. Lindsay, et al. (1997). "Kinked DNA." Nature 386(6625): 563.

- Hanein, D., B. Geiger, et al. (1993). "Fibronectin adsorption to surfaces of hydrated crystals. An analysis of the importance of bound water in protein-substrate interactions." Langmuir 9(4): 1058-1065.
- Harnett, E. M., J. Alderman, et al. (2007). "The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 55(1): 90-97.
- Hayman, E. G., M. D. Pierschbacher, et al. (1985). "Vitronectin--a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum." Exp Cell Res 160(2): 245-58.
- Haynes, C. A. and W. Norde (1994). "Globular proteins at solid/liquid interfaces." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2(6): 517-566.
- Healy, K. E., A. Rezania, et al. (1999). "Designing biomaterials to direct biological responses." Ann N Y Acad Sci 875: 24-35.
- Hindie, M., G. Legeay, et al. (2005). "Culture of melanoma cells as aggregates on cellulose substratum." Biomol Eng 22(5-6): 205-8.
- Hindie, M., M. Vayssade, et al. (2006). "Interactions of B16F10 melanoma cells aggregated on a cellulose substrate." J Cell Biochem 99(1): 96-104.
- Hinterdorfer, P., W. Baumgartner, et al. (1996). "Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy." Proc Natl Acad Sci U S A 93(8): 3477-81.
- Hoffmann, C., J. Leroy-Dudal, et al. (2008). "Fluorescein isothiocyanate-labeled human plasma fibronectin in extracellular matrix remodeling." Anal Biochem 372(1): 62-71.
- Hong, S., P. R. Leroueil, et al. (2006). "Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability." Bioconjug Chem 17(3): 728-34.



- Horbett, T. A. (1994). "The role of adsorbed proteins in animal cell adhesion." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2(1-3): 225-240.
- Horbett, T. A. (1996). Proteins: Structure properties and adsorption to surfaces. In: Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., and Lemons, J.E., eds. Biomaterials Science. San Diego, CA: Academic Press: 133-141.
- Horbett, T. A. (2003). Biological activity of adsorbed proteins. In: Malmsten, M., ed. Biopolymers at Interfaces. New York, Marcel Dekker: 393-413.
- Horbett, T. A. and M. B. Schway (1988). "Correlations between mouse 3T3 cell spreading and serum fibronectin adsorption on glass and hydroxyethylmethacrylate-ethylmethacrylate copolymers." J Biomed Mater Res 22(9): 763-93.
- Hormia, M. and M. Kononen (1994). "Immunolocalization of fibronectin and vitronectin receptors in human gingival fibroblasts spreading on titanium surfaces." J Periodontal Res 29(2): 146-52.
- Horton, M. A. (1997). "The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor"." Int J Biochem Cell Biol 29(5): 721-5.
- Howlett, C. R., M. D. Evans, et al. (1994). "Mechanism of initial attachment of cells derived from human bone to commonly used prosthetic materials during cell culture." Biomaterials 15(3): 213-22.
- Huang, S. and D. E. Ingber (2000). "Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks." Exp Cell Res 261(1): 91-103.
- Hutter, J. L. and J. Bechhoefer (1993). "Manipulation of van der Waals forces to improve image resolution in atomicforce microscopy." Journal of Applied Physics.

- Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." Cell 69(1): 11-25.
- Ingber, D. E. (2003). "Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks." J Cell Sci 116(Pt 8): 1397-408.
- Isaacs, B. S., S. A. Brew, et al. (1989). "Reversible unfolding of the gelatin-binding domain of fibronectin: structural stability in relation to function." Biochemistry 28(2): 842-50.
- Israelachvili, J. and H. Wennerstrom (1996). "Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions." Nature 379(6562): 219-25.
- Israelachvili, J. N. (1991). Intermolecular & surface forces.
- Jönsson, U., B. Ivarsson, et al. (1982). "Adsorption behavior of fibronectin on well-characterized silica surfaces." Journal of Colloid and Interface Science 90(1): 148-163.
- Jorgensen, K., M. Skrede, et al. (2005). "Phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate promotes anchorage-independent growth and survival of melanomas through MEK-independent activation of ERK1/2." Biochem Biophys Res Commun 329(1): 266-74.
- Karrasch, S., M. Dolder, et al. (1993). "Covalent binding of biological samples to solid supports for scanning probe microscopy in buffer solution." Biophys J 65(6): 2437-46.
- Kasas, S., N. H. Thomson, et al. (1997). "Escherichia coli RNA polymerase activity observed using atomic force microscopy." Biochemistry 36(3): 461-8.
- Kedrov, A., H. Janovjak, et al. (2006). "Observing folding pathways and kinetics of a single sodium-proton antiporter from Escherichia coli." J Mol Biol 355(1): 2-8.

- Kennedy, S. B., N. R. Washburn, et al. (2006). "Combinatorial screen of the effect of surface energy on fibronectin-mediated osteoblast adhesion, spreading and proliferation." Biomaterials 27(20): 3817-24.
- Keselowsky, B. G., D. M. Collard, et al. (2003). "Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion." J Biomed Mater Res A 66(2): 247-59.
- Khang, D., J. Lu, et al. (2008). "The role of nanometer and sub-micron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium." Biomaterials 29(8): 970-83.
- Kilpadi, K. L., P. L. Chang, et al. (2001). "Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel." J Biomed Mater Res 57(2): 258-67.
- Kim, M. S., Y. N. Shin, et al. (2007). "Adhesion behavior of human bone marrow stromal cells on differentially wettable polymer surfaces." Tissue Eng 13(8): 2095-103.
- Klebe, R. J., K. L. Bentley, et al. (1981). "Adhesive substrates for fibronectin." J Cell Physiol 109(3): 481-8.
- Koistinen, P., T. Pulli, et al. (1999). "Depletion of alphaV integrins from osteosarcoma cells by intracellular antibody expression induces bone differentiation marker genes and suppresses gelatinase (MMP-2) synthesis." Matrix Biol 18(3): 239-51.
- Kowalczyńska, H. M. and J. Kaminski (1994). "Substratum sulfonation and cell adhesion." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2(1-3): 291-298.
- Krylov, S. N. and N. J. Dovichi (2000). "Single-cell analysis using capillary electrophoresis: influence of surface support properties on cell injection into the capillary." Electrophoresis 21(4): 767-73.

- Lan, M. A., C. A. Gersbach, et al. (2005). "Myoblast proliferation and differentiation on fibronectin-coated self assembled monolayers presenting different surface chemistries." Biomaterials 26(22): 4523-31.
- LaRue, K. E., M. Khalil, et al. (2004). "Microenvironmental regulation of proliferation in multicellular spheroids is mediated through differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors." Cancer Res 64(5): 1621-31.
- Leavesley, D. I., G. D. Ferguson, et al. (1992). "Requirement of the integrin beta 3 subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen." J Cell Biol 117(5): 1101-7.
- Leckband, D. E., J. N. Israelachvili, et al. (1992). "Long-range attraction and molecular rearrangements in receptor-ligand interactions." Science 255(5050): 1419-21.
- Lee, G. U., L. A. Chrisey, et al. (1994). "Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA." Science 266(5186): 771-3.
- Lee, J. H., G. Khang, et al. (1998). "Interaction of Different Types of Cells on Polymer Surfaces with Wettability Gradient." Journal of Colloid and Interface Science 205(2): 323-330.
- Lee, J. H., J. W. Park, et al. (1991). "Cell adhesion and growth on polymer surfaces with hydroxyl groups prepared by water vapour plasma treatment." Biomaterials 12(5): 443-448.
- Lewandowska, K., N. Balachander, et al. (1989). "Modulation of fibronectin adhesive functions for fibroblasts and neural cells by chemically derivatized substrata." J Cell Physiol 141(2): 334-45.
- Litvinovich, S. V., D. K. Strickland, et al. (1991). "Domain structure and interactions of the type I and type II modules in the gelatin-binding region of fibronectin. All six modules are independently folded." J Mol Biol 217(3): 563-75.

- Liu, L., S. Chen, et al. (2005). "Controlling osteopontin orientation on surfaces to modulate endothelial cell adhesion." J Biomed Mater Res A 74(1): 23-31.
- Liu, L., M. Fishman, et al. (2007). "Pectin in controlled drug delivery a review." Cellulose 14: 15-24.
- Lucena, S., C. L. Arocha Pinango, et al. (2007). "[Fibronectin. Structure and functions associated to hemostasis. Review]." Invest Clin 48(2): 249-62.
- Lukashev, M. E. and Z. Werb (1998). "ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour." Trends Cell Biol 8(11): 437-41.
- Lutolf, M. P. and J. A. Hubbell (2005). "Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering." Nat Biotechnol 23(1): 47-55.
- MacDonald, D. E., N. Deo, et al. (2002). "Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles." Biomaterials 23(4): 1269-79.
- MacDonald, D. E., B. Markovic, et al. (1998). "Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials." J Biomed Mater Res 41(1): 120-30.
- Margel, S., E. A. Vogler, et al. (1993). "Peptide, protein, and cellular interactions with self-assembled monolayer model surfaces." J Biomed Mater Res 27(12): 1463-76.
- Martin, J. Y., Z. Schwartz, et al. (1995). "Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63)." J Biomed Mater Res 29(3): 389-401.
- Massia, S. P. and J. A. Hubbell (1991). "An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation." J Cell Biol 114(5): 1089-100.

- McBeath, R., D. M. Pirone, et al. (2004). "Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment." Dev Cell 6(4): 483-95.
- McClary, K. B., T. Ugarova, et al. (2000). "Modulating fibroblast adhesion, spreading, and proliferation using self-assembled monolayer films of alkylthiolates on gold." J Biomed Mater Res 50(3): 428-39.
- McFarland, C. D., S. Mayer, et al. (1999). "Attachment of cultured human bone cells to novel polymers." J Biomed Mater Res 44(1): 1-11.
- Meredith, J. E., Jr., B. Fazeli, et al. (1993). "The extracellular matrix as a cell survival factor." Mol Biol Cell 4(9): 953-61.
- Merkel, R., P. Nassoy, et al. (1999). "Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy." Nature 397(6714): 50-3.
- Meurk, A., P. F. Luckham, et al. (1997). "Direct Measurement of Repulsive and Attractive van der Waals Forces between Inorganic Materials." Langmuir 13(14): 3896-3899.
- Meyer, E., H. Hug, et al. (2003). "Scanning Probe Microscopy: The Lab on a Tip." Materials Today 6(12): 59.
- Meyer, E. E., Q. Lin, et al. (2005). "Origin of the long-range attraction between surfactant-coated surfaces." Proc Natl Acad Sci U S A 102(19): 6839-42.
- Miklavic, S. J., D. Y. C. Chan, et al. (1994). "Double Layer Forces between Heterogeneous Charged Surfaces." J. Phys. Chem. 98(36): 9022-9032.
- Miller, T. and D. Boettiger (2003). "Control of Intracellular Signaling by Modulation of Fibronectin Conformation at the Cell-Materials Interface." Langmuir 19(5): 1723-1729.
- Moller, C., M. Allen, et al. (1999). "Tapping-mode atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces." Biophys J 77(2): 1150-8.

- Morandat, S. and K. El Kirat (2007). "Real-time atomic force microscopy reveals cytochrome c-induced alterations in neutral lipid bilayers." Langmuir 23(22): 10929-32.
- Mou, J., J. Yang, et al. (1994). "Alcohol induces interdigitated domains in unilamellar phosphatidylcholine bilayers." Biochemistry 33(33): 9981-5.
- Moursi, A. M., R. K. Globus, et al. (1997). "Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro." J Cell Sci 110 ( Pt 18): 2187-96.
- Mousavi-Shafaei, P., A. A. Ziaee, et al. (2006). "Antisense-mediated melanoma inhibitor of apoptosis protein downregulation sensitizes G361 melanoma cells to cisplatin." Anticancer Drugs 17(9): 1031-9.
- Muller, D. J., G. Buldt, et al. (1995). "Force-induced conformational change of bacteriorhodopsin." J Mol Biol 249(2): 239-43.
- Muller, D. J. and A. Engel (2002). "Conformations, flexibility, and interactions observed on individual membrane proteins by atomic force microscopy." Methods Cell Biol 68: 257-99.
- Muller, D. J., D. Fotiadis, et al. (1999). "Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscope." Biophys J 76(2): 1101-11.
- Muller, D. J., J. B. Heymann, et al. (2000). "Atomic force microscopy of native purple membrane." Biochim Biophys Acta 1460(1): 27-38.
- Muller, D. J., M. Kessler, et al. (2002). "Stability of bacteriorhodopsin alpha-helices and loops analyzed by single-molecule force spectroscopy." Biophys J 83(6): 3578-88.
- Mutsaers, S. E., J. E. Bishop, et al. (1997). "Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis." Int J Biochem Cell Biol 29(1): 5-17.

- Nonckreman, C. J., P. G. Rouxhet, et al. (2007). "Dual radiolabeling to study protein adsorption competition in relation with hemocompatibility." J Biomed Mater Res A 81(4): 791-802.
- Norde, W. (1986). "Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface." Adv Colloid Interface Sci 25(4): 267-340.
- Norde, W. and C. E. Giacomelli (1999). "Conformational changes in proteins at interfaces: From solution to the interface, and back." Macromol. Symp 145: 125-136.
- Norde, W. and C. E. Giacomelli (2000). "BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states." J Biotechnol 79(3): 259-68.
- Norde, W. and C. A. Haynes (1995). Reversibility and the mechanism of protein adsorption. In: Horbett, T.A. and Brash, J.L., eds. Proteins at Interfaces II: Fundamentals and Applications. Washington, D.C.: American Chemical Society: 26-40.
- Nygren, H. (1996). "Initial reactions of whole blood with hydrophilic and hydrophobic titanium surfaces." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 6(4-5): 329-333.
- Nygren, H., P. Tengvall, et al. (1997). "The initial reactions of TiO<sub>2</sub> with blood." J Biomed Mater Res 34(4): 487-92.
- Oberhauser, A. F., P. E. Marszalek, et al. (1998). "The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin." Nature 393(6681): 181-5.
- Oesterhelt, F., D. Oesterhelt, et al. (2000). "Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins." Science 288(5463): 143-6.
- Oppenheimer, S. B. (2006). "Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances." Acta Histochem 108(5): 327-34.



- Owens, D. K. and R. C. Wendt (1969). "Estimation of the surface free energy of polymers." J Applied Polymer Science 13: 1741-1747.
- Pitt, W. G., D. J. Fabrizius-Homan, et al. (1989). "Vitronectin adsorption on polystyrene and oxidized polystyrene." Journal of Colloid and Interface Science 129(1): 231-239.
- Proctor, R. A. (1987). "Fibronectin: an enhancer of phagocyte function." Rev Infect Dis 9 Suppl 4: S412-9.
- Qiu, Q., M. Sayer, et al. (1998). "Attachment, morphology, and protein expression of rat marrow stromal cells cultured on charged substrate surfaces." J Biomed Mater Res 42(1): 117-27.
- Ranucci, C. S. and P. V. Moghe (2001). "Substrate microtopography can enhance cell adhesive and migratory responsiveness to matrix ligand density." J Biomed Mater Res 54(2): 149-61.
- Rapoza, R. J. and T. A. Horbett (1989). "Changes in the SDS elutability of fibrinogen adsorbed from plasma to polymers." J Biomater Sci Polym Ed 1(2): 99-110.
- Rapoza, R. J. and T. A. Horbett (1990). "Postadsorptive transitions in fibrinogen: influence of polymer properties." J Biomed Mater Res 24(10): 1263-87.
- Ratner, B., P. Weathersby, et al. (1978). "Radiation-grafted hydrogels for biomaterial applications as studied by the ESCA technique." Journal of Applied Polymer Science 22(3): 643-664.
- Ravenscroft, M. J., J. Harker, et al. (2006). "A prospective, randomised, controlled trial comparing wound dressings used in hip and knee surgery: Aquacel and Tegaderm versus Cutiplast." Ann R Coll Surg Engl 88(1): 18-22.
- Reddig, P. J. and R. L. Juliano (2005). "Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival." Cancer Metastasis Rev 24(3): 425-39.

- Reinholt, F. P., K. Hultenby, et al. (1990). "Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone." Proc Natl Acad Sci U S A 87(12): 4473-5.
- Rezania, A. and K. E. Healy (1999). "Biomimetic peptide surfaces that regulate adhesion, spreading, cytoskeletal organization, and mineralization of the matrix deposited by osteoblast-like cells." Biotechnol Prog 15(1): 19-32.
- Rezania, A. and K. E. Healy (2000). "The effect of peptide surface density on mineralization of a matrix deposited by osteogenic cells." J Biomed Mater Res 52(4): 595-600.
- Rief, M., H. Clausen-Schaumann, et al. (1999). "Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules." Nat Struct Biol 6(4): 346-9.
- Rief, M., M. Gautel, et al. (1997). "Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM." Science 276(5315): 1109-12.
- Rosso, F., A. Giordano, et al. (2004). "From cell-ECM interactions to tissue engineering." J Cell Physiol 199(2): 174-80.
- Ruoslahti, E. and J. C. Reed (1994). "Anchorage dependence, integrins, and apoptosis." Cell 77(4): 477-8.
- Savage, B. and Z. M. Ruggeri (1991). "Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets." J Biol Chem 266(17): 11227-33.
- Schakenraad, J. M., H. J. Busscher, et al. (1986). "The influence of substratum surface free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins." J Biomed Mater Res 20(6): 773-84.
- Schneider, G. and K. Burridge (1994). "Formation of focal adhesions by osteoblasts adhering to different substrata." Exp Cell Res 214(1): 264-9.

- Schneider, G. B., R. Zaharias, et al. (2001). "Osteoblast integrin adhesion and signaling regulate mineralization." J Dent Res 80(6): 1540-4.
- Schultz, J., K. Tsutsumi, et al. (1977a). "Surface properties of high-energy solids : I. Determination of the dispersive component of the surface free energy of mica and its energy of adhesion to water and n-alkanes." Journal of Colloid and Interface Science 59(2): 272-276.
- Schultz, J., K. Tsutsumi, et al. (1977b). "Surface properties of high-energy solids : II. Determination of the nondispersive component of the surface free energy of mica and its energy of adhesion to polar liquids." Journal of Colloid and Interface Science 59(2): 277-282.
- Schwartz, M. A., M. D. Schaller, et al. (1995). "Integrins: emerging paradigms of signal transduction." Annu Rev Cell Dev Biol 11: 549-99.
- Seiffert, D. and J. W. Smith (1997). "The cell adhesion domain in plasma vitronectin is cryptic." J Biol Chem 272(21): 13705-10.
- Serro, A. P., A. C. Fernandes, et al. (1999). "Bovine serum albumin adsorption on titania surfaces and its relation to wettability aspects." J. Biomed. Mater. Res. 46(3): 376-381.
- Shapiro, S. D. (1998). "Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences." Curr Opin Cell Biol 10(5): 602-8.
- Shelton, R. M., A. C. Rasmussen, et al. (1988). "Protein adsorption at the interface between charged polymer substrata and migrating osteoblasts." Biomaterials 9(1): 24-9.
- Shen, M., I. Garcia, et al. (2004). "Effects of adsorbed proteins and surface chemistry on foreign body giant cell formation, tumor necrosis factor alpha release and procoagulant activity of monocytes." J Biomed Mater Res A 70(4): 533-41.

- Shin, H., S. Jo, et al. (2003). "Biomimetic materials for tissue engineering." Biomaterials 24(24): 4353-64.
- Shiras, A., A. Bhosale, et al. (2002). "Differential expression of CD44(S) and variant isoforms v3, v10 in three-dimensional cultures of mouse melanoma cell lines." Clin Exp Metastasis 19(5): 445-55.
- Siebers, M. C., P. J. ter Brugge, et al. (2005). "Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review." Biomaterials 26(2): 137-46.
- Simson, D. A., F. Ziemann, et al. (1998). "Micropipet-based pico force transducer: in depth analysis and experimental verification." Biophys J 74(4): 2080-8.
- Singer, II, S. Scott, et al. (1988). "Cell surface distribution of fibronectin and vitronectin receptors depends on substrate composition and extracellular matrix accumulation." J Cell Biol 106(6): 2171-82.
- Singhvi, R., A. Kumar, et al. (1994). "Engineering cell shape and function." Science 264(5159): 696-8.
- Sinha, R. K. and R. S. Tuan (1996). "Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials." Bone 18(5): 451-7.
- Slack, S. M. and T. A. Horbett (1988). "Physicochemical and biochemical aspects of fibrinogen adsorption from plasma and binary protein solutions onto polyethylene and glass." Journal of Colloid and Interface Science 124(2): 535-551.
- Slack, S. M. and T. A. Horbett (1989). "Changes in the strength of fibrinogen attachment to solid surfaces: An explanation of the influence of surface chemistry on the Vroman effect." Journal of Colloid and Interface Science 133(1): 148-165.

- Sousa, S. R., M. M. Bras, et al. (2007). "Dynamics of fibronectin adsorption on TiO<sub>2</sub> surfaces." Langmuir 23(13): 7046-54.
- Steele, J. G., B. A. Dalton, et al. (1993a). "Polystyrene chemistry affects vitronectin activity: an explanation for cell attachment to tissue culture polystyrene but not to unmodified polystyrene." J Biomed Mater Res 27(7): 927-40.
- Steele, J. G., B. A. Dalton, et al. (1995). "Adsorption of fibronectin and vitronectin onto Primaria and tissue culture polystyrene and relationship to the mechanism of initial attachment of human vein endothelial cells and BHK-21 fibroblasts." Biomaterials 16(14): 1057-67.
- Steele, J. G., C. McFarland, et al. (1993b). "Attachment of human bone cells to tissue culture polystyrene and to unmodified polystyrene: the effect of surface chemistry upon initial cell attachment." J Biomater Sci Polym Ed 5(3): 245-57.
- Stephansson, S. N., B. A. Byers, et al. (2002). "Enhanced expression of the osteoblastic phenotype on substrates that modulate fibronectin conformation and integrin receptor binding." Biomaterials 23(12): 2527-34.
- Szabo, A., M. Hajj, et al. (2000). "Evaluation of seprafilm and amniotic membrane as adhesion prophylaxis in mesh repair of abdominal wall hernia in rats." Eur Surg Res 32(2): 125-8.
- Takebe, J., C. M. Champagne, et al. (2003). "Titanium surface topography alters cell shape and modulates bone morphogenetic protein 2 expression in the J774A.1 macrophage cell line." J Biomed Mater Res A 64(2): 207-16.
- Toworfe, G. K., R. J. Composto, et al. (2004). "Fibronectin adsorption on surface-activated poly(dimethylsiloxane) and its effect on cellular function." J Biomed Mater Res A 71(3): 449-61.
- Tsuchimochi, K., N. Yagishita, et al. (2005). "Identification of a crucial site for synoviolin expression." Mol Cell Biol 25(16): 7344-56.

- Underwood, P. A., J. G. Steele, et al. (1993). "Effects of polystyrene surface chemistry on the biological activity of solid phase fibronectin and vitronectin, analysed with monoclonal antibodies." J Cell Sci 104 ( Pt 3): 793-803.
- Valeriani, M., P. Mezzana, et al. (2002). "Carboxy-methyl-cellulose hydrogel mammary implants: our experience." Acta Chir Plast 44(3): 71-6.
- Vallieres, K., P. Chevallier, et al. (2007). "AFM imaging of immobilized fibronectin: does the surface conjugation scheme affect the protein orientation/conformation?" Langmuir 23(19): 9745-51.
- van der Valk, P., A. W. van Pelt, et al. (1983). "Interaction of fibroblasts and polymer surfaces: relationship between surface free energy and fibroblast spreading." J Biomed Mater Res 17(5): 807-17.
- van der Zijpp, Y. J., A. A. Poot, et al. (2003). "ICAM-1 and VCAM-1 expression by endothelial cells grown on fibronectin-coated TCPS and PS." J Biomed Mater Res A 65(1): 51-9.
- van Kooten, T. G. and A. F. von Recum (1999). "Cell adhesion to textured silicone surfaces: the influence of time of adhesion and texture on focal contact and fibronectin fibril formation." Tissue Eng 5(3): 223-40.
- van Oss, C. J. (1994). Interfacial forces in aqueous media. New York, Marcel Dekker Inc.
- van Oss, C. J. (1995). "Hydrophobicity of biosurfaces -- Origin, quantitative determination and interaction energies." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 5(3-4): 91-110.
- van Oss, C. J., M. K. Chaudhury, et al. (1987). "Monopolar surfaces." Advances in Colloid and Interface Science 28: 35-64.

- van 't Riet, M., P. J. de Vos van Steenwijk, et al. (2003). "Prevention of adhesion to prosthetic mesh: comparison of different barriers using an incisional hernia model." Ann Surg 237(1): 123-8.
- van Wachem, P. B., T. Beugeling, et al. (1985). "Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities." Biomaterials 6(6): 403-8.
- Verhoven, B., R. A. Schlegel, et al. (1995). "Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes." J Exp Med 182(5): 1597-601.
- Vermes, I., C. Haanen, et al. (1995). "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." J Immunol Methods 184(1): 39-51.
- Viani, M. B., T. E. Schäffer, et al. (1999). "Small cantilevers for force spectroscopy of single molecules." Journal of Applied Physics.
- Vogler, E. A. (1998). "Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces." Adv Colloid Interface Sci 74: 69-117.
- Vroman, L. and A. L. Adams (1986). "Adsorption of proteins out of plasma and solutions in narrow spaces." Journal of Colloid and Interface Science 111(2): 391-402.
- Wang, L. H. (2004). "Molecular signaling regulating anchorage-independent growth of cancer cells." Mt Sinai J Med 71(6): 361-7.
- Webb, K., V. Hlady, et al. (1998). "Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization." J Biomed Mater Res 41(3): 422-30.

- Webb, K., V. Hlady, et al. (2000). "Relationships among cell attachment, spreading, cytoskeletal organization, and migration rate for anchorage-dependent cells on model surfaces." J Biomed Mater Res 49(3): 362-8.
- Wertz, C. F. and M. M. Santore (1999). "Adsorption and Relaxation Kinetics of Albumin and Fibrinogen on Hydrophobic Surfaces: Single-Species and Competitive Behavior." Langmuir 15(26): 8884-8894.
- Wu, P. C., Y. B. Huang, et al. (1998). "Percutaneous absorption of captopril from hydrophilic cellulose derivatives through excised rabbit skin and human skin." Drug Dev Ind Pharm 24(2): 179-82.
- Yang, X., R. S. Tare, et al. (2003). "Induction of human osteoprogenitor chemotaxis, proliferation, differentiation, and bone formation by osteoblast stimulating factor-1/pleiotrophin: osteoconductive biomimetic scaffolds for tissue engineering." J Bone Miner Res 18(1): 47-57.
- Zhan, M., H. Zhao, et al. (2004). "Signalling mechanisms of anoikis." Histol Histopathol 19(3): 973-83.
- Zhang, X. D., S. K. Gillespie, et al. (2004). "Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways." Mol Cancer Ther 3(2): 187-97.



## Annexe - Publications et présentations orales

---

---

Validation biologique et physico-chimique d'un revêtement cellulosique de boîtes pour cultures cellulaires bioactives

## Articles acceptés et/ou publiés

**Probing fibronectin-surface interactions: a multitechnique approach.** E. Velzenberger, I. Pezron, G. Legeay, M.D. Nagel, K. El Kirat, *Langmuir*, accepté le 30 juillet 2008.

**Enzymatically-tailored pectins differentially influence the morphology, adhesion, cell cycle progression and survival of fibroblasts.** M.D. Nagel, R. Verhoef, H. Schols, M. Morra, J.P. Knox, G. Ceccone, C. Della Volpe, P. Vigneron, C. Bussy, M. Gallet, E. Velzenberger, M. Vayssade, G. Cascardo, C. Cassinelli, A. Haeger, D. Gilliland, I. Liakos, M. Rodriguez-Valverde, S. Siboni; *Biochimica et biophysica acta - General Subjects*, 2008, Jul-Aug; 1780(7-8):995-1003.

**Study of cell behaviour on a cellulose anti-adhesive substratum.** E. Velzenberger, M. Vayssade, G. Legeay, M.D. Nagel; *Cellulose*, 2008,15(2):347-357.

**Modulating in vitro bone cell and macrophage behavior by immobilized enzymatically tailored pectins.** C. Bussy, R. Verhoef, A. Haeger, M. Morra, J.L. Duval, P. Vigneron, A. Bensoussan, E. Velzenberger, G. Cascardo, C. Cassinelli, H. Schols, J.P. Knox, M.D. Nagel; *J Biomed Mater Res A.*, 2007 Nov 14.

## Article soumis

**Characterization of adsorbed fibronectin on various biomaterials using liquid-liquid contact angle measurements.** E. Velzenberger, K. El Kirat, G. Legeay, M.D. Nagel, I. Pezron, *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 2008.

## Communications orales

**Modulation of cell behaviour by fibronectin or collagen adsorption on anti-adhesive biomaterials.** E. Velzenberger, I. Pezron, K. El-Kirat, G. Legeay, M.D. Nagel ; *XXXIIIème Congrès annuel de la Société de Biomécanique*, sept 01-sept 03, 2008, Compiègne, France (communication orale + publication de l'abstract dans *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*).

***In vitro* behaviour of adherent cells in contact with an anti-adhesive cellulose substratum.** E. Velzenberger, M. Vayssade, G. Legeay, M. Hindié, M. Dufresne, P. Vigneron, J.L. Duval, M.D. Nagel ; *ESB 20<sup>th</sup> European conference on biomaterials*, sept 27-oct 01, 2006, Nantes, France.

**Activations et orientations fonctionnelles de cellules cultivées sur un revêtement cellulosique anti-adhésif.** M. Vayssade, E. Velzenberger ; GIS (groupements d'intérêts scientifiques) *Bioadhésion Biocontamination*, 13 février 2006, Compiègne, France.

## Poster

**Study of cell behaviour after fibronectin or collagen adsorption on adhesive and anti-adhesive biomaterials.** E. Velzenberger, I. Pezron, K. El-Kirat, G. Legeay, M.D. Nagel ; *8th World Biomaterials Congress*, may 28-june 01, 2008, Amsterdam, The Netherlands.

## Résumés



---

Validation biologique et physico-chimique d'un revêtement cellulosique de boîtes pour cultures cellulaires bioactives

Les propriétés de surface des biomatériaux conditionnent l'adsorption des protéines présentes dans l'environnement physiologique. La nature de la couche protéique adsorbée influence la morphologie et les orientations fonctionnelles des cellules adhérentes. Cette thèse a pour objet de combiner une approche biologique et physico-chimique pour caractériser un support cellulosique (CEL) original pour culture cellulaire et mieux comprendre les interactions protéine-surface et cellule-surface. L'objectif de ce projet pluridisciplinaire est de corréler les propriétés de surface avec les activations biologiques. Trois lignées cellulaires adhérentes murines ont été utilisées (les fibroblastes Swiss 3T3, les pré-ostéoblastes MC-3T3 et des cellules de mélanome B16F10). L'utilisation des mesures d'angles de contact en milieu liquide et de l'AFM a permis la caractérisation physico-chimique du substrat avant et après adsorption de fibronectine.

Les principaux résultats obtenus pour CEL sont:

- L'agrégation cellulaire,
- L'inhibition de la prolifération cellulaire accompagnée d'un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire,
- L'induction de l'apoptose,
- Le revêtement est très hydrophile et la fibronectine s'adsorbe peu et dans une conformation inadaptée pour l'adhésion cellulaire (mauvaise accessibilité RGD),
- L'affinité instantanée négligeable de la Fn pour le revêtement cellulosique.

Cette étude montre que CEL est un biomatériau anti-adhésif donnant des résultats démonstratifs et reproductibles. En outre, cette étude souligne la nécessité d'associer plusieurs approches (ELISA, angles de contact en milieu liquide, spectroscopie de force) pour caractériser les interactions protéine-surface en conditions physiologiques, sur les biomatériaux.

**Mots-clés** : revêtement cellulosique, agrégation cellulaire, apoptose, adsorption de fibronectine, angles de contact en milieu liquide, spectroscopie de force, microscopie à force atomique.

Surface properties of biomaterials may influence protein adsorption and the composition of the protein layer may affect the morphology and the functional orientations of adherent cells. In this work, both biological and physico-chemical approaches were combined to characterize an original cellulosic coating (CEL) for cell culture and to better understand the interactions involved between a surface, proteins and finally cells. The aim of this multi-disciplinary project is to correlate surface properties (at the micrometric and at the nanometric scale) with biological activations. Three adherent murine cell lines were chosen (fibroblasts Swiss 3T3, pre-osteoblasts MC-3T3 and melanoma cells B16F10). Liquid-liquid contact angle measurements and AFM enabled to characterize the physico-chemical properties of the cellulosic substratum before and after fibronectin adsorption.

The principal results obtained with the cellulosic substratum are summarized below:

- Cell aggregation,
- A cellular proliferation inhibition with a blocking in G1-phase,
- An induction of apoptosis,
- CEL is hydrophilic and a little amount of fibronectin is adsorbed on the substratum in a conformation which is not appropriate for cell adhesion (bad accessibility to RGD site),
- Instantaneous affinity negligible of fibronectin for the cellulosic material.

This study evidences that CEL is an anti-adhesive biomaterial which gives reproducible and demonstrative results. Moreover, this work underlines the necessity to combine several approaches (ELISA assays, liquid-liquid contact angle measurements, force spectroscopy) to characterize the interaction between a protein and a biomaterial surface under physiological conditions.

**Keywords:** cellulosic coating, cell aggregation, apoptosis, fibronectin adsorption, liquid-liquid contact angle measurements, force spectroscopy, atomic force microscopy.