



HAL
open science

**Synthèse de nanostructures hybrides biomimétiques
(phosphates de calcium + protéines) par technique laser
avancées : études structurales, biochimiques et
biologiques**

Nicolae-Felix Sima

► **To cite this version:**

Nicolae-Felix Sima. Synthèse de nanostructures hybrides biomimétiques (phosphates de calcium + protéines) par technique laser avancées : études structurales, biochimiques et biologiques. Autre [cond-mat.other]. Université de Haute Alsace - Mulhouse; Universitatea politehnica (Bucarest), 2011. Français. NNT : 2011MULH5431 . tel-00703266

HAL Id: tel-00703266

<https://theses.hal.science/tel-00703266>

Submitted on 1 Jun 2012

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.



Institut de Science
des Matériaux de Mulhous



THESE EN COTUTELLE

présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE HAUTE-ALSACE

Discipline: Physique

par

Felix Nicolae SIMA

Synthèse de nanostructures hybrides biomimétiques (phosphates de calcium + protéines) par techniques laser avancées : études structurales, biochimiques et biologiques

2011

Membres du jury,

Directeurs de thèse: Mme Karine ANSELME, DR, Institut de Sciences des Matériaux de Mulhouse

M. Ion N. MIHAILESCU, Professeur, Institut National pour la Physique des Lasers, Plasmas et du Rayonnement de Bucarest

Rapporteurs externes: M. Olivier Gallet, Professeur, Université de Cergy-Pontoise

M. Aurel Popescu, Professeur, Université de Bucarest

M. Cornel Ghica, DR, Institut National de Physiques des Matériaux, Bucarest

Examineur : M. Roger Gadiou, DR, Institut de Sciences des Matériaux de Mulhouse

BUCAREST, LE 4 OCTOBRE 2011

A new idea comes suddenly and in a rather intuitive way. But intuition is nothing but the outcome of earlier intellectual experience.

Imagination is more important than knowledge. Knowledge is limited, whereas imagination embraces the entire world, stimulating progress, giving birth to evolution.

Albert Einstein

Je remercie le Dr. Karine Anselme et le Pr. Ion Mihailescu qui ont encadré ma thèse. Merci à vous deux pour la grande marge de manœuvre que vous m'avez donné, pour vos critiques, pour votre confiance en moi, pour m'avoir appris l'autonomie.

Merci au laboratoire ERRMECe et au département de Biologie de l'Université de Cergy-Pontoise, et plus particulièrement aux Pr. Emmanuel Pauthe, Pr. Olivier Gallet et Pr Véronique Larreta-Garde pour leur aide et leur accueil chaleureux au sein de leur laboratoire pendant deux semaines.

Je remercie Patricia Davidson et Mihaela Mateescu pour leur aide et ma formation dans les domaines biochimiques et biologiques.

Je remercie le Dr. Stefana Petrescu et Livia Sima pour leur aide essentielle dans les manipulations supplémentaires de biochimie et de biologie.

Je tiens à remercier Rémy Agniel pour son aide dans la purification des importantes quantités de protéines dont j'ai eu besoin.

Je remercie Hugues Bonnet pour son support dans les études de microscopie à balayage.

Grands remerciements à tous mes collègues du LSPI. Merci à Manu et à Carmen pour leur aide dans la préparation des échantillons pendant mes manipulations PLD et MAPLE au labo. Merci à Gabriel pour les discussions très constructives et tes conseils.

Table des matières:

Introduction.....	1
1. Etude Bibliographique	4
1.1. L'interaction du tissu osseux et des biomatériaux.....	4
1.1.1. Tissu osseux. Matrice Extracellulaire.....	5
1.1.2. Biomateriaux inorganiques et organiques.....	20
1.1.3. Perspectives.....	25
1.2. Biomateriaux nanostructurees	27
1.2.1. Definition, couches minces, nanostructurees.....	27
1.2.2. Applications	29
1.2.3. Perspectives.....	30
1.3. Les methodes de synthese des nanomatériaux.....	32
1.3.1. Applications	38
1.4. Biomateriaux etudies dans la these.....	38
1.4.1. Ceramiques d'Hydroxyapatite	38
1.4.2. Proteines multifonctionnelles des matrices extracellulaires.....	41
1.5. Methodes de synthese utilisees dans la these	44
1.5.1. Depot laser pulse (Pulsed Laser Deposition - PLD)	44
1.5.2. Evaporation par Laser Pulsee Assistee par une Matrice (Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation - MAPLE).....	56
2. Matériels et Méthodes.....	63
2.1. Matériaux.....	63
2.1.1. Ceramiques d'Hydroxyapatite (HA).....	63
2.1.2. Fibronectine, Vitronectine	64
2.1.3. Autres matériaux.....	65

2.2.	Méthodes	66
2.2.1.	Synthèse de couches minces d'HA par dépôt laser pulsé (Pulsed Laser Deposition - PLD)..	66
2.2.2.	Caractérisation des couches minces d'HA par microscopie électronique à balayage, microscopie de force atomique, et diffraction de rayons X	68
2.2.3.	Synthèse de couches minces de fibronectine et de vitronectine par Evaporation par Laser Pulsé Assistée par une Matrice (Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation - MAPLE).....	69
2.2.4.	Caractérisation des couches minces de fibronectine et de vitronectine par microscopie de force atomique	72
2.2.5.	Caractérisation des couches minces de fibronectine et de vitronectine par spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier	72
2.2.6.	Essais de mouillabilité	74
2.2.7.	Essais de profilométrie.....	76
2.2.8.	Dosage et marquage des protéines par immunofluorescence et dot blot	77
2.2.9.	Quantification des protéines par BCA	79
2.2.10.	Réponse cellulaire aux couches minces	80
3.	Résultats et discussion	95
3.1.	Construction des bicouches hybrides HA/protéines de la matrice extracellulaire par PLD et MAPLE.....	95
3.1.1.	Transfert d'HA par PLD sur des supports de titane. Analyse de la morphologie et de la composition des couches d'HA.....	96
3.1.2.	Le transfert laser des protéines par MAPLE: mécanisme et distribution.....	101
3.1.3.	Stabilité des protéines transférées par études de mouillabilité.....	107
3.1.4.	Rugosité des surfaces par profilométrie et études par microscopie optique des protéines transférées par MAPLE.....	109
3.2.	Etudes structurales et morphologiques des couches minces.....	111
3.2.1.	Analyse par FTIR de la structure et de la conformation des protéines après le transfert MAPLE	111
3.2.2.	Analyse de la composition par microscopie FTIR des couches de protéines sur silicium et sur les couches minces d'HA	115

3.2.3.	Organisation des couches minces de protéines à l'échelle microscopique par investigations AFM	116
3.3.	Etudes biochimiques et biologiques des couches minces	118
3.3.1.	Détection des protéines transférées par immunofluorescence et dot blot	119
3.3.2.	Confirmation de la viabilité, de l'adhérence et de la prolifération des HOP sur les couches minces hybrides par MTT	122
3.3.3.	Morphologie des HOP par MEB	124
3.3.4.	Démonstration de l'adhésion et de l'étalement des HOP sur silicium et sur les couches minces hybrides par immunomarquage	126
3.3.5.	Quantification des aires et périmètres cellulaires	133
3.3.6.	Expression des marqueurs de différenciation	134
4.	Conclusions et Perspectives	142
5.	Références Bibliographiques	149
6.	Abbréviations	160
7.	Annexes	162

INTRODUCTION

Il existe plusieurs définitions possibles d'un biomatériau. Il est souvent accepté dans les domaines de la biologie et de la médecine qu'« un biomatériau est tout matériau, d'origine naturelle ou artificielle, comprenant tout ou partie d'une structure vivante ou d'un appareil biomédical qui exécute ou remplace une fonction naturelle ». Williams a proposé une autre définition: « un matériau non viable utilisé dans un dispositif médical, destiné à interagir avec des systèmes biologiques » (Ratner, BD et al., 2004). Les biomatériaux participent à la constitution de substituts tissulaires ou de dispositifs de diagnostic ou de substitution (d'assistance) fonctionnelle. La propriété principale d'un biomatériau est sa capacité à être bien toléré par l'organisme de l'hôte. La réussite de l'implantation du biomatériau dépend de sa biocompatibilité. La biocompatibilité représente la capacité du biomatériau à accomplir sa fonction sans induire d'effet local indésirable sur le tissu hôte mais en produisant une réponse cellulaire appropriée et en optimisant la fonction qu'il doit remplacer.

Les biomatériaux sont considérés comme inertes quand le matériau n'interagit pas avec l'organisme (comme dans le cas des remplacements des valves cardiaques - bioprothèse valvulaire) (Cribier A et al., 2002) ou bioactifs/interactifs quand le matériau interagit activement avec l'environnement tissulaire (comme dans le cas des implants de hanche à base de polymère recouverts d'une couche mince d'hydroxyapatite (prothèse de Furlong®) (Chandran P et al., 2010). Les biomatériaux sont souvent utilisés dans les applications dentaires, chirurgicales et dans la délivrance de produits médicamenteux (grâce à des dispositifs introduits dans le corps et permettant de délivrer des substances médicamenteuses de manière prolongée).

Dès l'antiquité, les hommes utilisaient des pièces métalliques comme implants dentaires (Crubezy et al., 1998). Au début du XX^{ème} siècle, l'utilisation de céramiques, d'alliages métalliques et de polymères a permis d'obtenir de meilleures performances et une meilleure fonctionnalité. Des vies ont été sauvées ou améliorées grâce aux stents cardiovasculaires, aux implants dentaires, aux prothèses de hanche ou aux lentilles de contact.

Le marché des implants orthopédiques a aujourd'hui une croissance très rapide à cause du vieillissement de la population au niveau mondial. Dans les dernières années, aux Etats Unis, plus d'un million d'implants par an ont été posés, avec un coût total estimé de 5 milliards de dollars (Liu Y et al., 2010; www.researchandmarkets.com).

Malgré les avancées de la recherche, il existe souvent des problèmes de biocompatibilité qui doivent être résolus avant que l'on puisse commencer à implanter ces produits sur le marché et que ceux-ci puissent être utilisés cliniquement. De nombreux paramètres doivent être pris en compte pour que ces matériaux soient les plus biocompatibles possibles avec le corps et ses fonctions. Ils sont testés *in vitro* et *in vivo* avant leur mise en service. Les essais *in vitro* sont les essais primaires indispensable à la validation d'un biomatériau et qui permettent de faire une première sélection avant de réaliser les essais *in vivo*.

Les techniques actuelles d'observation microscopique, telles que les microscopies électroniques, photoniques ou à fluorescence, sont bien développées et permettent à présent d'observer directement *in vitro* les comportements cellulaires à la surface des matériaux.

Le travail présenté dans cette thèse porte sur l'élaboration de couches minces de biomatériaux biomimétiques nanostructurées par des techniques de lasers pulsés et leur évaluation de point de vue physico-chimique et biologique (biocompatibilité, prolifération et différenciation cellulaires). Le but vise à développer une nouvelle méthode de recouvrement d'implants osseux par des techniques de laser pulsé avancées (PLD – Pulsed Laser Deposition et MAPLE - Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation). Ces techniques seront utilisées pour la synthèse d'un système biphasique composé de nanoparticules d'hydroxyapatite associées à des protéines d'adhérence type fibronectine et vitronectine déposées sur un substrat type titane. Le support métallique permettra de maintenir la rigidité mécanique, l'hydroxyapatite favorisera la bio-intégration dans le tissu osseux et les protéines accéléreront l'adhérence cellulaire. L'objectif principal est d'accélérer l'adhérence des cellules et la formation des tissus au contact des implants.

Dans *une première partie bibliographique*, nous nous intéresserons au tissu osseux et au processus d'interaction de ce tissu avec les biomatériaux. Nous décrirons la matrice

extracellulaire osseuse ainsi que les particularités du minéral osseux. Les processus d'adhérence cellulaire seront détaillés. Enfin, nous nous intéresserons aux différents biomatériaux existant actuellement mais aussi aux méthodes de modifications de surface des biomatériaux qui favorisent les interactions cellules/matériaux et qui permettent de développer des matériaux biomimétiques. *La deuxième partie* sera consacrée à la présentation des matériaux utilisés et aux méthodes et dispositifs d'élaboration des couches minces. Les méthodes physico-chimiques de caractérisation des couches obtenues seront exposés et détaillées les méthodes physico-chimiques de caractérisation des couches obtenues ainsi que les essais de dosage, marquage, quantification des protéines et les études d'adhésion et de prolifération cellulaire. Les résultats et discussions seront exposés dans *une troisième partie* du manuscrit. Le transfert PLD et MAPLE et les mécanismes impliqués, la distribution des matériaux sur des substrats différents, la stabilité, la rugosité et les compositions des nouvelles surfaces seront présentées. Des études biochimiques et biologiques détaillées confirmeront l'amélioration des surfaces, et garantiront que les dépôts PLD et MAPLE sont intacts et bioactifs. Les parties **Conclusions** et **Références bibliographiques** compléteront le manuscrit.

1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. L'INTERACTION DU TISSU OSSEUX ET DES BIOMATERIAUX

Le succès de l'implant ainsi que la construction d'un nouveau tissu sont fortement dépendants du matériau sélectionné. Un des facteurs les plus importants dans l'échec d'un implant est la régénération insuffisante du tissu autour du matériau après l'implantation. Ce problème a été attribué à l'interaction faible du biomatériau avec le tissu hôte. Il est connu que l'introduction d'un implant dans un organisme vivant induit des réactions spécifiques dans le milieu biologique. Les biomolécules et les cellules, associées aux propriétés intrinsèques des biomatériaux sélectionnés, déterminent la biocompatibilité et la longévité d'un implant.

Un implant osseux idéal en orthopédie ou dentisterie devrait réunir les caractéristiques suivantes: i) être biomimétique, c'est-à-dire capable d'induire la différenciation des cellules appropriées (cellules endothéliales et ostéoblastiques) en vue de la formation d'os nouveau ; ii) être facilement synthétisé ou produit ; iii) être résorbable lorsque se produit la réaction ostéogénique; iv) être dépourvu de propriétés immunogènes; v) pouvoir être transporté et entreposé facilement et vi) être vendu à un coût raisonnable.

Les principes biomimétiques combinés à l'implantologie pourraient révolutionner le domaine des implants. Les patients qui présentent des problèmes difficiles, par exemple une qualité et une quantité osseuse déficiente, pourraient bénéficier d'une méthode de traitement améliorée, d'une réduction de la période de cicatrisation initiale et d'une meilleure performance à long terme de l'implant.

Les avancées en nanotechnologie permettent de développer des nouveaux biomatériaux qui possèdent des fonctions plus complexes. Ainsi, il est possible de fabriquer des matériaux qui miment les propriétés physico-chimiques des matériaux naturels et d'induire des interactions spécifiques avec les récepteurs membranaires des cellules cibles pour réguler la régénération, la maintenance ou la destruction de tissus spécifiques.

Pour fabriquer des structures biomimétiques avec les attributs physico-chimiques de l'os il est essentiel de comprendre la biologie, la physiologie et l'anatomie du tissu osseux. La section suivante est dédiée à l'anatomie et l'histologie du tissu osseux et aux mécanismes qui interviennent dans le remodelage ou dans les réparations des fractures osseuses.

1.1.1.1. TISSU OSSEUX. MATRICE EXTRACELLULAIRE.

Le tissu osseux est un tissu de soutien dont la matrice rigide est constituée d'un complexe protéinocalcique qui enveloppe les cellules osseuses (ostéocytes) dont le matériau principal est le collagène. Le tissu osseux a quatre fonctions importantes: 1) mécanique (rôle de soutien) – support rigide de l'organisme sur lequel se fixent les muscles - il répond aux contraintes et aux déformations en remodelant le tissu osseux, 2) protections des organes vitaux et de la moelle osseuse, 3) métabolique – il est un réservoir métabolique et chimique (homéostasie calcique) et 4) hématopoïétique puisqu'il renferme les cellules de la moelle osseuse.

Du point de vue anatomique, on peut classier le tissu osseux en *os compact* (formé d'os haversien dense) et en *os spongieux* (formé d'os alvéolaire). Le tissu osseux compose les os qui se classent en *os longs* (radius, cubitus, femur,...), *os courts* (phalanges,...) ou *os plats* (maxillaire, mandibulaire, frontal, pariétal,...). Une classification histologique classifie les tissus osseux en *tissu osseux primaire* et *tissu osseux lamellaire*. Les tissus osseux lamellaires se divisent en tissu osseux *haversien compact*, *haversien alvéolaire* et *périostique*.

Tous les tissus osseux comprennent une *charpente protéique* (composée de fibres de collagène), une *substance fondamentale* (matériel amorphe, en apparence sans structure, composé de complexes glucides-protéines, une *substance minérale osseuse* (insoluble au pH de l'organisme, qui confère à l'os sa dureté) et *les cellules osseuses* (en particulier, les ostéocytes qui se logent dans des cavités ou lacunes (ostéoplastes) creusées dans la matrice.

Le *tissu osseux primaire* est un tissu temporaire qui sera rapidement remplacé par un tissu osseux lamellaire. Il est constitué de parois d'épaisseur variable (trabécules) qui séparent des espaces à limites irrégulières en forme de sacs inter-communicants (canaux vasculaires) (Figure 1).

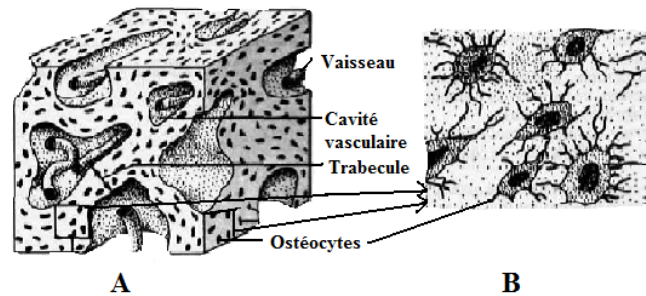


Figure 1: Tissue osseux primaire. A. Reconstruction tridimensionnelle. B. Ostéocytes et ostéoplastes

Ce type de tissu osseux est le premier à se former chez le fœtus aux dépens du cartilage (ossification endochondrale) ou du tissu conjonctif (ossification de membrane). Il subit des remaniements importants au cours de l'ossification secondaire et se transforme en tissu lamellaire. Dans des conditions normales, il n'y a plus d'os primaire dans un organisme après l'âge de 14 à 16 ans. Cependant, il est possible d'observer un tel type de tissu osseux chez l'adulte au cours de la réparation des fractures, dans les ossifications ectopiques, dans l'ostéosarcome (tumeur osseuse) ou dans la maladie de Paget.

Le *tissu osseux lamellaire* provient de l'ossification secondaire du tissu osseux primaire. La *lamelle osseuse* est l'unité (couche distincte individualisable) du tissu osseux. Elle est formée d'une matrice extracellulaire (MEC), comprenant une phase organique, une phase minérale, et de cellules. Les lamelles se disposent de plusieurs manières : i) elles s'accumulent les unes sur les autres (ex. tissu osseux périostique), ii) elles s'arrangent concentriquement autour d'un canal vasculaire haversien central (ostéon ou ostéone) ou iii) elles remplissent les espaces séparant les ostéons. Une juxtaposition de systèmes de lamelles concentriques autour de l'ostéone et des systèmes intermédiaires constituent le *tissu osseux haversien compact* (Figure 2).

Les *ostéocytes* sont réparties régulièrement et établissent des relations avec les canaux vasculaires (canaux de Havers dans le tissu osseux dense ou compact, cavités médullaires dans le tissu osseux spongieux).

Chaque système de Havers (ostéone) a la forme d'un cylindre dont l'axe est parallèle à celui de la pièce osseuse. Il se compose d'un canal central (le canal de Havers) avec un diamètre de 20 à 100 μm et des lamelles osseuses concentriques.

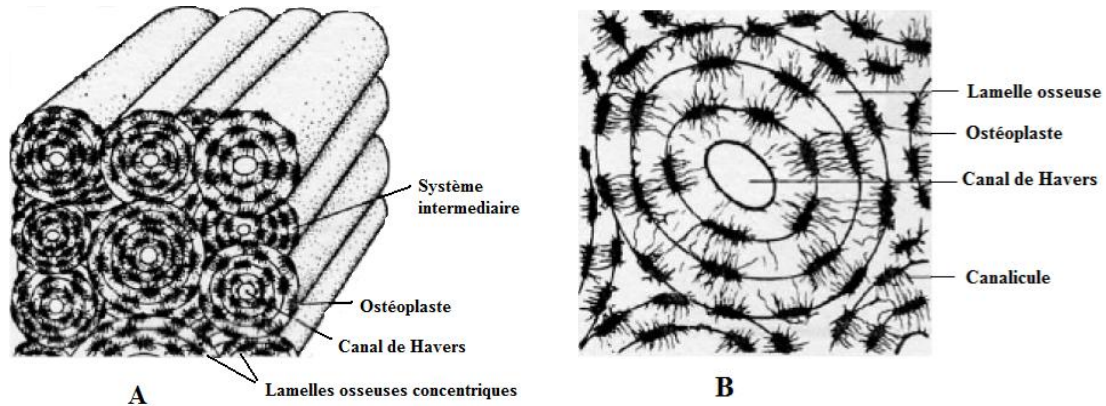


Figure 2: Tissu osseux lamellaire : tissu osseux haversien compact. A. Structure tridimensionnelle. B. Coupe transversale d'un système de Havers (ostéone).

Le canal est occupé par un capillaire, des cellules fixes et mobiles et une fine trame de fibres de collagène. Les canaux d'un gros diamètre contiennent aussi une artériole et une veinule. Les lamelles ont une épaisseur de 10 – 13.5 μm . Pour un système de Havers, leur nombre varie de 8 à 15 en moyenne. Les fibres de collagène ont une orientation différente d'une lamelle à l'autre ce qui augmente la résistance mécanique des ostéones (Figure 3).

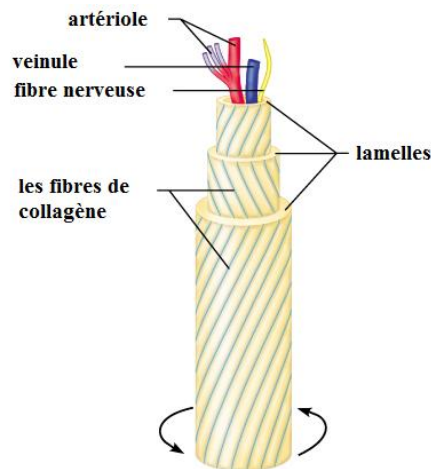


Figure 3: Ostéone : orientation des fibres de collagène dans les lamelles osseuses

Les ostéoplastes (lacunes) dans lesquelles se logent les ostéocytes creusent les lamelles ou les espaces inter-lamellaires. Il n'y a pas de localisation spécifique des lacunes par rapport aux lamelles. Elles sont disposées en couches concentriques moins nombreuses que les couches de lamelles. De ces lacunes s'échappent de nombreux canalicules à disposition radiaire, à direction interne ou externe, qui relient latéralement les ostéoplastes. Les canalicules unissent les ostéoplastes des rangées voisines ou de la même rangée. Il y a des canaux (canaux de Volkman) d'un diamètre identique à ceux de Havers, à direction transversale, oblique, qui unissent les canaux centraux. Ils s'ouvrent à la surface de la pièce osseuse ou dans la cavité médullaire. Les canaux de Havers et de Volkman dessinent un réseau complexe parcouru par des vaisseaux sanguins (Figure 4).

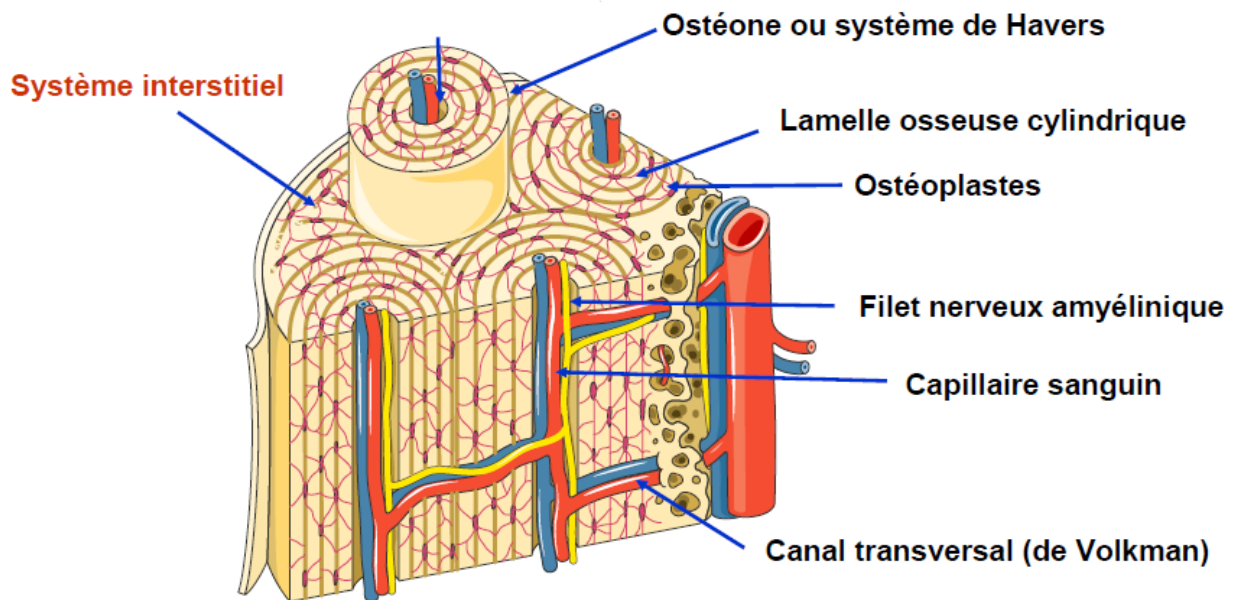


Figure 4: Les canaux de Havers et de Volkman. Reconstruction tridimensionnelle d'un tissu osseux haversien compacte

Le *tissu haversien alvéolaire ou spongieux* est le tissu osseux lamellaire dont les trabécules (travées) séparent des cavités vasculaires volumineuses, irrégulières, contenant des vaisseaux et de la moelle osseuse hématogène. Il est localisé dans l'épiphyse des os longs, dans les os courts ou au diploé des os plats. Il est formé par des *lamelles osseuses* et *cavités vasculaires*. Les

lamelles sont en nombre variable (en général faible) associées en travées contenant les ostéoplastes, leurs canalicules et les ostéocytes. Les fibres de collagène ont plus ou moins la même orientation à l'intérieur d'une lamelle et passent d'une lamelle à l'autre. Les cavités vasculaires ont des tailles très variables et irrégulières communiquant largement les unes avec les autres. Ces cavités contiennent au sein d'un tissu conjonctif lâche, soit un capillaire, soit une veinule et souvent de la moelle rouge hématogène.

Un schéma bilan qui rassemble les caractéristiques les plus importantes des tissus osseux est présenté dans le Tableau I.

Tableau I : Schéma bilan des caractéristiques des tissus osseux : compact vs spongieux

Tissu osseux compact	Tissu spongieux
couche externe, manchon qui donne naissance à la cavité médullaire dans les os longs	majoritaire dans l'épiphyse des os longs, courts ou plats
assemblage en ostéons	assemblage en trabécules (il n'y a pas d'ostéons)
les lamelles se disposent autour de la périphérie et remplissent les espaces entre les ostéons.	contient de la moelle rouge hématogène
canaux centraux interconnectés par des canaux transversaux	riche en cellules conjonctives adipeuses et en éléments sanguins
partie osseuse dense, dure et très résistante	résistance faible, plus léger que l'os compact

Il y a cinq types des cellules dans le tissu osseux : 1) *les cellules ostéogéniques* (ex. mésenchymateuses et ostéoprogénitrices) qui répondent aux blessures (fractures) en se différenciant en cellules qui forment l'os 2) *les ostéoblastes* (les cellules qui forment l'os) qui synthétisent et secrètent une substance non-minéralisée ; elles se trouvent dans l'os dans les

endroits où le métabolisme est élevé 3) *les ostéocytes* qui sont les cellules matures osseuses dérivées des ostéoblastes (après la synthèse du tissu osseux) qui maintiennent la santé du tissu par la sécrétion d'enzymes spécifiques et le contrôle du contenu minéral de l'os ; elles contrôlent aussi le relargage du calcium du tissu dans le sang ; 4) *les ostéoclastes* qui sont de grandes cellules qui dégradent le tissu osseux ; elles sont très importantes dans la croissance de l'os, mais aussi dans la réparation et le remodelage ; et 5) *les cellules osseuses bordantes* (des ostéoblastes au repos, capables de redevenir ostéoblastes) qui se trouvent à la surface de presque tous les os adultes ; elle règlent la circulation de calcium et de phosphore à l'intérieur et à l'extérieur de l'os (Applegate, EJ, 1995 ; Van De Graaff, KM, 1998) (Figure 5). Les cellules bordantes, les ostéoblastes et les ostéocytes sont des cellules ostéoformatrices tandis que les ostéoclastes sont des cellules ostéorésorbantes.

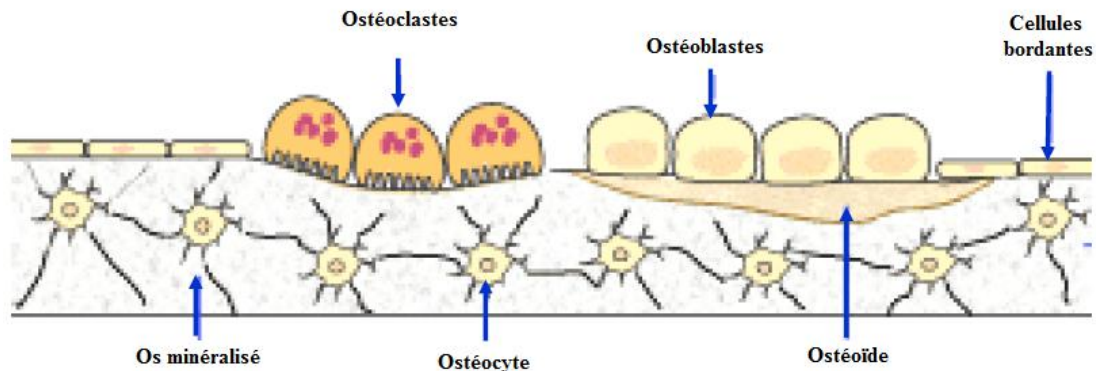


Figure 5: Les cellules osseuses et le remodelage osseux

L'origine des cellules ostéoformatrices sont les cellules souches mésenchymateuses pluripotentes qui peuvent dériver aussi en cellules fibroblastiques, chondrocytes, musculaires lisses ou adipocytes. Les ostéoclastes dérivent eux par fusion cellulaire de cellules mononuclées de la ligne hématopoïétique monocyttaire.

Une réparation osseuse (dans le cas d'une fracture) comprend plusieurs étapes : I) la fracture entraîne une hémorragie avec formation d'un caillot sanguin qui sécrète des signaux chimio-attractants et d'angiogenèse ; les signaux chimio-attractants attirent sur place des granulocytes neutrophiles et les macrophages éliminent localement les débris cellulaires ; II) les cellules mésenchymateuses et les capillaires sanguins prolifèrent et forment un tissu de granulation (tissu conjonctif richement vascularisé) ; III) le tissu de granulation est remplacé par du tissu cartilagineux qui comble le foyer de fracture formant, le cal provisoire cartilagineux, flexible ; IV) le cal cartilagineux se calcifie et ses cellules meurent ; des ostéoblastes (du périoste et de l'endoste) prolifèrent fabriquent du tissu ostéoïde qui remplace le cal cartilagineux. Le cal osseux (minéralisé) est ensuite remodelé par les ostéoclastes pour restaurer la forme originale de l'os (Figure 6).

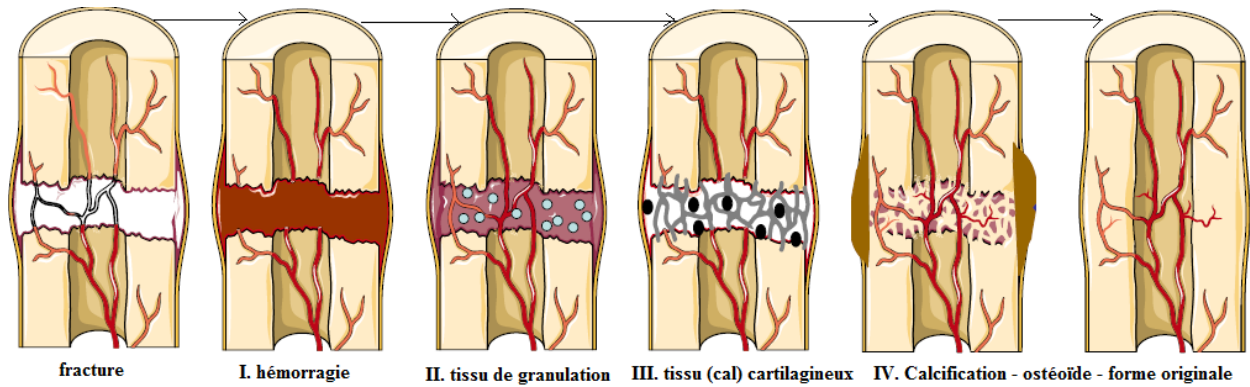


Figure 6: Les étapes de la réparation osseuse d'une fracture

Par définition, une matrice extracellulaire (MEC) est le matériau naturel idéal comme support biologique pour la croissance cellulaire. La MEC est d'habitude générée et modelée par les cellules hôtes du tissu ou de l'organe et se trouve dans un état d'équilibre dynamique permanent avec le milieu adjacent (Bissell MJ et al., 1987). Les constituants de la MEC sont synthétisés et sécrétés par les cellules comme les fibroblastes, les ostéoblastes ou les chondroblastes. Les molécules structurales et fonctionnelles de la MEC fournissent les moyens nécessaires à la communication des cellules hôtes avec le milieu externe (Kleinman HK et al., 2003; Rosso F et al., 2004; Brown E, Dejana E, 2003). Evidemment, la MEC est biocompatible puisque ce sont les cellules qui produisent cette matrice. La MEC fournit un milieu support ou catalyseur pour les vaisseaux sanguins, le système nerveux et lymphatique et assure la diffusion des nutriments du sang vers les cellules. Bien que la MEC fournisse généralement un support mécanique aux tissus, elle remplit également plusieurs autres fonctions. Des combinaisons variables des composants de la MEC adaptent la matrice extracellulaire à des buts différents: la solidité dans les tendons, les dents et les os; l'élasticité dans les cartilages et l'adhérence dans la plupart des tissus. De plus, la composition de la matrice, qui peut varier en fonction du site anatomique et de l'état physiologique du tissu, informe la cellule de l'endroit où elle se trouve et de ce qu'elle doit y faire (signaux de l'environnement). Les changements dans les composants de la MEC, qui sont en permanence remodelés, dégradés et resynthétisés localement, peuvent moduler les interactions d'une cellule avec son environnement. La matrice sert également de réservoir à de nombreuses molécules de signalisation extracellulaire qui contrôlent la croissance des cellules et leur

différenciation. De plus, la matrice fournit une barrière à travers ou sur laquelle les cellules peuvent se déplacer, en particulier aux stades précoces de l'assemblage des tissus. La morphogenèse, le dernier stade du développement embryonnaire au cours duquel les tissus, organes et parties du corps sont formés grâce à des déplacements et des réarrangements cellulaires, dépend également et fortement de l'adhérence cellule-matrice ainsi que de l'adhérence intercellulaire. En conclusion, la MEC possède toutes les caractéristiques idéales pour être utilisée en ingénierie tissulaire.

Certaines cellules sont spécialisées dans la production de cette matrice. Par exemple, les fibroblastes qui construisent l'essentiel des tissus conjonctifs, les chondroblastes qui élaborent le cartilage hyalin, les ostéoblastes qui produisent l'os et les synoviocytes qui sont responsables de la production du liquide synovial dans les articulations. La MEC est composée d'un ensemble de polysaccharides et de protéines. Les polysaccharides sont des glycosaminoglycanes (GAG) qui sont généralement reliés de façon covalente à une protéine pour former des protéoglycanes. Les GAG sont de longues chaînes composées d'unités disaccharidiques répétitives. Un des deux résidus glucidiques est toujours un glucide aminé (N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine) et le second est habituellement un acide uronique (glucuronique ou iduronique). Les GAG se répartissent en quatre types principaux : i) l'acide hyaluronique (d'hyaloïde (humeur vitrée) et acide uronique), ii) la chondroïtine sulfate, iii) l'héparane sulfate et iv) le kératane sulfate. A l'exception de l'acide hyaluronique, tous les GAG sont liés de façon covalente à une protéine pour former des protéoglycanes.

Les constituants de la phase organique d'une MEC osseuse est élaborée par les ostéoblastes. Elle est composée pour 90% de fibres collagènes parallèles les unes aux autres et pour environ 10% de substance fondamentale qui se mêle avec les fibres. Cette substance est constituée de protéoglycanes, et d'une grande variété de protéines non-collagénique comme l'ostéonectine, l'ostéopontine et l'ostéocalcine, intervenant dans la régularisation de la minéralisation, d'autres glycoprotéines (des carbohydrates avec des domaines actifs distincts pour la signalisation cellulaire) et les élastines (des structures flexibles et instables mais qui détiennent des propriétés de réversibilité d'une conformation à l'autre).

Les fibres de collagène (0,5 à 3 μm en diamètre et 30 μm en longueur) sont du type I et du type V. Chaque fibrille est un ensemble de structures hélicoïdales (molécules de collagène, d'environ 50 nm de diamètre et 300 nm de longueur). Les fibrilles sont assemblées en fibres, elles-mêmes assemblées en lamelles. Toutes les fibres ont, dans leur lamelle, la même orientation, mais cette orientation change d'une lamelle à l'autre. Les fibres de collagène forment des structures qui résistent aux forces de tension. Elles sont aussi impliquées dans l'adhésion des ostéoblastes (McCann TJ et al., 1997) et possèdent une capacité de liaison au calcium très forte.

La protéine non-collagénique la plus abondante de la MEC est l'ostéonectine. Elle possède plusieurs sites de liaison pour le Ca^{2+} et le collagène et dispose aussi d'un potentiel de nucléation de l'HA (Maurer P et al., 1996). L'ostéocalcine est la deuxième protéine non-collagénique la plus abondante. Elle est dépendante de la vitamine K et garde une affinité pour le Ca^{2+} /HA tout en tenant un rôle important dans la migration des ostéoclastes (Ducy P, 1996). L'ostéopontine est une glycoprotéine impliquée dans la migration des cellules, dans la régularisation et le dépôt minéral (de Oliveira PT et al., 2004). L'ostéocalcine et l'ostéopontine sont des bio-marqueurs spécifiques utilisés pour la caractérisation phénotypique des ostéoblastes matures.

Parmi les glycoprotéines impliquées fortement dans l'adhésion cellulaire, la fibronectine et la vitronectine sont les plus importantes glycoprotéines de la MEC avec des fonctions bioactives dans l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire (Hynes RO, 1990 ; Yamada KM, Clark RAF, 1996 ; Webster TJ et al., 2001). Les deux contiennent une séquence de trois acides aminés, arginine-glycine-acide aspartique (RGD) engagée dans les liaisons avec les cellules (Yang F et al., 2005 ; Burdick JA et al., 2002). Les protéoglycanes influencent aussi le comportement des cellules par le blocage des molécules RGD (Halpert I et al., 1996).

La phase minérale la MEC osseuse est composée d'une fraction amorphe et d'une fraction cristalline. La fraction amorphe contient divers phosphates calciques. La fraction cristalline, la plus importante, est constituée de cristaux d'hydroxyapatite (HA, $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$, apatite hydratée ou phosphate de calcium cristallisé ; 50% du poids de l'os est dû à la présence d'eau). L'os contient 98% du calcium de l'organisme: il représente un réservoir de calcium et joue un rôle primordial dans le métabolisme phosphocalcique. Les cristaux d'HA mature se présentent

sous forme de tablettes ou d'aiguilles d'environ 50 à 100 nm longueur et 25-50 nm largeur (Landis et al., 1993). Les cristaux nouvellement déposés atteignent environ 4 à 6 nm d'épaisseur (Landis et al., 1993; Kim et al., 1995). La taille des cristaux est contrôlée notamment par la distance interfibrillaire du collagène.

Adhérence cellule-matrice. Molécules responsables de l'adhérence à la matrice extracellulaire.

Dès les premiers instants d'implantation d'un biomatériau, les protéines contenues dans les fluides circulants viennent s'adsorber à la surface. Cette étape est dépendante des caractéristiques physico-chimiques du matériau. L'adsorption des protéines des fluides circulants sur une surface provoque un changement de conformation qui accroît leur capacité de liaison aux cellules. Il est vraisemblable que ce changement conformationnel augmente l'accessibilité de la séquence RGD pour la fixation de l'intégrine. Quelques exemples d'adsorption de la fibronectine et d'autres protéines ou peptides sur des surfaces solides et leurs effets sont présentés dans le Tableau II ci-dessous.

Tableau II: L'adsorption des protéines est dépendante des propriétés physico-chimiques de la surface

Protéine	Adsorption	Surface	Effet	Référence
Fibronectine	Adsorption physique	Hydroxyapatite à l'échelle nanométrique	Changement du nombre d'épitopes exposés, influence sur les cellules ostéoblastiques	Ribeiro N. et al., 2010
Fibronectine	Conjugaison covalente	PET aminé	Exposition des épitopes et fibrillo-genèse, multi-couches de FN, bioactivités différentes	Zhang Y. et al., 2007
Fibronectine	Adsorption physique	PET aminé	Plusieurs sites RGD exposés, amélioration de l'adhésion cellulaire	Zhang Y. et al., 2007
Fibronectine	Adsorption physique	Disques d'hydroxyapatite	Agrégation et fibrillo-genèse	Pellenc D. et al., 2006
Peptides RGD et protéoglycanes	Adsorption physique	Hydroxyapatite	Plusieurs sites RGD exposés, amélioration d'adhésion cellulaire	Sawyer A.A. et al., 2007

Les interactions entre les cellules et le matériau se font par des récepteurs membranaires qui interagissent avec les protéines et autres constituants des liquides biologiques déposés à la surface du biomatériau. La qualité de l'adhésion va influencer la morphologie cellulaire et la capacité à proliférer et à se différencier (Anselme K., 2000). Les cellules ont besoin de s'attacher à une surface pour assurer leur viabilité, croissance, migration et différenciation.

La MEC aide à assurer la cohésion cellulaire et tissulaire et constitue une trame structurée à l'intérieur de laquelle les cellules peuvent migrer et interagir les unes avec les autres. Les cellules d'un tissu sont également maintenues en place par l'adhérence directe des cellules entre elles. Toutes ces interactions sont dues à des protéines membranaires spécialisées : les molécules d'adhérence. Elles jouent un rôle très important à la fois dans le développement et l'intégrité anatomique des tissus. Ces molécules sont caractérisées par leur capacité à interagir avec un ligand spécifique (des protéines de la MEC ou de la membrane des cellules voisines). Il y a quatre groupes principaux de molécules d'adhésion (Anselme K., 2000) : i) *les sélectines* ; ii) *les immunoglobulines*, iii) *les cadhérines* et iv) *les intégrines*.

Les sélectines sont impliquées dans l'adhésion des lymphocytes aux ganglions lymphatiques. Elles sont aussi responsables de la régulation du guidage physiologique des lymphocytes dans le lit vasculaire et jouent un rôle important dans la mobilisation des leucocytes au site de l'inflammation (Adler S et Brady HR, 1999).

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines membranaires et solubles, impliquées dans les phénomènes de reconnaissance, de liaison et d'adhésion des cellules. Elles jouent un rôle crucial dans les interactions entre les cellules impliquées dans le système immunitaire.

Les cadhérines sont des glycoprotéines impliquées dans les liaisons intercellulaires. Ce sont des protéines transmembranaires qui sont dépendantes du calcium. Lorsque le calcium se fixe, il entraîne une modification de la conformation de la cadhérine qui permet de reconnaître une autre cadhérine et de s'y fixer. Les cadhérines assurent la stabilité et l'imperméabilité des vaisseaux sanguins.

Les intégrines sont des glycoprotéines membranaires qui interagissent avec le collagène, la laminine, la fibronectine et la vitronectine et sont les molécules d'adhérence les plus impliquées dans l'interaction avec la matrice extracellulaire. Les deux principales fonctions des intégrines sont : i) l'attachement d'une cellule à la MEC et ii) la transduction de signaux de la MEC vers la cellule. Elles sont composées d'une portion extracellulaire et d'une portion intracellulaire, représentées par une « tête » et deux « jambes » formant deux sous-unités transmembranaires associées de façon non covalente que l'on appelle α et β (Figure 7A - Humphries MJ, 2000). Dans la partie extracellulaire, la sous-unité α contient sept domaines répétés, chacun contenant 60 acides aminés, tandis que la sous-unité β contient un seul domaine de liaison. L'association de ces domaines forme un hétérodimère stable et la combinaison des deux sous-unités détermine la spécificité du substrat. Dans certaines sous-unités α , un domaine est associé et assure la liaison du récepteur à son ligand, telles la fibronectine, la vitronectine, la laminine, le collagène. La portion intracellulaire est assez courte, et est reliée aux protéines du cytosquelette, en particulier la taline, la vinculine et l'actine. L'association des domaines cytoplasmiques des sous-unités α et β maintient l'intégrine dans un état de repos (Figure 7B gauche). La rupture de l'interaction entre ces domaines déclenche un changement conformationnel menant à l'activation du récepteur (Figure 7B droite). Elle induit alors, une signalisation intracellulaire menant à plusieurs fonctions cellulaires, dont la survie, l'adhésion et la motilité cellulaire (Hynes, 1992). Le récepteur actif est étiré, possède un site d'adhésion du ligand dans un état conformationnel de haute affinité et un site de coordination altéré au niveau du MIDAS (site d'adhésion dépendant des ions métalliques) (Figure 7A). Des protéines cytoplasmiques additionnelles sont recrutées pour former des adhérences focales.

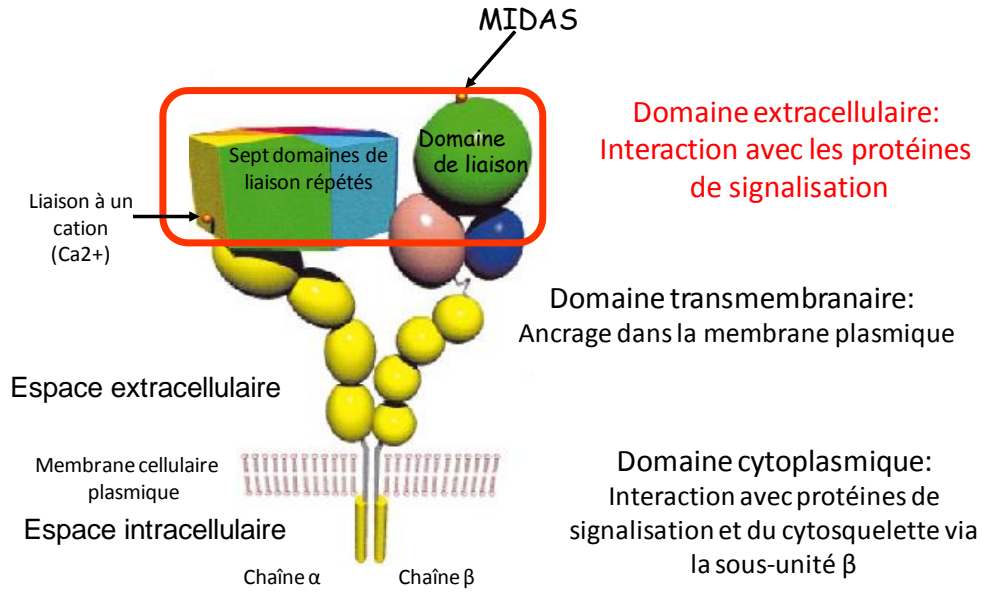


Figure 7A: La structure d'une intégrine (Humphries MJ, 2000)

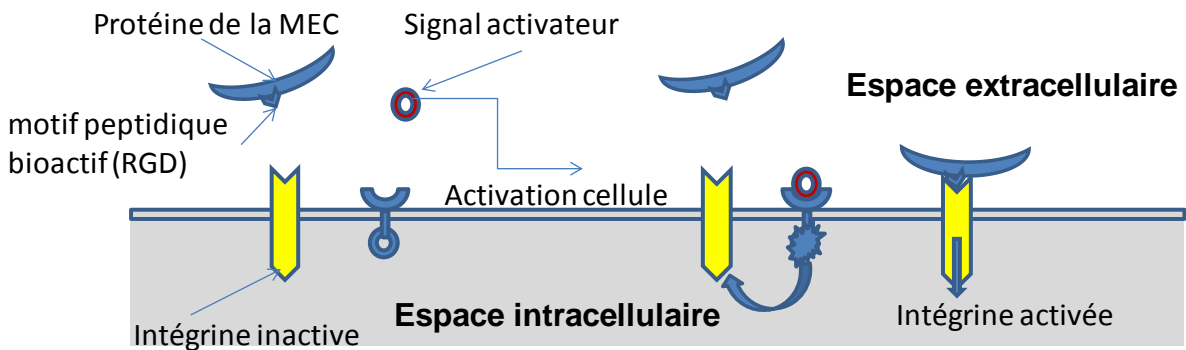


Figure 7B : Exemple de l'activation d'une intégrine : une cellule non-adhérente à la matrice reçoit un signal activateur extérieur ce qui entraîne son activation et un changement de la conformation de l'intégrine – fixation à la MEC

La chaîne α est composée de 1008 à 1152 acides aminés tandis que la chaîne β comprend 770 acides aminés ($\alpha_{1,2,3,\dots}$ et $\beta_{1,2,3,\dots}$ d'un poids moléculaire d'environ 120 kDa et 90 kDa respectivement), avec plusieurs combinaisons possibles formant 24 récepteurs différents (Figure 8). Chaque combinaison du domaine extracellulaire varie en fonction de sa spécificité de liaison et de la taille des sous unités.

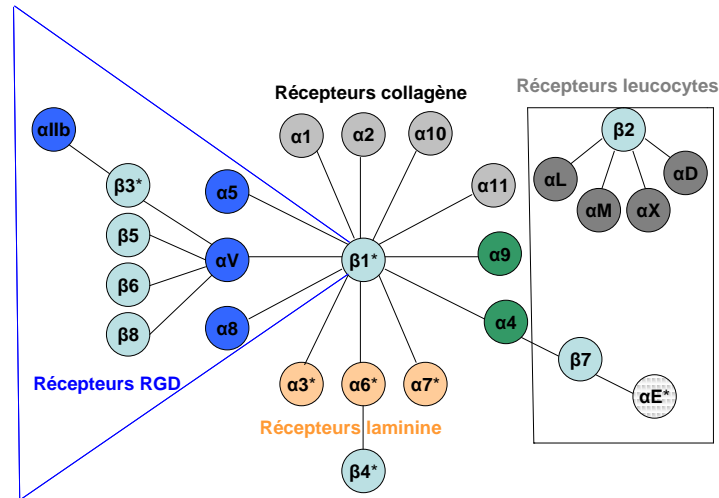


Figure 8. Sous-unités α et β des intégrines et leurs combinaisons et associations à des protéines spécifiques (ligands)

Certaines intégrines ne reconnaissent qu'un seul ligand comme l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ qui ne se lie qu'à la fibronectine alors que $\alpha_V\beta_1$ se lie à la fibronectine et à la vitronectine, des protéines de la MEC des tissus conjonctifs. Dans certaines cellules, comme les cellules épithéliales ou les fibroblastes, on trouve aussi l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ qui se lie à la laminine, composant de la lame basale (qui détermine l'architecture globale d'un tissu épithélial). La liaison des intégrines à leurs ligands est dépendante de cations bivalents extracellulaires (le Mn^{2+} ou le Ca^{2+}). A l'intérieur de la cellule, les intégrines interagissent avec le cytosquelette. Leur nom dérive de leur fonction : *elles forment la liaison entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette* (« intégration » entre les deux). Pour leur interaction avec la matrice extracellulaire, les intégrines sont assemblées en amas, formant ainsi un point focal d'adhérence. Du côté intracellulaire, ces amas ponctuels d'intégrines jouent le rôle de jonction d'ancrage entre molécule d'adhérence et cytosquelette (Figure 9) et recrutent plusieurs type de protéines qui servent d'intermédiaires de liaison (pontage) avec l'actine (constituant du cytosquelette) comme par exemple la taline (230 kDa), la vinculine (110 kDa) et l' α -actinine (100 kDa). Les intégrines participent donc à l'organisation du cytosquelette et à l'activation de signaux cellulaires. Elles sont notamment impliquées dans la migration cellulaire et agissent de concert avec les récepteurs de facteurs solubles pour réguler

l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire (Danen et Sonnenberg, 2003). Elles jouent un rôle prépondérant dans l'adhésion des cellules osseuses aux biomatériaux (Hozumi et al., 2010). L'étalement cellulaire résulte de changements structuraux du cytosquelette induits par l'adhésion cellulaire et médiés par les intégrines.

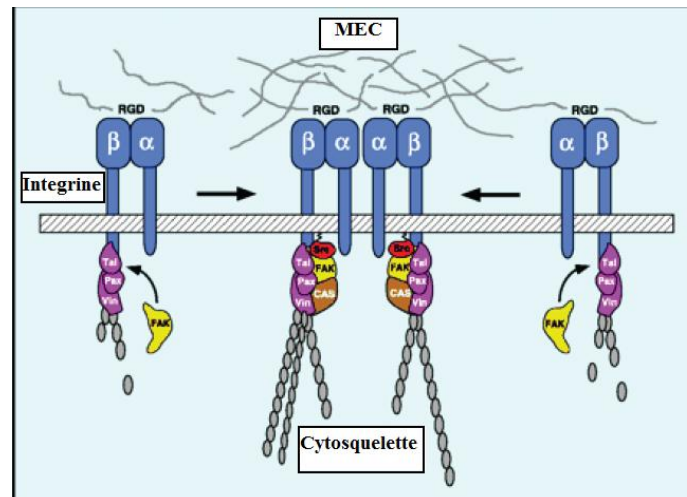


Figure 9: Jonction des intégrines avec les protéines de la MEC. Cluster d'intégrines et association au cytosquelette. Tal: taline ; Pax: paxilline ; Vin: vinculine (Giancotti et Ruoslahti, 1999).

Cependant, les intégrines ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque. La transduction du signal requiert le recrutement de molécules de signalisation, telles que les protéines kinases, les lipides kinases, les petites GTPases et les phosphatases. De plus, plusieurs voies de signalisation médiées par les intégrines sont également activées par les récepteurs des facteurs de croissance.

1.1.2. BIOMATERIAUX INORGANIQUES ET ORGANIQUES

Les métaux représentent à présent le choix le plus commun pour remplacer totalement ou fixer l'os grâce à ses propriétés mécaniques nécessaires au soutien de la masse corporelle. Cependant, les métaux ainsi que les matériaux polymériques présentent des risques d'échecs à cause d'une

biocompatibilité réduite avec le tissu osseux ou de stress interne. Ainsi, la pose d'implants peut s'accompagner d'interventions chirurgicales difficiles qui augmentent drastiquement les coûts et le temps de récupération.

Titane

Le titane est le métal le plus utilisé en chirurgie orthopédique. Son intérêt vient de sa grande résistance à la corrosion, sa biocompatibilité, sa faible densité et son faible module élastique comparé à d'autres métaux. Les alliages de titane présentent un module élastique qui varie de 55 à 110 GPa comparé à l'acier inox 316 L dont le module est de 210 GPa alors que l'os a un module élastique d'environ 30 GPa (Ryan et al., 2006). Cependant, le titane possède une faible résistance au cisaillement et aux frottements qui entraîne la formation de débris, ce qui limite l'implantation à long terme de certains implants. Les travaux de recherche actuels tendent à améliorer les propriétés mécaniques du titane et sa biocompatibilité notamment en modifiant sa surface.

La réponse biologique, comme l'orientation et la migration cellulaire, vis-à-vis d'un biomatériau est directement influencée par la topographie de surface (Flemming et al., 1999). Une rugosité de surface à l'échelle nano- ou macroscopique peut influencer l'ostéointégration en améliorant l'ostéoconductivité d'un implant (Grizon et al., 2002; Rupp et al., 2004; Kubo et al., 2009). *In vitro*, la rugosité de surface permet d'améliorer l'adhésion des cellules de type ostéoblastique tels que les SaOs-2 (Degasne et al., 1999), de favoriser la production de facteurs de croissance impliqués dans la différenciation des ostéoblastes (Kieswetter et al., 1996; Hatano et al., 1999) et la production de protéines de la MEC (Boyan et al., 1996).

Pour la modification des surfaces différentes techniques ont été utilisées:

- traitement par acide (acid etching) qui consiste à immerger les surfaces dans un acide fort comme l'acide fluorhydrique (Martin et al., 1995; Juodzbaly et al., 2007). Cette technique permet d'augmenter de façon simple la rugosité sans affecter la biocompatibilité d'une surface (Iwaya et al., 2008).

- sablage (sandblasting) (Martin et al., 1995) qui consiste à propulser des particules d'oxyde d'aluminium (Papadopoulos et al., 1999; Szmukler-Moncler et al., 2004) ou encore des particules de carbure de silicium (Anselme et al., 2005) pour éviter une contamination de la surface par l'aluminium.

- l'abrasion en utilisant du papier abrasif à base de carbure de silicium (Anselme et al., 2000; Deligianni et al., 2001). Cette abrasion permet d'obtenir une rugosité unidirectionnelle et reproductible (Bowers et al., 1992) qui ne peut pas forcément être obtenue par les autres techniques.

- plus récemment, la modification de surface du titane par application d'un rayon laser neodymium: yttrium-aluminium-garnet (Nd : YAG) (Hsu et al., 2007; Khosroshahi et al., 2009) ou fusion laser sélective (Selective laser melting) (D. K. Pattanayak et al., 2010) a été développée. Cette technique permet d'augmenter la rugosité mais aussi d'amplifier la mouillabilité ainsi que l'énergie de surface.

Cette liste n'est, bien entendu, pas exhaustive.

Phosphates de calcium

Les phosphates de calcium sont des céramiques biocompatibles. Ils sont ostéoconductifs grâce à leur ressemblance avec la phase minérale de l'os. Ils possèdent aussi la propriété d'être biodégradables. Parmi les phosphates de calcium, l'hydroxyapatite (HA) et le β -tricalcium phosphate (β -TCP) sont souvent utilisés comme matériaux de comblement osseux. Ils peuvent être utilisés sous forme de particules macroporeuses pour améliorer l'ostéointégration et la biodégradation en augmentant la surface spécifique. En effet, la macroporosité favorise la repousse de l'os en permettant l'invasion par des précurseurs vasculaires et des cellules osseuses (Knabe et al., 2008). Ils peuvent aussi être implantés sous forme de blocs de taille millimétrique avec macroporosité interconnectée (Weiss et al., 2003).

Il existe de nombreuses autres formes de phosphates de calcium (les plus importants sont rassemblés dans le Tableau III –Mihailescu IN et al., 2010). Certains de ces phosphates de

calcium, dont le DCPD (brushite), DCPA, OCP, β -TCP et ACP sont parfois trouvés dans les tissus vivants dans des conditions normales ou pathologiques.

Tableau III : Différents phosphates de calcium : formules chimiques, rapport Ca/P et solubilité

Composition	Formule	Rapport Ca/P	Solubilité à 37 °C ($-\log[K_{ps}]$)
Phosphate de calcium Monohydraté (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5	-
Dicalcium phosphate dihydraté (brushite) (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	6.63
Dicalcium phosphate anhydre (DCPA)	CaHPO_4	1	7.02
Phosphate octocalcique (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	95.9
α ou β tricalcium phosphate (α - ou β -TCP)	α ou β $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	25.5-29.5
Hydroxyapatite (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67	117.2
Tétracalcium phosphate (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2	37-42

Cependant, les propriétés biomécaniques des biocéramiques phosphocalciques sont faibles comparées à celles du tissu osseux, elles sont cassantes et fragiles quand elles sont soumises à des forces de compression (Rezwan et al., 2006).

L'ingénierie tissulaire est apparue récemment comme une alternative prometteuse à la reconstruction des tissus ou organes détériorés, en prévenant les complications associées aux transplants traditionnels (Langer R, Vacanti JP, 1993). Dans ces études, on essaye de réparer ou régénérer le tissu détruit ou abimé en utilisant des substituts tissulaires qui permettent de maintenir la fonctionnalité pendant la régénération et éventuellement de s'intégrer dans le tissu hôte.

Protéines

Une protéine (polypeptide) est un assemblage de chaînes d'acides aminés unis par des liaisons peptidiques covalentes. Chaque protéine a une séquence unique d'acides aminés. La séquence des atomes sur la chaîne est reconnue comme le squelette du polypeptide. Il y a aussi des parties des acides aminés qui ne sont pas impliqués dans la liaison peptidique mais qui possèdent des propriétés spécifiques. Ces chaînes latérales réactives peuvent être non polaires ou hydrophobes, chargées négativement ou positivement. La séquence d'acides aminés est connue comme la **structure primaire** de la protéine. Le repliement de la chaîne du squelette polypeptidique sous forme d'hélices α ou de feuillets β constitue la **structure secondaire** de la protéine. Une organisation (arrangement) 3D de la chaîne polypeptidique représente la **structure tertiaire** tandis que dans les cas où une molécule protéique est formée d'un complexe de chaînes polypeptidiques, cette organisation est dénommée la **structure quaternaire** de la protéine.

Les propriétés biologiques d'une molécule protéique dépendent de son interaction physique avec les autres molécules. Par exemple, les anticorps s'attachent aux virus ou aux bactéries pour les marquer et préparer leur destruction ou les molécules d'actine se lient ensemble pour former des filaments d'actine. Toutes les protéines s'attachent aux autres molécules. Les liaisons sont parfois très fortes ou faibles mais toujours très spécifiques (une protéine s'attache à une ou quelques molécules parmi des milliers d'autres). La substance à laquelle la protéine s'attache (un ion, une petite molécule ou une macromolécule) est appelée *ligand* (du mot latin *ligare*, lier). La capacité de la protéine à se lier sélectivement mais avec une grande affinité au ligand dépend de la formation de liaisons faibles, non-covalentes – des liaisons hydrogène, ioniques ou de van der Waals – conjointement avec des interactions hydrophobes favorables. Ces liaisons faibles ont

1/20 de la résistance d'une liaison covalente. Elles deviennent assez fortes quand plusieurs liaisons sont formées simultanément (Figure 10).

La région de la protéine associée au ligand est dénommée le site de liaison. Le site consiste en une cavité à la surface de la protéine qui est formée par un arrangement particulier d'acides aminés.

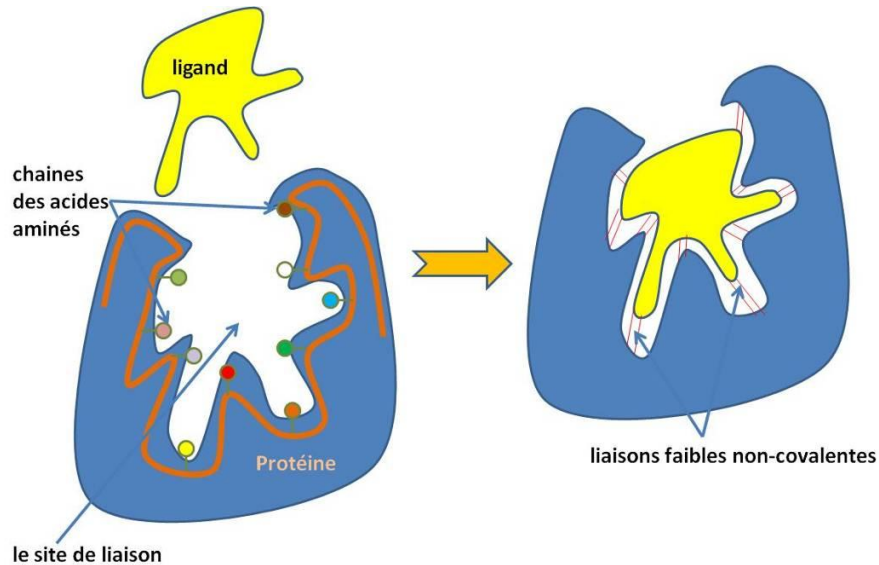


Figure 10: L'association du ligand au site de liaison de la protéine

1.1.3. PERSPECTIVES

L'incorporation de motifs peptidiques bioactifs comme le RGD (arginine-glycine-aspartate), reconnu par les intégrines - les récepteurs transmembranaires des cellules – représente stratégie la plus connue pour l'augmentation de la fonctionnalité (Bökel C. et al., 2002). La réponse cellulaire est toujours spécifique de la densité de surface des ligands ou des affinités de liaison, et est modulée par la co-localisation de ligands synergétiques (Maheshwari G. G et al., 2000 ; Benoit DS et al., 2005). Incorporer des motifs peptidiques dégradables par des enzymes

protéolytiques (par exemple les motifs reconnus par les métallo-protéases) est maintenant une voie populaire pour contrôler la biodégradabilité des biomatériaux avec des applications concrètes en remodelage et régénération des tissus (Mart RJ et al., 2006). Récemment, l'incorporation d'autres composants biologiques de la MEC comme les GAGs, en particulier l'héparine, a fourni des résultats très intéressants (Benoit DSW et al., 2007). Une fois incorporée dans le biomatériau, l'héparine est reconnue par les domaines de liaison spécifiques qui se trouvent dans les protéines impliquées dans l'attachement cellulaire (comme la fibronectine ou la vitronectine), la prolifération (le facteur de croissance de base des fibroblastes) ou la différenciation cellulaire ostéogénique (les protéines morphogénétiques de l'os). Tous ces développements conduiront très probablement à la fabrication et à l'amélioration des scaffolds et en particulier de leur efficacité *in vivo*. De plus, il y a eu des succès importants en ingénierie tissulaire grâce à l'amélioration des conditions de cultures en bioréacteur qui ont permis d'optimiser la formation et la régénération de nouveaux tissus *in vitro* (Stevens MM et al., 2005).

Le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse se trouve maintenant à un point crucial de son développement avec une activité de recherche très importante qui se focalise sur la mise en oeuvre de biomatériaux biomimétiques améliorés. Le niveau de complexité biologique qui nécessite d'être reproduit dans un système tridimensionnel n'est pas encore clair. L'élucidation future de la communication entre les cellules mais aussi de l'interaction entre les cellules et leurs matrices aideront à développer des nouvelles stratégies capables de permettre la présentation sous une forme correcte des bio-facteurs du point de vue biochimique, temporel ou spatial. De manière similaire, les applications cliniques des approches de structuration des surfaces demanderont une compréhension accrue des interactions qui se passent à l'interface substrat-surface cellulaire. La vascularisation de constructions tissulaires larges reste encore un challenge significatif et les nouvelles approches devront se baser sur l'ingénierie des interfaces. De plus, l'utilisation d'un gradient des matériaux inorganique-organique pourrait permettre de recréer l'interface tissulaire cartilage – os de l'organisme.

L'avancement de la recherche dans le domaine des matériaux aura aussi un impact positif. Dans l'organisme, l'os présente une interface avec les autres tissus comme le cartilage ou les ligaments et tendons. Ainsi, le développement de scaffolds appropriés sera obligatoire pour créer et

améliorer les interactions aux interfaces. De plus, un mélange de matériaux (organique et inorganique) sera sans doute mieux capable de mimer la complexité biologique des tissus.

1.2. BIOMATERIAUX NANOSTRUCTURES

1.2.1. DEFINITION, COUCHES MINCES, NANOSTRUCTURES

Une couche mince est un revêtement dont l'épaisseur peut varier de quelques couches atomiques à une dizaine de micromètres. Ces revêtements modifient les propriétés du substrat sur lesquels ils sont déposés. Pour des tailles de l'ordre du nanomètre, les caractéristiques électriques, mécaniques ou optiques des matériaux changent. À l'échelle nanométrique, la matière présente des propriétés particulières qui peuvent justifier une approche spécifique. Il s'agit bien sûr des propriétés quantiques, mais aussi d'effets de surface, de volume, ou encore d'effets de bord (modification d'une propriété lors de l'approche d'une valeur de seuil qui désigne l'apparition d'un phénomène nouveau). En effet, à l'échelle du milliardième de millimètre, le rapport entre les différentes forces d'interactions est différent du rapport à l'échelle macroscopique. Les forces de surface deviennent prépondérantes face aux forces d'inertie. En particulier :

1. Les forces d'inertie et le poids varient avec le cube de la longueur caractéristique des objets manipulés (forces volumiques) ;
2. Les forces de surface telles que les forces de Van der Waals ou les forces électromagnétiques varient avec le carré de la longueur caractéristique de l'objet ;
3. La force de Casimir (attractive entre deux plaques parallèles conductrices et non chargées) est souvent non négligeable, et les surfaces frottent davantage que si elle n'existait pas (Capasso F. et al., 2007);

Les recherches ont démontré que tous les systèmes vivants sont gouvernés par des mécanismes moléculaires à l'échelle nanométrique. En particulier, l'organisation cellulaire et les propriétés des tissus dépendent fortement de la structure de la MEC. Cette matrice est une structure

hiérarchique complexe avec des niveaux d'organisation spatiale sur plusieurs ordres de grandeur (du nm au cm). Par conséquent, les cellules humaines sont en interaction permanente avec des surfaces nanostructurées (Kaplan FS et al., 1994). Des études récentes ont confirmées qu'un biomatériau organisé à l'échelle nanométrique est préféré du point de vue biologique (Webster TJ et al., 2006).

Dans les tissus humains natifs, les interactions protéiques à l'échelle nano sont cruciales dans le contrôle des fonctions cellulaires comme la prolifération, la migration et la production de la MEC. Les particularités de l'adsorption des protéines dépendent aussi des propriétés de la surface des biomatériaux implantés à l'échelle nanométrique (chimie de surface, mouillabilité, rugosité ou charge) (Wilson CJ et al., 2005). Les nanobiomatériaux présentent un nombre supérieur d'atomes et de particules cristallines à la surface de contact, et fournissent une proportion surface/volume plus élevée que les biomatériaux conventionnels réalisés à l'échelle micrométrique. D'ailleurs, ces différences de nano topographie modifient considérablement la capacité d'adsorption des protéines.

Les stratégies utilisées d'ingénierie tissulaire bioadhésive à l'échelle nanométrique sont classées en trois catégories majeures :

1. *Une stratégie de contrôle nanométrique de motifs adhésifs qui possèdent la bioactivité de la protéine parentale.* On peut ainsi mimer les espaces et l'orientation des séquences de liaisons cellulaires avec les macromolécules de MEC avec le but de récapituler les fonctions d'une MEC native.
2. *Un patterning nanométrique de peptides pour une exposition avec des densités élevées.* Le nanopatterning (ou l'auto-assemblage à l'échelle nano) de peptides est utilisé pour exposer des peptides adhésifs à une densité plus élevée que dans l'état naturel à l'intérieur de MEC pour induire une réponse cellulaire plus importante.
3. *L'ingénierie à l'échelle nanométrique de peptides/protéines multivalentes et adhésifs.* Une application importante de l'ingénierie nanométrique est l'exposition de peptides multivalents adhésifs. Les ligands multivalents seront utilisés pour promouvoir le

clustering et la fixation des intégrines afin de stimuler fortement les réponses cellulaires. Il sera donc nécessaire d'utiliser l'ingénierie nanométrique pour contrôler les positions de constructions multivalentes en tenant compte du fait que les intégrines présentent des diamètres d'environ 10 nm (Hynes RO et al., 1992).

1.2.2. APPLICATIONS

Même s'il y a eu un enthousiasme général sur les applications éventuelles des nanoparticules et des nanocouches, une grande partie des applications commercialisées se limite à l'utilisation d'une « *première génération* » de nanomatériaux passifs. Cela inclut les nanoparticules de dioxyde de titane dans les crèmes solaires, cosmétiques et certains produits alimentaires; des nanoparticules de fer dans le packaging alimentaire; des nanoparticules d'oxyde de zinc dans les crèmes solaires et les cosmétiques, dans les collages extérieurs, peintures, et dans les vernis d'ameublement; et des nanoparticules d'oxyde de cérium intervenant comme catalyseur de carburant.

Le projet « The Project on Emerging Nanotechnologies » (<http://www.nanotechproject.org/>) recense les différents produits contenant des nanoparticules et fondés sur les nanotechnologies. En 2007, ce projet identifiait plus de 500 produits de consommation fondés sur les nanotechnologies. En 2008, le rapport nous indiquait que le principal secteur concerné par les produits de consommation nanotechnologiques était celui de la santé et des sports (vêtements, accessoires de sports, cosmétiques, soins personnels, crème solaire, ...) avec 59% des produits, suivi de l'électronique et de l'informatique qui en rassemblaient 14% (audio et vidéo; caméra et pellicules; matériel informatique; dispositifs mobiles et communication).

Un nouveau secteur prometteur est la nanomédecine - l'application médicale de la nanotechnologie et de la recherche apparentée. Elle couvre les domaines allant de l'administration de médicaments sous forme de nanoparticules jusqu'aux possibles applications futures de la nanotechnologie moléculaire. Dans le domaine des recouvrements avec des couches nanométriques des biomatériaux bioactifs un exemple de succès est le cas des implants de

hanche à base de polymère recouverts d'une couche mince d'hydroxyapatite (prothèse de Furlong®) (Chandran P et al., 2010).

1.2.3. PERSPECTIVES

Les cellules sont intrinsèquement sensibles à leur environnement. La réaction des cellules à la topographie (réaction au profil de la surface, ex. rainures, stries, puits ou aux autres textures) est bien établie à l'échelle micronique et a été récemment confirmée à l'échelle nanométrique (Stevens MM et al., 2005). Des études nombreuses ont démontré les effets sur le comportement cellulaire du changement de l'adhésion cellulaire par la modulation des voies de signalisation intracellulaire qui régulent l'activité transcriptionnelle et l'expression génétique (Curtis A et al., 1999). Une étude récente importante pour l'ingénierie tissulaire a comparé l'effet sur la différenciation cellulaire de structures nanométriques organisées de manière aléatoire versus des structures ordonnées. La différenciation des cellules HOP et la production du minéral osseux est favorisée lorsque les structures sont légèrement désorganisée à l'échelle nanométrique (Dalby MJ et al., 2007). Les renforcements de matériaux par des nanophases (comme HA + nanocomposants de collagène ou polymères + nanotubes de carbone) apportent des améliorations en terme de bioactivité et de propriétés mécaniques en modes flexion et compression (Webster TJ et al., 2007 ; Huang J et al., 2005).

D'autre part, la relation entre la topographie à l'échelle nanométrique, l'adhésion des protéines et le comportement des cellules est complexe. Les mécanismes sous-jacents restent encore à élucider en considérant que les variations dépendent de la forme et dimension des nanostructures ainsi que du type de protéine ou de cellule. Le design des matériaux n'a pas encore intégré le spectre entier d'échelles connues pour influencer le comportement cellulaire (de 10nm à 100µm).

L'adsorption des protéines est très importante pour un spectre large d'applications notamment dans le domaine des bio-nanotechnologies. L'immobilisation des protéines et la conservation de leur activité après l'immobilisation présente un grand potentiel dans le domaine des surfaces

fonctionnelles utilisables comme biocapteurs ou dans le développement des matériaux biocompatibles. Cependant, les interactions entre les protéines et les surfaces ne sont pas complètement élucidées. Une compréhension approfondie des interfaces protéines/surfaces solides ainsi qu'une maîtrise des conformations et orientations des différentes espèces pourraient permettre de générer des surfaces ajustables en fonction des applications.

La possibilité d'améliorer les interactions entre les cellules et le biomatériau par modification de l'HA (qui est reconnu comme un biomatériau très absorbant) avec des peptides RGD a été étudiée (Sawyer AA et al., 2005). En utilisant des cellules humaines ostéoprogénitrices, il a été montré que les motifs RGD seuls ne sont pas suffisants pour promouvoir l'étalement des cellules. Considérant que l'HA modifiée avec le RGD est un milieu très absorbant *in vivo* pour les protéines du sérum, le comportement des cellules HOP a été évaluée sur l'HA modifiée avec le RGD et recouverte avec du sérum (RGD/FBS). De manière très intéressante, les couches RGD/FBS ont stimulé, pour des concentrations réduites de RGD, l'attachement et l'étalement des HOP par rapport aux structures HA/RGD. Par contre, pour des concentrations élevées de RGD l'attachement des cellules a été limité et leur étalement a même été empêché sur les surfaces recouvertes avec RGD/FBS.

Le peptide RGD sur HA a présenté aussi un effet négatif *in vivo* pour des applications potentielles en implantologie (Hennessy KM, 2008). Ces résultats suggèrent donc que, pour les matériaux qui présentent une interaction forte avec le milieu tissulaire (comme l'HA), l'addition RGD est défavorable par rapport au processus endogène (l'adsorption des protéines).

Dans d'autres études, des implants de titane ont été greffé avec des polymères non-adhésifs basés sur l'oligo(ethylene-glycol) et fonctionnalisés par des ligands spécifiques pour les récepteurs intégriniques avec une densité contrôlée. Les biomatériaux qui présentent les fragments FNIII₇₋₁₀ de la fibronectine, spécifique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, ont montré une différenciation ostéoblastique des cellules ostéoprogénitrices augmentée par rapport aux surfaces de titane ou à des surfaces avec motifs RGD. Ainsi, la fonctionnalisation des surfaces de titane par des fragments FNIII₇₋₁₀ a permis d'améliorer l'ostéointégration des implants *in vivo* par rapport à d'autres structures.

Deux autres types de surfaces ont été comparés dans une étude récente. Le premier a impliqué des dépôts à l'échelle nanométriques de couches biocompatibles de titane sur du silicium tandis que le deuxième a exploré l'attachement covalent de peptides RGD pour améliorer l'adhésion cellulaire (Milburn C et al., 2009). Les deux surfaces ont démontré une amélioration de la biocompatibilité. Les cellules sont bien étalées et l'adhésion a été étudiée à court et long terme. La fonctionnalisation RGD de surface a présenté un meilleur résultat dans l'adhésion et l'étalement des cellules à court terme. Par contre, l'effet des couches nanométriques de titane a été mis en évidence à plus long terme, après 48 heures de culture cellulaire.

Les interactions entre les protéines et les surfaces ont été examinées sous l'angle de l'effet de la topographie (nano-courbures) en considérant ou non les effets chimiques (Roach P et al., 2006). Des sphères de silice de diamètres 15-165 nm avec des surfaces hydrophiles ou hydrophobes ont été utilisées comme substrats modèles. Les deux protéines choisies ont été l'Albumine Sérique Bovine (ASB) et le fibrinogène. Les tendances en termes d'affinité de liaison et de valeurs de saturation des deux protéines sont similaires pour tous les diamètres. Cependant, sur les courbures de grand diamètre, la structure conformationnelle de l'ASB (une protéine globulaire) adsorbée apparaît moins ordonnée et stabilisée tandis que le fibrinogène (bacilliforme) perd sa structure secondaire. Ces effets sont augmentés par la chimie de la surface puisque les deux protéines sont dénaturées par les surfaces hydrophobes.

Il apparaît donc que les stratégies de bio-fonctionnalisation vont continuer de représenter un centre d'intérêt majeur dans les recherches futures notamment par l'intégration et le contrôle des caractéristiques aux échelles micro- et nano- dans les nouveaux scaffolds modèles.

1.3. LES METHODES DE SYNTHÈSE DES NANOMATERIAUX

Les premières méthodes pour fabriquer des couches minces (nanométriques) des matériaux inorganiques étaient basées sur la voie humide : une réaction chimique entre une solution et le substrat. Les revêtements *PVD (dépôt physique en phase vapeur)* sont des dépôts sous vide où les couches sont formées par la condensation d'une matière préalablement évaporée. Cette évaporation du matériau source est d'origine thermique, due à un bombardement d'électrons. Grâce à cette méthode, on peut déposer des métaux, des alliages ou des céramiques. Les

revêtements *CVD (dépôts chimique en phase vapeur)* sont aussi des dépôts sous vide où les couches sont formées par la condensation de gaz qui réagissent ou se décomposent à la surface du substrat. Il y a aussi le *dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (PECVD - Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition)* un procédé utilisé pour déposer des couches minces sur un substrat à partir d'un état gazeux (vapeur). Ici, les réactions chimiques se déroulent au cours du processus après la formation d'un plasma à partir des gaz du réacteur. Le plasma est généralement créé à partir de ce gaz par radio-fréquences ou par une décharge électrique entre deux électrodes (Dobkin and Zuraw, 2003).

L'épitation par jets moléculaires (ou MBE pour Molecular Beam Epitaxy) consiste à envoyer un ou plusieurs jets moléculaires vers un substrat choisi pour réaliser une croissance épitaxiale. Elle permet de faire croître des échantillons nanostructurés de plusieurs cm^2 à une vitesse d'environ une monocouche atomique par seconde. L'avantage de cette croissance lente est donc de pouvoir obtenir des hétérojonctions nettes dans le cadre de matériaux multicouches. Une croissance lente permet aussi de contrôler un dopage homogène du matériau. Un autre avantage important est la possibilité de mesures en temps réel effectuées pendant les croissances. Cependant, une faible vitesse de croissance implique une atmosphère très pure sans quoi les impuretés viendraient contaminer l'échantillon de manière non négligeable. Pour cela il convient d'utiliser plusieurs systèmes de pompage afin de se trouver sous une pression résiduelle inférieure à 10^{-8} Pa (Arthur JR et al., 2002).

La pulvérisation cathodique (sputtering) est une technique qui autorise la synthèse de plusieurs matériaux à partir de la condensation d'une vapeur métallique issue d'une source solide (cible) sur un substrat. L'application d'une différence de potentiel entre la cible et les parois du réacteur au sein d'une atmosphère raréfiée permet la création d'un plasma froid, composé d'électrons, d'ions, de photons et de neutre dans un état fondamental ou excité. Un important avantage de la pulvérisation est que les films déposés ont la même composition que le matériau source. L'identité stœchiométrique entre le film et la cible pourrait surprendre du fait que le rendement de pulvérisation dépend de la masse atomique des atomes dans la cible. Cependant, comme seuls les atomes à la surface de la cible peuvent être pulvérisés, l'éjection plus rapide d'un élément laisse la surface enrichie avec les autres, ce qui compense efficacement la différence entre les

vitesse de pulvérisation. Ceci contraste avec les techniques thermiques d'évaporation, où un composant de la source peut avoir une pression de vapeur plus élevée, il en résulte un film déposé avec une composition différente de la source. Le dépôt par pulvérisation présente un avantage important sur l'épithaxie par jet moléculaire à cause de sa vitesse. La vitesse plus élevée a pour conséquence l'incorporation inférieure d'impuretés parce que moins d'impuretés peuvent atteindre la surface du substrat dans le même temps. Les méthodes de pulvérisation peuvent en conséquence utiliser des gaz avec des concentrations d'impuretés bien plus élevées que la pression de vide pouvant être tolérée par les méthodes de MBE. Durant le dépôt par pulvérisation le substrat peut être bombardé par des ions à grande énergie et des atomes neutres. Les ions peuvent être déviés avec une polarisation du substrat et le bombardement peut être minimisé en pulvérisant loin de l'axe mais aux dépens de la vitesse de dépôt. Les substrats en plastique ne peuvent pas tolérer le bombardement et sont généralement traités par évaporation.

Le *procédé sol-gel* permet de fabriquer un polymère inorganique par des réactions chimiques simples et à une température proche de la température ambiante (20 à 150 °C). La synthèse est effectuée à partir d'alkoxydes de formule $M(OR)_n$ où M est un métal ou le silicium et R un groupement organique alkyle C_nH_{2n+1} .

La synthèse sol-gel conduit à l'élaboration à basse température de solides amorphes transparents et denses dans lesquels des espèces moléculaires organiques peuvent être introduites. La richesse des précurseurs sol-gel permet le développement de nouveaux matériaux hybrides organiques-inorganiques dont les propriétés optiques peuvent être contrôlées à volonté. En effet, suivant la nature des alkoxydes utilisés, il est aisé de maîtriser les interactions entre le réseau polymérique de la matrice sol-gel et le système moléculaire en fonction du domaine d'application du matériau. La relative simplicité du procédé, particulièrement pour obtenir des produits à composition très homogène ou des revêtements, rend cette technique attractive. Bien que le procédé sol-gel présente beaucoup d'avantages sur les procédés conventionnels, l'inconvénient majeur réside dans la grande teneur en groupes hydroxyles (OH) ainsi qu'en impuretés organiques qui sont indésirables pour certaines applications.

La méthode *d'enduction centrifugation (spin-coating)* consiste à centrifuger une solution déposée en excès sur une (petite) surface (Brinker C.J. et al., 1991). Cette technique a l'avantage d'être facilement mise en œuvre pour des investissements modérés. Elle donne de bons résultats sur les substrats plans de petites surfaces (quelques cm²). Afin d'obtenir une couche solide, on utilise généralement un composé dont le solvant est assez volatil, et qui donc s'évapore au moins partiellement pendant l'opération. La technique d'enduction centrifuge est particulièrement utilisée en microfabrication, afin de créer des couches d'une épaisseur inférieure à 10 nm (Schubert DW et al, 2003). Parmi les désavantages, on distingue la qualité pauvre des couches qui sont souvent non-uniformes ou non-homogènes.

La méthode de *trempage – tirage (dip-coating)* consiste simplement à immerger le substrat dans la solution contenant le « sol » et à le retirer dans des conditions très contrôlées et stables pour obtenir un film d'épaisseur régulière. Lors de la remontée, le liquide va s'écouler sur le substrat. À la fin de l'écoulement, le substrat est recouvert d'un film uniforme et poreux. Cette technique est utile pour recouvrir des substrats plans mais aussi des cylindres (Scriven LE et al., 1988).

Le procédé *aérosol-gel (spray-coating)* consiste à générer un brouillard de solution et à l'amener jusqu'au support où il se dépose. Cette technique est intéressante pour recouvrir des objets de géométrie complexe. Cependant son utilisation est plus difficile à mettre en œuvre pour des grandes surfaces. Pour cette raison, une variante consiste à simplement utiliser un pistolet de peinture (aérographe) pour le dépôt du coating. Les conditions d'utilisation sont, dans ce cas, proches d'une cabine de peinture pour les carrosseries. Le principal inconvénient de cette technique est la perte d'une partie de la solution.

Cette liste des méthodes n'est pas exhaustive.

La nouveauté dans le domaine est représentée à présent par les études récentes faites sur des procédés hybrides de dépôts de couches minces de structures multicouches ou de couches nanocomposites pour des applications nouvelles en vue d'obtenir des performances améliorées. La pulvérisation cathodique a déjà été combinée aux dépôts par arcs cathodiques pour obtenir des couches minces avec des propriétés tribologiques améliorées. Le dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma est associé à la pulvérisation cathodique, la pulvérisation à

l'évaporation par faisceau électron ou l'évaporation flash des polymères à la PVD, etc (Martin PM., 2010).

Les techniques énumérées ci-dessus qui n'impliquent pas de phénomène thermique (spin-coating, dip-coating, sol-gel,) sont utilisées à présent pour obtenir aussi des couches minces de matériaux organiques comme les polymères ou les protéines. Cependant, d'autres se développent rapidement : le *porogen leaching* (Ma PX et al, 2001) ou *gas foaming* (Ma PX et al, 2001), *phase separation* (Zhao F, 2002; Liu XH et al., 2004), *fiber meshing* (Vacanti JP, Robert RS, 1998), *supercritical fluid processing* (Ginty PJ, 2006), ou le *3D printing* (Sherwood JK et al., 2002).

Dans le cas particulier des protéines, deux techniques complémentaires représentent les méthodes les plus utilisées pour leur immobilisation sur des supports solides. Ils s'agit des dépôts électrostatiques couche-par-couche (electrostatic layer-by-layer LbL) (Decher G et al, 1992 ; Yang W et al., 2001) et Langmuir-Blodgett (LB) (Blodgett KB, 1934). Dans le cas du LbL on utilise des couches alternées de matériaux solubles dans l'eau avec des charges positives et négatives respectivement tandis que le LB est employé pour la préparation de couches minces sur des supports solides par le transfert de couches insolubles dans l'eau à l'interface air/eau. A présent, beaucoup d'autres techniques d'immobilisation sont appliquées en vue d'augmenter l'adhésion des couches sur les substrats. La fonctionnalisation de surfaces (Wu Z et al., 2009), les interactions biologiques complexes par exemple entre avidine et biotine (Vareiro MMLM et al., 2008), l'utilisation des protéines A ou G comme agents de liaison entre, par exemple, des SAMs (Self-assembled monolayers) et d'autres matériaux (Briand E et al., 2009; Ha TH et al., 2007), les interactions chimiques par activation à la glutaraldehyde ou le 1,4-Phénylene diisothiocyanate (PDITC) (Betancor L et al., 2006 ; Raj J et al., 2009 ; Weiping Q et al., 1999) et les méthodes d'adsorption physique (Dreesen L et al., 2004) ont été testées pour trouver un compromis et optimiser l'immobilisation de matériau organique sur des supports différents.

Une approche très utilisée afin d'améliorer la réponse du corps à un implant est le recouvrement des métaux (le plus souvent, le titane) par des couches minces de phosphates de calcium à cause de leur similarité chimique avec la partie minérale de l'os.

La technique utilisée commercialement avec grand succès pour des dépôts de céramiques CaP à l'échelle nano ou micro est la torche à plasma. Les avantages majeurs de cette technique sont représentés par l'efficacité du dépôt ainsi que par la flexibilité qu'elle présente pour recouvrir des grandes surfaces. Bien que l'ostéoconductivité et le comportement de liaison à l'os des couches obtenues par cette technique aient été confirmés par de nombreuses études (Dhert WJA, 1994 ; Lacefield WR, 1998, 1999 ; Geesink RGT, 2002), il existe encore des soucis relatifs à cette technique. Les couches induisent souvent des contraintes résiduelles à l'interface métal/céramique, en même temps que des non-uniformités structurales et une mauvaise adhérence, des facteurs qui sont à l'origine de la délamination du dépôt céramique. Cette décohésion est souvent à l'origine de problèmes de descellement de l'implant nécessitant son retrait. Ainsi, les dépôts doivent présenter des épaisseurs d'environ 50 μm pour essayer de limiter ces désavantages. Cependant, des changements indésirables en terme de phase de CaP (phosphate tétracalcique, oxyde de calcium, phosphate α -tricalcique) apparaissent due aux grandes températures utilisées. Il y a aussi des problèmes liés au contrôle de l'épaisseur et de la morphologie ainsi que des libérations de particules à partir des couches qui pourraient initier l'inflammation autour des tissus.

Pour limiter ces problèmes, plusieurs études ont été développées, inspirées dans les derniers 20 ans par l'apparition de méthodes alternatives de dépôt de couches CaP sur des surface de type implant. Parmi les plus utilisées sont: la pulvérisation cathodique (Yang Y et al., 2005 ; Sima LE et al., 2010 ; Hao J et al., 2011), le dépôt électrophorétique (Ducheyne P et al. 1990 ; Boccaccini AR et al., 2010), la pression isostatique à la température (Hero H et al., 1994 ; Zhao J et al., 2006), le dépôt sol-gel (Yang C, 2002 ; Qu J et al., 2011), le dépôt biomimétique (Mihriyan A et al., 2009, Bracci B et al., 2009), le dépôt électrolytique (Lin DY et al., 2011), l'électro-spraying (Leeuwenburgh SC et al., 2006), le dépôt par ablation laser pulsé (Capuccini C et al., 2008 ; Bigi A et al., 2009, Sima F et al., 2011).

Un des problèmes majeurs rencontré lors de ces dépôts de couches minces est la difficulté à recouvrir des substrats de grande dimension tout en obtenant des dépôts mono- ou multicouches précis et reproductibles.

1.3.1. APPLICATIONS

Les implants tels que les lentilles oculaires, les prothèses articulaires de hanche, de genou, d'épaule ou encore de cheville trouvent un bénéfice véritable dans les revêtements minces. Par exemple, on distingue une rigidité supplémentaire des polymères, une activité antibactérienne, une augmentation de l'indice de réfraction, une protection UV dans le cas des prothèses ophtalmiques et surtout une résistance à l'usure et une diminution de la corrosion (Sheeja D. et al., 2001, Tiainen VM, 2001). Il est également possible d'utiliser les couches minces pour réduire la formation d'ions métalliques, à partir des implants métalliques, dans le corps humain. Ces espèces chimiques, principalement issues du nickel, sont, en effet, les allergènes de contact les plus répandus.

Des implants cardiovasculaires revêtus de DLC tels que les valves cardiaques artificielles ou les stents sont déjà disponibles commercialement (Hauert R., 2003).

Il devient donc très important de combiner les matériaux inorganiques – organiques mais aussi de trouver les méthodes de synthèse de couches minces à l'échelle nanométriques appropriées. Il est nécessaire d'avoir d'un part une méthode adéquate pour les dépôts de matériaux inorganiques ainsi qu'une autre technique pour l'immobilisation correcte et homogène du matériau organique.

1.4. BIOMATERIAUX ETUDIES DANS LA THESE

1.4.1. CERAMIQUES D'HYDROXYAPATITE

L'hydroxyapatite (HA) fait partie des apatites qui constituent le minéral phosphaté le plus abondant sur terre. L'HA est chimiquement similaire à la fraction minérale des os et des tissus durs. Il fait partie des matériaux classés comme bioactifs, ce qui signifie qu'il soutient la croissance osseuse et l'ostéo-intégration (sans se décomposer ou se dissoudre) dans des applications orthopédiques, dentaires et maxillo-faciales.

La nature chimique de l'hydroxyapatite est favorable à la substitution, ce qui signifie qu'il existe des hydroxyapatites non stoechiométriques. Les substitutions les plus courantes concernent le carbonate, le fluorure et le chlorure qui substitue des groupes hydroxyles, tandis que des défauts peuvent également exister résultant en une hydroxyapatite déficitaire.

Les apatites existent principalement sous la forme de fluoroapatite ou d'apatite carbonatée. Tous les phosphates de calcium évoluent en milieu naturel vers la forme apatitique la plus stable. Les apatites sont des minéraux de formule générale : $\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Y}_2$

où :

Me est un cation bivalent (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} , etc.)

XO_4 est un anion trivalent (PO_4^{3-} , SO_4^{3-} , VO_4^{3-} , etc.)

Y est un anion monovalent (Cl^- , OH^- ou F^-). On parle alors de chlorapatite, d'HAP ou de fluoroapatite.

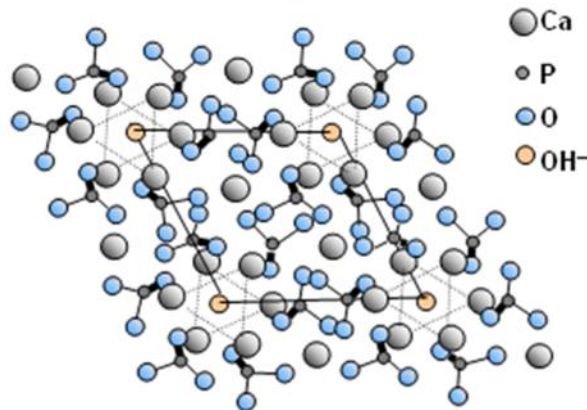


Figure 11 : Représentation de l'hydroxyapatite.

La cristallinité décrit l'organisation du cristal, qui est à la fois affectée par sa taille et sa pureté. Dans l'organisme, la formule de l'HA est très largement modulée par des substitutions ou des lacunes. Une substitution courante concerne le remplacement d'un ou plusieurs anions par des ions carbonates, conduisant à l'HA carbonatée. Il existe 2 types de substitutions par les

carbonates : 1) la substitution de type A, où les groupes OH⁻ sont substitués par des groupements CO₃²⁻, et 2) la substitution de type B, où les groupes PO₄³⁻ sont substitués par des groupements CO₃²⁻ (Penel et al., 1998). Dans l'os mature, environ 5 à 8 % du minéral est carbonaté et en majorité par de la substitution de type B (Antonakos et al., 2007). Ces substitutions induisent l'apparition de défauts et de distorsions dans l'arrangement atomique des cristaux. Dans l'HA de type A, le remplacement d'un ion monovalent par un ion divalent est compensé par l'apparition d'une lacune. Dans l'HA de type B, la substitution d'un groupe PO₄³⁻ par un groupe CO₃²⁻ cause principalement la création d'une lacune au niveau des Ca²⁺ et des OH⁻. Ces changements sont observés au niveau des spectres Raman réalisés sur le minéral osseux. La bande ν₃ du groupement PO₄ est la bande la plus affectée par la substitution de type B. L'intensité de cette bande augmente avec le taux de substitution (Penel et al., 1998) et la concentration en CO₃.

Structure cristallographique de l'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite appartient au groupe de symétrie du système hexagonal de groupe d'espace P6₃/m. Les paramètres de maille des cristaux sont $a = b = 9,432 \text{ \AA}$ et $c = 6,881 \text{ \AA}$. Les angles α et β sont égaux à 90° et γ (angle entre a et b) est égal à 120°.

La formule chimique Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ indique la maille élémentaire de l'HA. Les analyses par diffraction de rayons X et par diffraction de neutrons ont également déterminé les coordonnées des atomes dans la maille. L'apatite est essentiellement constituée d'un squelette formé d'ions phosphate (PO₄³⁻) disposés en deux couches par maille dans lesquelles ils constituent des arrangements hexagonaux. La disposition de ces couches de tétraèdres PO₄³⁻ est telle qu'il existe, perpendiculairement à elles, deux jeux de tunnels. Le premier coïncide avec l'axe ternaire de la structure. Ces tunnels sont occupés par les ions calcium notés Ca(I). Ils sont coordonnés par neuf atomes d'oxygène appartenant aux groupements PO₄³⁻. Le deuxième jeu, dont les axes coïncident avec les axes sénaires du réseau, est bordé par des atomes d'oxygène et des ions calcium notés Ca(II). Les axes sont occupés par les ions hydroxyle. Les ions calcium Ca(II) sont coordonnés par six atomes d'oxygène, des tétraèdres PO₄³⁻ et par un ion hydroxyle, soit une coordinance globale de 7 (Figure 12). Le diamètre de ces tunnels (0.3 nm) est supérieur au diamètre du premier jeu. Ils confèrent au réseau des apatites des propriétés d'échangeurs d'ions.

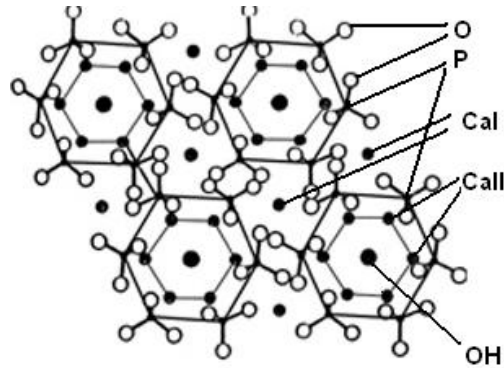


Figure 12 : Représentation schématique des quatre mailles hexagonales formées par les ions Ca(II). Les tunnels sont occupés par les ions Ca(I) et OH.

1.4.2. PROTEINES MULTIFONCTIONNELLES DES MATRICES EXTRACELLULAIRES

La fibronectine contribue à la fois à organiser la matrice et à favoriser l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire. La fibronectine, constituée de deux sous-unités α et β (poids moléculaire d'environ 230 kDa chacune) réunies par une paire de ponts disulfure, forme un réseau fibrillaire. Grâce à l'épissage alternatif de l'ARNm, le même gène est à l'origine de plusieurs sous-unités. La protéine est essentiellement une association de trois types de domaines (I, II, III) qui se répètent plusieurs fois. Les différents domaines se disposent en sites d'interactions spécifiques avec d'une part les constituants moléculaires de la matrice extracellulaire (formation d'une trame) et d'autre part les cellules (par l'intermédiaire des intégrines). Un site important pour la fixation des intégrines est la séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD), qui se situe dans le domaine FIII₁₀ (Figure 13).

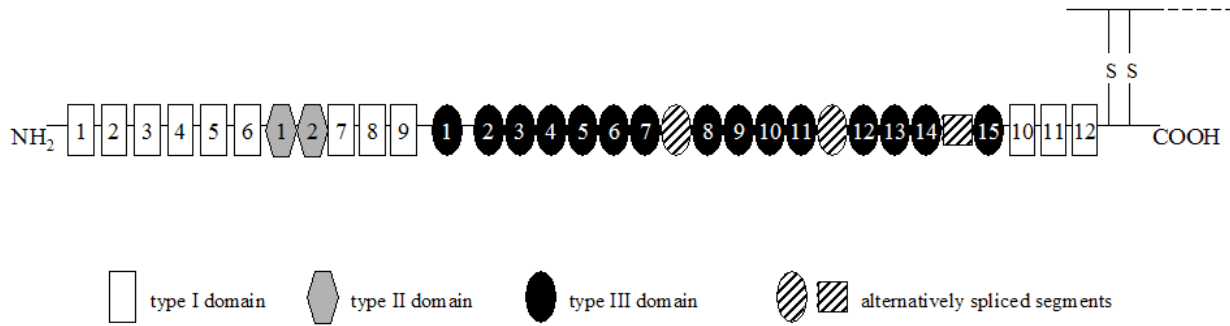


Figure 13: La fibronectine : structure modulaire.

La combinaison de modules de type I, II et III est représentée pour un seul des deux brins du dimère.

La protéine est libérée dans le milieu extracellulaire sous forme globulaire soluble. Le contact avec les intégrines linéarise la molécule, qui peut ainsi s'associer avec ses homologues et d'autres composants de la matrice extracellulaire. La fibronectine joue un rôle important dans le guidage des cellules lors des migrations embryonnaires chez les vertébrés (gastrulation et migration des cellules de la crête neurale). L'importance de la fibronectine est démontrée lors de la transgénèse expérimentale chez la souris: les embryons dépourvus du gène de la fibronectine ne dépassent pas le neuvième jour embryonnaire à cause d'un déficit dans le développement du mésoderme, du tube neural et des vaisseaux sanguins. Chez l'adulte, la fibronectine joue également un rôle central dans les processus de cicatrisation (Valenick LV et al., 2005).

La conformation de la fibronectine en solution n'a pas été encore déterminée. Les techniques de sédimentation, de diffusion de lumière, et de microscopies électronique et à force atomique ont fourni des ordres de grandeur des différentes formes de la protéine (Figure 14). Ainsi, la forme compacte aurait un rayon de 10 à 15nm tandis que celui de la forme étendue serait environ le double. La longueur de contour d'une chaîne de modules repliés est de l'ordre de 60-70nm, tandis qu'une chaîne polypeptidique dans laquelle les modules sont entièrement déroulés atteindrait 600nm.

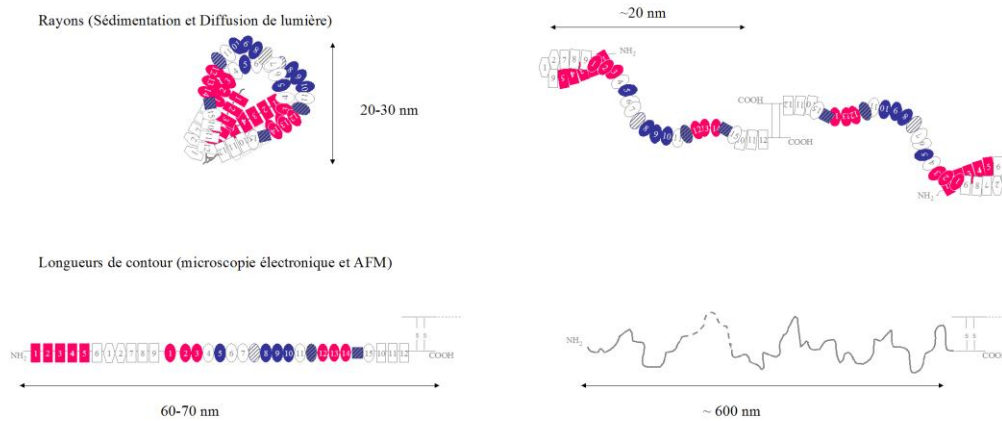


Figure 14 : Ordres de grandeur des dimensions de la fibronectine. Au-dessus, à gauche, conformation compacte de la fibronectine d'après (Johnson et al, 1999) et à droite la forme étendue de la fibronectine (Benecky et al, 1991). Les dimensions des conformations compactes et étendues sont calculées de manière approximative d'après (Benecky et al, 1991; Rocco et al, 1984; Erickson et Carrell, 1983; Williams et al, 1982; Koteliansky et al, 1981) ; les longueurs de contours d'un monomère d'après (Erickson et Carrell, 1983; Tooney et al, 1983; Erickson et al, 1981) et d'un monomère dans lequel les modules sont dépliés d'après (Oberdörfer et al, 2000).

Les valeurs données dans la figure 14 reflètent une moyenne des valeurs de la littérature, qui varient selon les auteurs et les techniques utilisées.

La vitronectine est une glycoprotéine de 75 kDa qui se trouve aussi dans les matrices extracellulaires. Elle est constituée de 459 acides aminés (Figure 15). Environ un tiers de sa masse moléculaire est composée par des hydrates carbonés. Elle est parfois clivée après l'arginine 379 pour produire une vitronectine en deux chaînes ou les deux parties sont liées par des ponts disulfures. La protéine est une association de trois types de domaines : i) un domaine N terminal Somatomedine B (1-39), ii) un domaine central avec une homologie hemopexine (protéine qui lie l'hème libre dérivé de l'hémoglobine en protégeant l'organisme du stress oxydatif) (131-342) et un domaine terminal C (347-459) qui contient aussi une homologie hemopexine. A l'exception du domaine N terminal, aucune structure à haute résolution n'a été élucidée. Deux groupes ont présenté dans la littérature des investigations spectroscopiques RMN

(information sur la structure et la dynamique des protéines) (Kamikubo Y et al., 2004; Mayasundari A et al., 2004). Elle stimule l'adhérence, la migration ou la prolifération de nombreuses cellules (Schvartz et al, 1999), et favorise notamment l'adhérence (Grzesik et Robey, 1994) et la différenciation (Salasznyk et al, 2004) des ostéoblastes. Reconnue par le récepteur principal des ostéoclastes, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Helfrich et al, 1992), elle pourrait également participer, avec l'ostéopontine, à leur ancrage à la matrice.

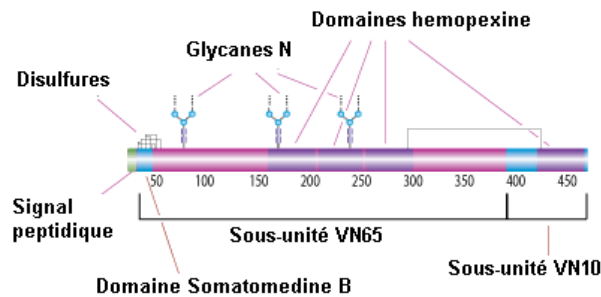


Figure 15: La vitronectine : structure modulaire.

1.5. METHODES DE SYNTHÈSE UTILISÉES DANS LA THÈSE

1.5.1. DÉPÔT LASER PULSÉ (PULSED LASER DEPOSITION - PLD)

La déposition par laser pulsée (Pulsed Laser Deposition – PLD) est une technique de synthèse de couches minces avec des avantages reconnus dans le cas du transfert de molécules compliquées. La méthode offre la souplesse de l'assemblage de couches minces sur une ample variété de morphologies, des surfaces lisses aux surfaces rugueuses et poreuses et en même temps permet le contrôle de la composition des matériaux de l'amorphe au cristallin (Zeng H et al., 2000). Un point fort du PLD est la conservation de la stoechiométrie complexe de phosphates de calcium après le transfert sur des supports (Mihailescu et al., 2010, Nelea V et al., 2007, Sima F et al., 2007).

A la base du PLD on découvre le processus d'*ablation laser*. L'ablation laser d'un matériau solide est le phénomène d'expulsion de matière d'une cible exposée à l'irradiation d'un faisceau laser intense. Il est un processus de non-équilibre thermodynamique basé sur l'absorption de l'énergie du faisceau par le matériau solide. Les phénomènes qui se développent d'interaction, expulsion, transfert et collection sont très complexes. Une représentation schématique du processus est proposée dans la Figure 16.

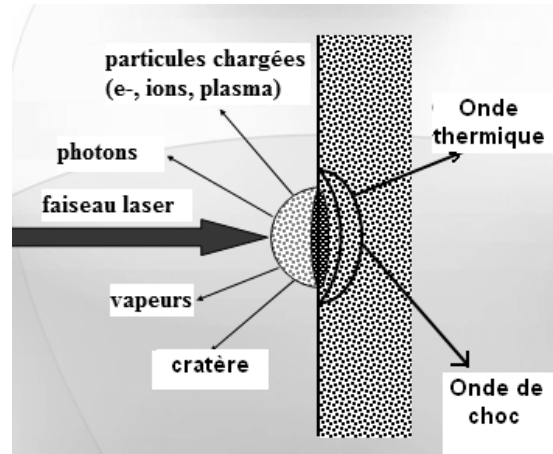


Figure 16 : Représentation schématique de l'ablation laser et de formation du plasma

En bref, une impulsion laser focalisée sur une petite aire de la cible (placée dans une chambre de réaction sous vide ou en atmosphère contrôlée) provoque la fusion et la vaporisation du matériau dans l'empreinte du faisceau. Indépendamment de l'angle de contact du faisceau dirigé sur la cible, un nuage gazeux dense de substance se forme perpendiculairement à la surface. Ce nuage s'appelle *plasma laser* et contient des photons, des électrons, des ions, des molécules, des clusters d'atomes et de molécules et des particules solides. Toutes les espèces dans le plasma sont collectées et assemblées sous forme d'une couche mince sur un substrat parallèle à la cible. Pour la description et la compréhension des phénomènes il est nécessaire de parcourir les étapes de 1) *propagation et absorption des ondes électromagnétiques (faisceau laser) dans le matériau solide*; 2) *formation et propagation du plasma laser* et 3) *formation et croissance de la couche mince sur le substrat*.

Propagation et absorption des ondes électromagnétiques dans le matériau solide

La propagation et l'absorption des ondes électromagnétiques dans un milieu sont décrites par les équations de Maxwell:

$$\begin{aligned} \nabla \times H - \frac{1}{c} \frac{\partial D}{\partial t} &= \frac{4\pi}{c} j & j &= \sigma E \\ \nabla \times E - \frac{1}{c} \frac{\partial B}{\partial t} &= 0 & D &= \epsilon E \\ \nabla D &= 4\pi \rho & B &= \mu H \\ \nabla B &= 0 \end{aligned} \quad (1) \quad (2)$$

En introduisant les substitutions, on obtient l'équation pour la composante électrique :

$$\nabla^2 E - \frac{\epsilon \mu}{c^2} \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} - \frac{4\pi \mu \sigma}{c^2} \frac{\partial E}{\partial t} = 0 \quad (3)$$

La conductivité électrique $\sigma = 0$ dans le cas des milieux diélectriques. Pour une radiation monochromatique :

$$\begin{aligned} H &= H_0 e^{-i\omega t} \\ E &= E_0 e^{-i\omega t} \end{aligned} \quad (4)$$

L'équation de propagation devient :

$$\nabla^2 E + \hat{k}^2 E = 0 \quad (5) \quad \hat{k}^2 = \frac{\omega^2 \mu}{c} \left(\epsilon - i \frac{4\pi \sigma}{\omega} \right) \quad (6)$$

où les termes complexes

$$\begin{aligned} \hat{\epsilon} &= \epsilon + i \frac{4\pi \sigma}{\omega} \\ \hat{n} &= \sqrt{\hat{\epsilon} \mu} = \frac{c}{\omega} \hat{k} \end{aligned} \quad (7)$$

$$\hat{\vartheta} = \frac{c}{\sqrt{\hat{\epsilon} \mu}}$$

sont la constante diélectrique (ϵ), l'indice de réfraction (n) et la vitesse de phase (v).

Explicitement :

$$n = n(1 + iK) = n_1 + in_2 \quad (8)$$

K s'appelle coefficient d'atténuation.

La solution de l'équation de propagation est une onde plane harmonique en fonction de temps :

$$E(r, t) = E_0 e^{i[\widehat{k}(r \cdot s) - \omega t]} \quad (9)$$

$$\widehat{k} = \frac{\omega \widehat{n}}{c}$$

où s est le vecteur de la vitesse de phase. On obtient ensuite la solution :

$$E = E_0 e^{-\frac{\omega}{c} n K (r \cdot s)} e^{i\omega [\frac{n}{c} (r \cdot s) - t]} \quad (10)$$

L'intensité de l'onde est proportionnelle à la moyenne temporelle du carré de la valeur instantanée de l'intensité du champ électrique, $I \sim \langle E^2 \rangle$. On a :

$$I = I_0 e^{-\alpha (r \cdot s)} \quad (11)$$

Pour la propagation sur la direction Oz :

$$I = I_0 e^{-\alpha z} \quad (12)$$

Dans le cas des céramiques (HA), l'absorption du rayonnement électromagnétique se fait pour des fréquences de résonance selon un des processus suivants : i) *des transitions interbandes* – les photons avec une énergie $h\nu$ supérieure à la largeur de la bande interdite E_g sont absorbés, ce qui provoque le saut des électrons de la bande de valence vers la bande de conduction, tandis que l'absorption des photons avec une énergie plus basse que E_g se fait avec une probabilité faible par des transitions multi-photoniques ; ii) *l'absorption phononique* – les photons avec une énergie $h\nu < E_g$ sont absorbés par les phonons optiques qui produisent le réchauffement du

réseau cristallin et iii) *la photo-excitation sélective* (pour les composés moléculaires) – l’absorption se fait pour les fréquences de résonance correspondant aux modes de vibration des molécules.

L’absorptivité des diélectriques est favorisée par la présence des impuretés et des défauts ponctuels qui introduisent des niveaux énergétiques dans la bande interdite.

Suite à l’irradiation d’un matériau par le faisceau laser ses propriétés optiques se modifient. Dans le cas des non-métaux, l’échauffement du réseau conduit à la production thermique de paires électron-trou et par conséquent à l’augmentation de la densité de porteurs libres et ensuite à l’augmentation de l’absorptivité du matériau. Quel que soit le matériau, l’irradiation laser à partir d’une densité de puissance de seuil conduit à la modification ou même à la destruction de la surface irradiée. Ce seuil dépend de plusieurs facteurs : i) *la fluence du faisceau laser, f* ($f = dW/dS$ – la densité superficielle d’énergie laser exprimée en J/cm^2) ; ii) *la nature du matériau-cible* (à cause des variations de l’absorptivité et de la température de fusion en fonction des matériaux) ou iii) *la rugosité de la surface irradiée* (l’absorption d’une surface rugueuse est amplifiée par des réflexions multiples au niveau du microrelief de la surface, ce qui a un effet de diminution du seuil de destruction).

Pour une densité de puissance laser incidente w_0 ($w = dW/dSdt$), l’atténuation du faisceau pénétrant la surface de la cible se fait selon la loi de Lambert-Beer :

$$w_A(z) = w_A e^{-\alpha z} = w_0(1-R) e^{-\alpha z} \quad (13)$$

ou w_A est la densité de puissance pénétrant la surface et $w_A(z)$ représente la partie absorbée à la profondeur z . Pour un modèle où l’énergie laser sur un élément d’épaisseur infinitésimale dz est transformée intégralement en chaleur, on a :

$$w_A(z) - w_A(z+dz) = \alpha w_A e^{-\alpha z} dz \quad (14)$$

d’où on peut observer que l’énergie optique absorbée par un élément dz décroît exponentiellement avec la profondeur.

Le bilan énergétique par unité de temps dt et par unité de surface dS au niveau de l'élément dz est exprimé par l'équation suivante :

$$\frac{mc_p dT}{dS dt} = \alpha w_A e^{-\alpha z} dz + [\phi(z) - \phi(z + dz)] \quad (15)$$

où c_p est la chaleur spécifique à pression constante du matériau et m la masse de l'élément dz et

$$\phi = -k_{th} \nabla T = -k_{th} \frac{\partial T}{\partial z} \quad (16)$$

Φ le flux de chaleur qui traverse l'élément dz , proportionnel et de sens opposé au gradient de température dans la cible. Le coefficient k_{th} représente la conductivité thermique.

Ainsi, une forme plus simple de l'équation 15 devient :

$$\rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} = \alpha w_A e^{-\alpha z} + \frac{\partial}{\partial z} \left(k_{th} \frac{\partial T}{\partial z} \right) \quad (17)$$

Pour un matériau homogène, $\nabla k_{th} = 0$. On note :

$$D = \frac{k_{th}}{\rho c_p} \quad (18)$$

D s'appelle la diffusivité thermique. L'équation de la diffusion de chaleur pour le cas tridimensionnel devient :

$$\nabla^2 T - \frac{1}{D} \frac{\partial T}{\partial t} = -\frac{1}{D} \frac{\alpha w_A(x, y, t)}{\rho c_p} e^{-\alpha z} \quad (19)$$

Dans le cas des faisceaux homogènes, la distribution de température est uniforme dans le plan $z = ct$. et pourrait se calculer à partir de l'équation 19 pour le cas unidimensionnel dans les conditions : i) l'épaisseur de la cible L et la taille de la surface irradiée (diamètre d_s) sont beaucoup plus grandes que la longueur de diffusion thermique

$$\delta_{th} = 2\sqrt{Dt}, \quad \frac{\partial T}{\partial z} = 0 \quad (20)$$

pour $z = 0$ au moment t .

et ii) le faisceau laser est absorbée dans une couche d'épaisseur $\delta_A \ll \delta_{th}$.

Un modèle pour le calcul de la distribution de la température dans une cible irradiée est présenté dans la figure suivante (Figure 17).

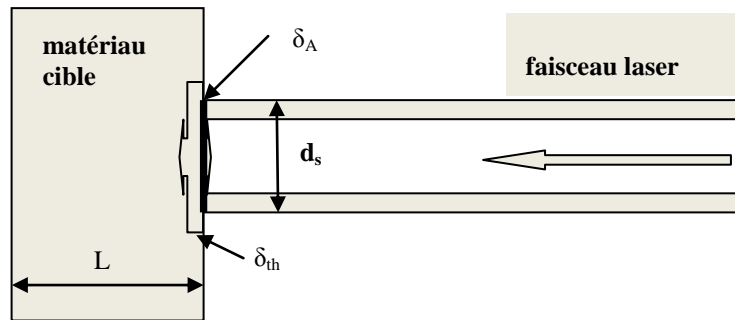


Figure 17 : Schéma pour le calcul de la distribution de température dans une cible solide irradiée par un faisceau laser

Formation et propagation du plasma laser

Si la densité de puissance laser est au dessus de la valeur de seuil, une certaine quantité de matière autour de l'empreinte du faisceau sur la surface est passée quasi instantanément dans l'état liquide et de vapeur. Le résultat de la matière vaporisée est la formation d'un plasma dense. L'émission thermoionique du plasma est décrite par les équations de Richardson et Langmuir-Saha.

A présent il existe plusieurs modèles sur la formation du plasma laser. Une des théories les plus utilisées a été élaborée par Singh et Narayan (Singh RK et Narayan J, 1990). Ils considèrent que pendant une impulsion laser, au voisinage immédiat de la cible il s'établit un régime isotherme à

la suite de l'équilibre dynamique entre l'absorption du plasma – caractérisé par le coefficient α_p et la transformation de l'énergie thermique en énergie cinétique – l'expansion du plasma, où

$$\alpha_p = 3,69 \times 10^8 \left(\frac{Z^3 n_i^2}{T^{0,5} g^3} \right) \left[1 - e^{-\frac{h\nu}{kT}} \right] \quad (21)$$

où Z , n_i et T sont respectivement la charge ionique moyenne, la densité ionique et la température du plasma.

L'alimentation en énergie du plasma est assurée d'une part par le faisceau laser et d'autre part par les particules provenant de la cible. Ainsi, les températures typiques dans le plasma atteignent 10^4 K (Bauerle, D, 1995). Pendant l'expansion isotherme, une vitesse maximale des particules est enregistrée aux extrémités du plasma (où la densité des particules tend vers zéro). L'expansion du plasma est fortement anisotrope orientée généralement selon la direction Oz. Suite à une expansion rapide (10^5 - 10^6 cm/s), la densité des porteurs de charge diminue rapidement avec la distance ainsi que le plasma devient transparent aux extrémités. Une seule région localisée du plasma qui est au voisinage de la cible (10-2-10-1 mm) est très absorbante pendant l'impulsion laser. Dans la Figure 18 est présentée la structure en régions du matériau cible sous l'action laser. Il y a quatre régions distinctes : I. la région A qui n'est pas affectée et dans laquelle la cible reste à l'état solide ; II. la région B qui représente le matériau en fusion ; III. la région localisée C composée par le plasma, dense et absorbante (région appelée aussi couche Knudsen) et IV. la région D (peu absorbante) composée d'un plasma raréfié.

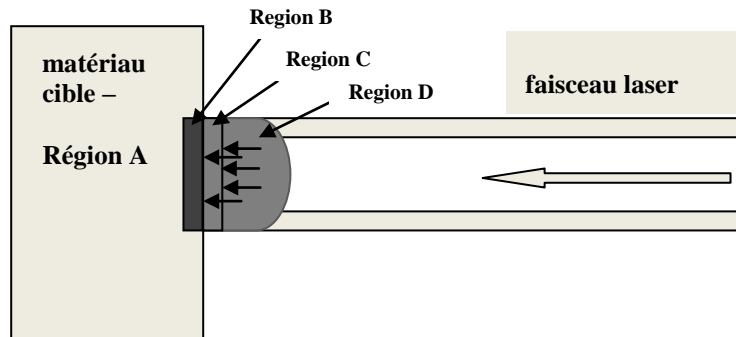


Figure 18 : Schéma de la structure en régions du matériau sous l'action d'une impulsion laser. A. région en état solide ; B. région fondue ; C. la couche Knudsen et D. le plasma raréfié en expansion. Les régions A et B composent la cible tandis que les régions C et D forment le plasma.

Suite à l'arrêt de l'impulsion laser ($t > \tau$), l'évaporation du matériau et l'alimentation du plasma cessent. Ainsi, le plasma développe une expansion rapide en régime adiabatique décrit par l'équation thermodynamique :

$$T[X(t)Y(t)Z(t)]^{\gamma-1} = ct \quad (22)$$

où γ représente le coefficient adiabatique.

L'effet de l'expansion anisotrope d'un plasma se voit sur les couches minces obtenues sur un collecteur placé devant la cible. En général, les couches déposées par ablation laser se disposent en contours concentriques correspondant aux régions d'égale épaisseur sur la couche (Figure 19).

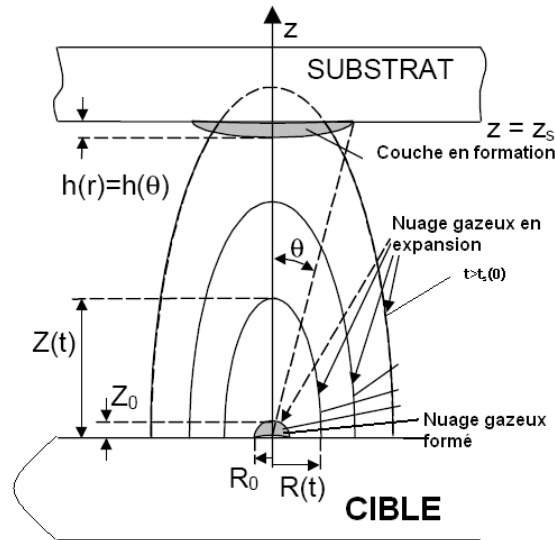


Figure 19 : Schéma de l'expansion de plasma et formation de couches minces. t_0 est le temps initial de formation du plasma, Z_0 la longueur initiale de plasma, R_0 – le rayon de plasma qui coïncide avec celui du spot laser, $h(r,t) = h(\theta,t)$ le profil de la couche, r et θ sont respectivement la coordonnée et l'angle radial où $\theta = \arctan(r/z_s)$ (Anisimov SI et al., 1993)

Formation et croissance de la couche mince sur le substrat

Les particularités des couches minces formées sur les supports placés devant le plasma et parallèle à la cible sont influencées par les paramètres des dépôts tels que la fluence laser, la pression dans la chambre de réaction, la distance cible-substrat ou la température du substrat.

L'épaisseur de la couche déposée présente un maximum au centre (la normale à l'empreinte du faisceau laser sur la cible) et diminue vers les bords selon une gaussienne en fonction de l'énergie du faisceau laser, de la taille du spot et la distance cible-collecteur. Une simulation présentée par Singh et al. (1990) montre que l'épaisseur maximale au centre du dépôt augmente avec la température du plasma (c'est-à-dire avec l'énergie du faisceau laser). La gaussienne devient en même temps plus abrupte et plus étroite (Figure 20).

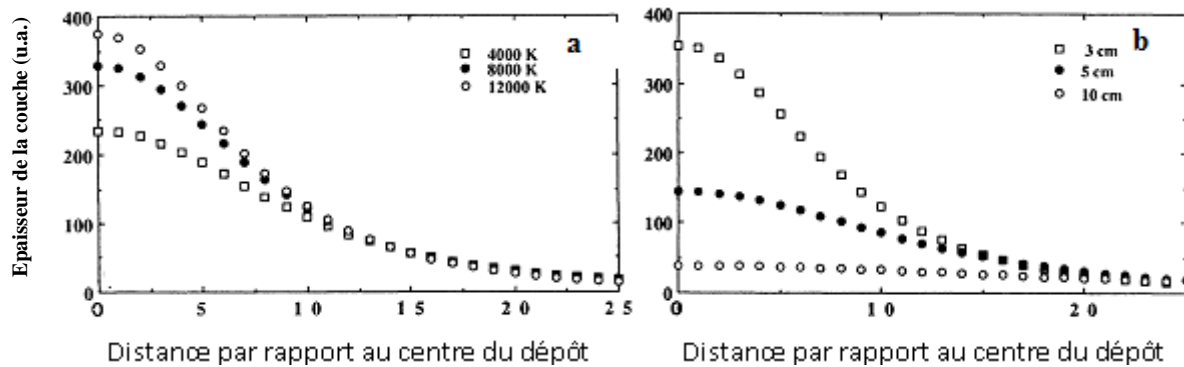


Figure 20: Distribution de l'épaisseur de la couche mince vs (a) la température du plasma et (b) la distance cible-collecteur (reproduite après Singh et al., 1990)

La distribution de l'épaisseur est influencée aussi par la distance cible-substrat. L'épaisseur au centre décroît avec l'augmentation de la distance tandis que la gaussienne s'élargit. La couche devient ainsi plus uniforme en épaisseur. Une étude est montrée dans la Figure 20. La loi qui présente la dépendance de la distance d (entre la cible et collecteur) et l'épaisseur est du type d^{-p} , ou p est un coefficient qui caractérise la nature de l'expansion du plasma (par ex. $p=3$ pour une expansion 3D et $p=1$ pour 1D). Expérimentalement, on a trouvé que la valeur du coefficient p dépend de la taille du spot laser – pour un spot de grande taille, l'expansion du plasma tend à avoir un aspect unidimensionnel tandis que sa diminution implique une expansion plus sphérique confirmant l'anisotropie du plasma.

Les modifications de composition des couches minces obtenues par PLD se maintiennent dans un intervalle étroit, ce qui permet de trouver les paramètres expérimentaux optimaux pour les éliminer ou les diminuer à des valeurs acceptables. L'ablation laser reste ainsi une des méthodes les plus utilisées pour obtenir des couches minces avec des stœchiométries complexes à partir d'une cible solide comme source de matériau.

Comme cas concret d'interaction du faisceau laser avec une cible d'HA, nous présentons une étude du traitement par ablation d'un échantillon d'HA fritté avec un laser à excimère réalisée sous air à une pression de 1 atmosphère (Nakata K et al., 2007). Trois longueurs d'ondes (ArF -

193 nm, KrF - 248 nm et XeF – 351 nm) ont été utilisées pour l'investigation de l'effet de la longueur d'onde sur l'efficacité de l'ablation et la morphologie de l'aire d'ablation. Une ablation photochimique a été mise en évidence quand on utilise les lasers ArF et KrF où on obtient des formes de fonds plats dans la cavité ablatée avec des bords bien définis. Au contraire, une ablation thermique s'obtient dans le cas du laser XeF à cause de la longueur d'onde plus longue ainsi qu'une cavité très rugueuse. Les valeurs de seuil pour les trois longueurs d'ondes se trouvaient à 0.8, 1.5 et 6 J/cm² pour ArF, KrF et XeF, respectivement. On note qu'une surface de la cible compacte et plate est nécessaire pour une ablation correcte et contrôlable en vue d'obtenir des couches minces bien homogènes, uniformes et reproductibles.

L'analyse du plasma après l'ablation d'une cible d'HA après l'irradiation laser à quatre fluences différentes (1, 1.5, 2.6 and 3.5 J/cm²) a été effectuée par imagerie CCD intensifiée et spectroscopie optique d'émission (Serra P, 1998). Les images enregistrées dans les quatre cas ont montré la présence des deux composantes (fronts) émissives séparées dans le plasma après un retard d'une ms derrière l'impulsion laser. L'intensité de l'émission relative entre les deux composantes dépend fortement de la magnitude de fluence et ensuite des vitesses d'expansion. Les spectres enregistrés ont relevé aux fluences réduites des espèces moléculaires prédominantes par rapport aux espèces atomiques. Par contre, aux fluences plus élevées, les espèces atomiques deviennent prépondérantes. Aussi, les composants du premier front de plasma sont en majorité des atomes tandis que des radicaux moléculaires excités forment le deuxième front.

Récemment, une amélioration de la méthode PLD pour les dépôts de couches minces d'HA sur titane a été proposée (Katayama H et al., 2009). La nouvelle méthode s'appelle ablation laser assistée par laser (LALA – laser-assisted laser ablation). Dans ces études, deux faisceaux laser sont utilisés, un pour l'ablation de la cible HA et l'autre pour l'irradiation du substrat Ti pendant la croissance de la couche. L'assistance du deuxième laser a permis l'amélioration de la couche qui est devenue plus cristalline et plus adhérente. Cependant, la qualité des couches obtenues varie avec le temps d'irradiation. Dans ces études, des couches minces d'environ 1 µm ont été synthétisées.

Des travaux de l'équipe LSPI de Bucarest sur les méthodes de dépôt par ablation laser (PLD) ont montré que cette technique permettait de réaliser des couches d'hydroxyapatite sur du titane avec une diminution des contraintes résiduelles dans la couche de céramique (Nelea et al., 2007). D'autre part, il a été démontré par de nombreux auteurs que l'on pouvait favoriser l'adhérence cellulaire et la régénération osseuse sur des implants en modifiant leur topographie et leur chimie de surface mais également via l'adsorption ou le greffage de molécules matricielles.

On voit l'intérêt assez important du PLD pour des dépôts de couches minces d'HA. Quoique la méthode se soit bien développée, les nouveaux lasers, plus stables en énergie pour chaque impulsion ou d'autres adaptations nous fournissent constamment d'autres possibilités d'amélioration.

1.5.2. EVAPORATION PAR LASER PULSE ASSISTEE PAR UNE MATRICE (MATRIX ASSISTED PULSED LASER EVAPORATION - MAPLE)

Il n'est pas étonnant que les couches minces de matériaux organiques ou polymères présentent au moins un degré de décomposition irréversible après l'ablation par un laser UV. Les causes photochimiques et photo-thermiques de la décomposition des polymères après l'ablation ont été étudiées. Suite à l'absorption d'une impulsion laser UV, la molécule organique est i) excitée vers un état électronique de haute énergie qui peut résulter en une dissociation des liaisons chimiques (la décomposition photochimique) ou ii) détruite dans les vibrations du réseau par une chaleur considérable cédée par les molécules alentours (la décomposition photo-thermique). La décomposition photochimique est tout à fait probable dans le procédé PLD à cause de l'énergie des photons UV qui est plus élevée que l'énergie des liaisons chimiques dans la plupart des matériaux organiques. Les décompositions sont tout de même déterminées par la structure chimique de la molécule organique. C'est pourquoi il est très difficile de contrôler les produits obtenus après l'interaction de la radiation laser UV et d'une molécule organique.

Pour un groupe réduit de polymères comme le poly(tetrafluoroéthylène) (PTFE) et le PMMA la radiation UV absorbée cause une simple dépolymérisation photo-thermique qui est réversible (Blanchet, G. B. (1993a), Appl. Phys. Lett. 62, 479, Blanchet, G. B., and C. R. Fincher (1994), J.

Adv. Mater. 6, 881). Plus souvent on trouve que l'interaction des photons UV avec les molécules organiques conduit à la perte totale ou à la décomposition des groupes fonctionnels par photothermalisation ou que la photochimie est responsable de la modification substantielle du matériau de base (Chrisey DB et al., 2003, Pique A, 2007).

L'Evaporation Laser Pulsée Assistée par une Matrice (Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation – MAPLE) a été développée comme une variation de PLD et introduite (A. Pique et al., 1999) pour déposer des matériaux organiques/polymériques avec une décomposition thermique ou chimique minimale. Dans ce processus, les biopolymères (biomolécules) sont dissous dans un solvant qui absorbe dans l'état gelé, au contraire de l'irradiation laser directe du matériau solide (Rodrigo K et al, 2005 ; Bubb DM et al., 2004). Ainsi, l'interaction violente des photons avec le matériau actif est réduite parce que l'énergie du laser est aussi absorbée par la matrice cryogénique. Il y a une similarité du MAPLE avec le MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) (Karas M et al., 1988 ; Tanaka K et al., 1988), une méthode de caractérisation spectroscopique de la masse moléculaire des polymères. Cependant, les matrices utilisées en MALDI sont complexes du point de vue chimique et n'offrent pas d'intérêt pour les applications de dépôts.

Dans le MAPLE, le solvant et la concentration en solution sont sélectionnés afin que le biomatériau d'intérêt (polymère ou protéine) soit complètement dissous pour former une solution sans particules (impuretés) afin que la majorité de l'énergie du faisceau soit absorbée initialement par les molécules du solvant et non pas par les molécules du biomatériau. Un schéma illustrant le processus a été proposé par Pique A (Figure 21).

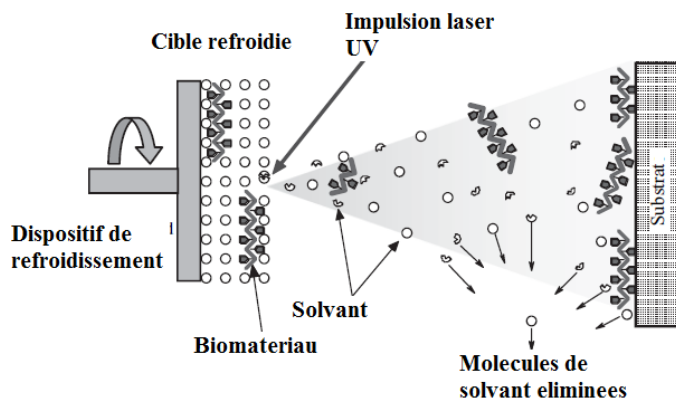


Figure 21 : Schéma du processus MAPLE. Image reproduite d'après Pique A, 2007.

Comme dans le processus PLD conventionnel, les deux molécules, du solvant et du biomatériau, quittent la cible après l'irradiation laser sur une direction normale à la surface. La cible contient habituellement 1-5 wt % du biomatériau déposé. Ainsi, il est entouré et protégé par une large quantité de solvant ou matrice. Cette configuration réduit la détérioration thermique mais aussi photonique du biomatériau en solution pendant la volatilisation laser. Au contraire, les molécules de la matrice (solvant) absorbent la radiation laser et quittent rapidement la surface (évaporation). Idéalement, les molécules de biomatériau sont entraînées dans la plume d'évaporation des molécules de la matrice et, par collision avec celles-ci, délogent la cible refroidie. Ensuite, après le transfert, les molécules du biomatériau sont déposées sur un collecteur (substrat) qui est placé parallèlement à la cible. L'efficacité de la déposition dépend de manière inverse et proportionnelle au carré de la distance cible-collecteur. Par optimisation des conditions des dépôts MAPLE, le processus pourrait permettre le transfert de biomatériau sans décomposition significative.

Cependant, dès l'apparition du MAPLE, des simulations de dynamique moléculaire sur l'ablation laser des matrices cryogéniques ont démontré que les résultats de l'excitation laser sont des clusters de biomolécules entourées par des molécules de la matrice solvant expulsées ensemble (Itina et al., 2001). Ces cas sont plus fréquents quand le solvant est inerte ou n'absorbe pas en majorité à la longueur d'onde laser utilisée. Dans ces cas et, en particulier pour les lasers à impulsions nanosecondes, un modèle de vaporisation explosive a été proposé (Kokkinaki O. et al., 2007).

Au cours d'une vaporisation explosive, on considère que les liquides sont chauffés au dessus de la température qui correspond à la pression extérieure d'équilibre (l'état thermodynamique métastable) (Kokkinaki O. et al., 2007). Dans cet état, le potentiel chimique, μ_L , est plus élevé que le potentiel des vapeurs, μ_V . (Kelly, R et al, 1999 ; Debenedetti P et al, 1996 ; Martynyuk M., 1974). Cependant, la transformation (vaporisation) demande la génération de bulles qui est limitée par le travail nécessaire pour la formation d'une nouvelle interface dans le liquide (i.e., la tension de surface σ) (Debenedetti P et al, 1996). Ainsi, l'énergie libre pour la formation d'une bulle s'écrit :

$$\Delta G = 4\pi R^2 \sigma - \frac{4}{3} \pi R^3 (P_V - P_L) + \frac{4}{3} \pi R^3 \frac{P_V}{k_B T} (\mu_V - \mu_L) \quad (23)$$

où R représente le rayon de la bulle, σ la tension de surface, k_B la constante Boltzmann, T la température de saturation du liquide et P_V , P_L sont la pression dans l'intérieur de la bulle et la pression extérieure du liquide respectivement. Dans l'équation au dessus, le premier terme représente l'énergie nécessaire pour la formation de l'interface liquide-vapeur, le deuxième le travail dirigé contre les forces des pressions et le troisième la force d'entraînement pour la formation de la bulle. Pour un rayon R petit, le terme surface s'impose ainsi que $\Delta G > 0$; pour un rayon R suffisamment large, $\Delta G < 0$, nécessaire pour conduire au développement de la bulle. Le rayon pour cette conversion est déterminé par la condition de l'équilibre « mécanique » de la bulle.

$$(P_V - P_L = \frac{2\sigma}{R}) \quad (24)$$

et par l'équilibre « thermodynamique »

$$\mu_L(P_L) = \mu_V(P_{sat}) \quad (25)$$

où P_{SAT} est la pression de saturation de la phase liquide. Ce rayon est donné comme rayon « critique » et pour ce cas

$$\Delta G_{cr} = \frac{16\pi\sigma^3}{3(P_V - P_L)^2} \quad (26)$$

Ainsi, le taux auquel des bulles homogènes aux dimensions critiques sont générées (J_{cr}) est décrit par :

$$J_{cr} = J_0 \exp\left(-\frac{\Delta G_{cr}}{k_B T}\right) = J_0 \exp\left(-\frac{16\pi\sigma^3}{3k_B T (P_V - P_L)^2}\right) \quad (27)$$

où

$$J_0 = N_L \left(\frac{3\sigma}{\pi m} \right)^{1/2} \quad (28)$$

(N_L est le nombre de molécules liquides sur l'unité volume et m est la masse molaire). Parce que dans l'équation 27 les deux facteurs σ and $(P_V - P_L)$ dépendent de la température, la formation d'une bulle critique dépend fortement de la température maximale (de la couche) atteinte et de son évolution temporelle.

La température de la surface de cette couche descend rapidement à la fin de l'impulsion laser, résultat du refroidissement évaporatoire (Figure 22).

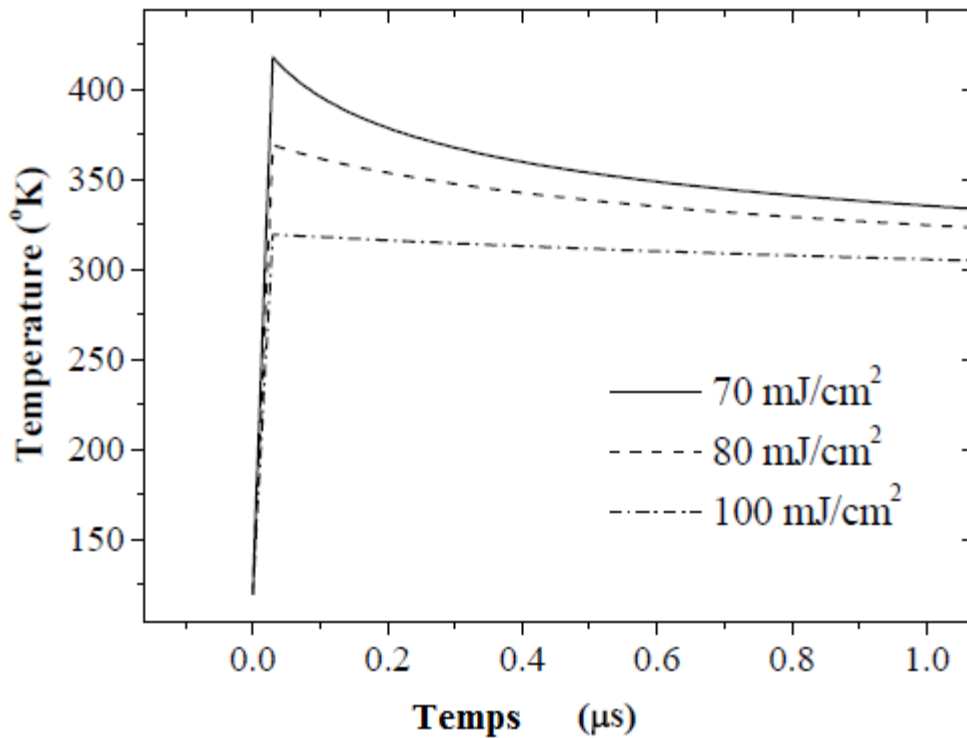


Figure 22: La dépendance de la température de la surface de la couche en fonction de temps pour les fluences indiquées

Pour un surchauffage « faible », la réduction de l'énergie libre sur la modification de la phase est insuffisante pour compenser la limitation de la tension de surface et par conséquent le développement de la bulle s'arrête (~ 100 ns). Cependant, en augmentant la fluence

(température), σ descend et $(P_V - P_L)^2$ augmente tandis que J s'amplifie fortement. A un degré de surchauffage suffisant, due aux nombre de bulles interconnectées et à leur pression élevée, il apparait une éjection du matériau violente. Parce que J augmente de manière fortement exponentielle, l'éjection du matériau se produit à un certain seuil. Les analyses thermodynamiques (Kelly R et al., 1999) ainsi que des simulations MD (Zhigilei L. V. et al, 1997, 2000, 2003) ont associé le seuil avec la limite (la température T maximale) à laquelle le liquide devient assez instable pour qu'il se décompose « spontanément » en une mixture liquide/gaz (i.e., sans la demande d'une énergie barrière à surpasser). Cette limite est décrite par un critère de stabilité (Skripov Y. P., 1974, Debenedetti P., 1996) qui apparait a $\sim 0.8T_c$, où T_c est la température critique du composé :

$$\left(\frac{\partial P}{\partial V}\right)_T = 0; \left(\frac{\partial S}{\partial V}\right)_p = 0 \quad (29)$$

En conclusion, la vaporisation explosive fournit une méthode physique simple et acceptée pour l'éjection aux températures basses de biopolymères fortement liés dans des matrices cryogéniques. Ainsi, on a une justification solide de ce qui est observé régulièrement dans le MAPLE : les meilleurs résultats (en termes de morphologie et de décomposition) sont obtenus dans le cas des solvants « volatiles » (solvants qui absorbent fortement à la longueur d'onde laser utilisée). Plus concrètement, l'énergie minimale (sur l'unité de masse ou volume) pour la vaporisation explosive est liée à l'énergie cohésive (l'énergie de liaison moléculaire) (Yingling Y. G. et al, 2001). Ainsi, pour les solvants « volatiles » (des solvants aux énergies cohésives basses), la vaporisation explosive pourrait être effectuée aux fluences (températures) réduites assurant en même temps une influence thermique ou photochimique minimale sur les polymères. Il y a également une justification cohérente pour l'éjection des matériaux moins « volatiles » par vaporisation explosive. Dans ce cas, les biomatériaux sont expulsés dans des clusters des solvants (matrice). Une hypothèse dans ce sens est présentée dans la Section « Résultats et Discussion ».

Les études de la littérature ont clairement démontré le potentiel du MAPLE pour le dépôts de macromolécules organiques, polymères et biopolymères ou même des virus, protéines, cellules

ou composants tissulaires sous formes intactes et fonctionnelles (Chrisey DB et al., 2003 ; Wu PK et al., 2003; Cristescu R et al., 2006a; Doraiswamy A et al., 2007; Cristescu R et al., 2006b; Cristescu R et al., 2005; Cristescu R et al., 2004, Sima F et al., 2011D). Des couches de polysaccharides (Sima F et al., 2011C, Cristescu R et al., 2006a), de protéines sanguines (Doraiswamy A et al., 2007) ou de collagène (Cristescu R et al., 2004) ont été produites pour des applications dans le diagnostic ou dans la délivrance contrôlée de médicaments. La méthode pourrait aussi permettre la fabrication de micro/nano patterns de biomatériaux (Patz T. M et al., 2006 ; Doraiswamy A et al., 2006 ; Zergioti I et al., 2005, Sima F et al., 2011D) avec des applications dans les domaines des biocapteurs, capteurs chimiques, analyses biochimiques et microbiologiques ou pour des applications thérapeutiques (systèmes de délivrance des médicaments, fabrication de prothèses ou d'implants).

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. MATERIAUX

2.1.1. CERAMIQUES D'HYDROXYAPATITE (HA)

L'HA synthétique est souvent utilisée sous forme de poudres, de blocs poreux ou de granules pour remplir les défauts osseux. Ceux-ci peuvent survenir lorsque de grandes parties d'os ont dû être supprimées (cancers des os) ou lorsque des augmentations osseuses sont nécessaires (reconstructions maxillo-faciales ou applications dentaires). L'HA fournit une architecture et permet le remplissage rapide du défaut par la formation d'os et offre une alternative aux greffes osseuses. Elle peut être intégrée dans la structure osseuse et permet d'accélérer la guérison par rapport à la situation où aucune charge osseuse n'est utilisée. Les revêtements d'hydroxyapatite sont souvent déposés sur des implants métalliques (le plus souvent en titane, alliages de titane ou aciers inoxydables) pour modifier leurs propriétés de surface. Sans le revêtement, l'organisme peut quelquefois présenter une réaction de telle manière d'isoler l'implant des tissus environnants. Le revêtement d'HA va favoriser la formation d'une interface continue entre l'os et l'implant.

Le matériel utilisé dans nos études a été une HA synthétique commerciale de grande pureté (Calbiochem - Merck KGaA) avec une capacité de liaison à l'albumine bovine de 85.4 mg/g et à l'ADN de 2167.6 µg/g. Ces propriétés sont très importantes dans la chromatographie pour la purification des protéines ou des acides nucléiques. Il y a deux sites d'absorption à la surface de l'HA, un site calcium qui se lie aux groupements acides et un site phosphate qui interagit avec les groupements basiques des protéines. Ces sites sont spécifiques; ils n'interagissent pas avec des aminoacides ou des peptides et ne modifient pas les propriétés physiques, chimiques ou biologiques des protéines ou des acides nucléiques adsorbés. La poudre a été caractérisée par FTIR avant utilisation.

La grande capacité d'adsorption de protéines de l'hydroxyapatite permet d'envisager un traitement des biomatériaux par adsorption de ces protéines, dans le but d'augmenter l'adhérence des cellules et par la même la vitesse de colonisation de l'implant. L'adhérence cellulaire aux protéines de la matrice influe en effet directement sur la prolifération et la différenciation et constitue l'étape critique de la colonisation d'un matériau (Anselme, 2000).

2.1.2. FIBRONECTINE, VITRONECTINE

L'intérêt de la fibronectine et de la vitronectine dans le cadre du développement de biomatériaux réside non seulement dans leur capacité à promouvoir l'adhérence mais également dans leurs fonctions de régulation de nombreux processus cellulaires au sein des tissus conjonctifs en général et du tissu osseux en particulier.

La fibronectine est purifiée à partir de cryoprécipité de plasma sanguin humain d'après un protocole mis au point au sein du laboratoire ERRMECe (Poulouin et al, 1999). Le protocole permet la synthèse de grandes quantités de fibronectine, pure à plus de 95% en masse. Le cryoprécipité, conservé à -50°C , est solubilisé 3 heures dans un tampon Tris 50 mM (Trishydroxyméthylaminométhane, Research Organics, USA), NaCl 150mM (Research Organics, USA), pH 7.4, contenant 1mM d'EDTA (Ethylene Diamine Tétracetic Acid, Research Organics, USA), chélateur de cations divalents inhibant les métalloprotéases à zinc et à calcium, et 1 mM de PMSF (Phenyl-méthyl-sulfonylfluoride, Sigma-Aldrich, USA), inhibiteur des protéases à serine. Le cryoprécipité, solubilisé dans un rapport de 30g pour 150mL de tampon, est ensuite centrifugé 10 minutes à 10 000 g et le surnageant conservé. La purification sur chromatographie d'affinité se déroule à 8°C , afin de minimiser les éventuelles dégradations protéolytiques, tout en évitant la précipitation de la fibronectine à 4°C . La fibronectine purifiée est filtrée à l'aide d'un filtre 0.2 μm sous atmosphère stérile, et conservée à 8°C dans un tampon Tris 50mM, à une concentration de 1.5 g/L. La pureté de la fibronectine est de 95 à 98% selon les préparations. Préalablement à chaque série d'expérience, la fibronectine est à nouveau filtrée sur un filtre 0.2 μm .

La vitronectine est purifiée à partir de cryoprécipité de plasma sanguin humain par affinité à l'héparine après déplétion de la fibronectine et d'autres protéines. Un protocole dérivé de celui de Yatogho et al. permet l'obtention de vitronectine pure à 98% en masse.

2.1.3. AUTRES MATERIAUX

Titane

Le titane est surtout utilisé en chirurgie orthopédique et pour réaliser des implants dentaires. L'intérêt du titane réside dans sa grande résistance à la corrosion, sa bonne biocompatibilité, sa faible densité et son faible module élastique comparé à d'autres métaux comme les aciers inox.

Le matériau utilisé dans nos études a été le titane commercial (Dentaurum GmbH) sous forme de pastilles de 12 mm diamètre et de 1 mm épaisseur. Pour la croissance de la surface active, les disques de Ti ont été polis mécaniquement et ensuite soumis aux traitements chimiques par acide (Giordano C et al., 2004).

Albumine de sérum bovin

L'albumine de sérum bovin (ASB) est une protéine extraite du sérum de bovin largement utilisée en biologie. L'ASB contient 583 acides aminés avec une masse totale de 66,430 kDa. Elle est utilisée comme agent diluant ou bloquant dans de nombreuses manipulations telles que l'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), l'immunohistochimie, et le Western blot.

Elle est également utilisée comme nutriment dans les cultures de cellules eucaryotes et microbiennes. Dans la technique de digestion par restriction enzymatique, l'ASB sert à la stabilisation de certaines enzymes de restriction pendant la digestion de l'ADN et évite l'adhésion de l'enzyme au matériel de laboratoire. Elle a l'avantage de ne pas interférer avec les autres protéines, qui ne nécessitent pas sa présence.

Sa grande utilisation est due à sa stabilité, à son **absence d'effets** dans de nombreuses réactions biochimiques et à son faible coût. En effet, elle est disponible très facilement et en grande quantité car elle provient du sang de bovin purifié qui est un sous-produit de l'industrie bovine.

2.2. METHODES

2.2.1. SYNTHÈSE DE COUCHES MINCES D'HA PAR DÉPÔT LASER PULSÉ (PULSED LASER DEPOSITION - PLD)

Le dépôt laser pulsé (pulsed laser deposition – PLD) est une technique de synthèse de couches minces. Elle permet d'obtenir des films d'une meilleure qualité (stœchiométrie, adhérence, uniformité) que ceux obtenus avec d'autres méthodes de dépôt comme l'évaporation ou la pulvérisation cathodique, plasma spraying, procédé sol-gel, etc.

La méthode consiste à diriger un faisceau laser pulsé sur une cible constituée du matériau à déposer. Après le contact du faisceau laser avec la cible, de la matière va s'arracher pour venir se déposer sur le substrat placé en face de l'impact laser.

Dans nos études, nous utilisons un système laser pulsé LambdaPhysik/Coherent Radiation COMPEXPro 205, à excimère (KrF*, $\lambda = 248$ nm, $\tau = 25$ ns) capable d'opérer à une fréquence de 1 à 50 Hz. Le faisceau est focalisé sur la cible par une lentille cylindrique extérieure de MgF₂. Pour le contrôle de la direction du plasma, l'angle du contact entre le faisceau et la cible est établi à 45°. La cible est tournée avec une fréquence de 0.04 Hz pour éviter la pénétration du matériel. Le substrat sur lequel le matériel est déposé est placé parallèlement à la cible et chauffé pendant les manipulations. Les processus de chauffage et de refroidissement du substrat sont contrôlés avec des pentes constantes de température par un dispositif Eurotherm 2146. On peut aussi changer l'atmosphère dans la chambre de réaction, en introduisant des gaz réactifs ou inertes (Figure 23).

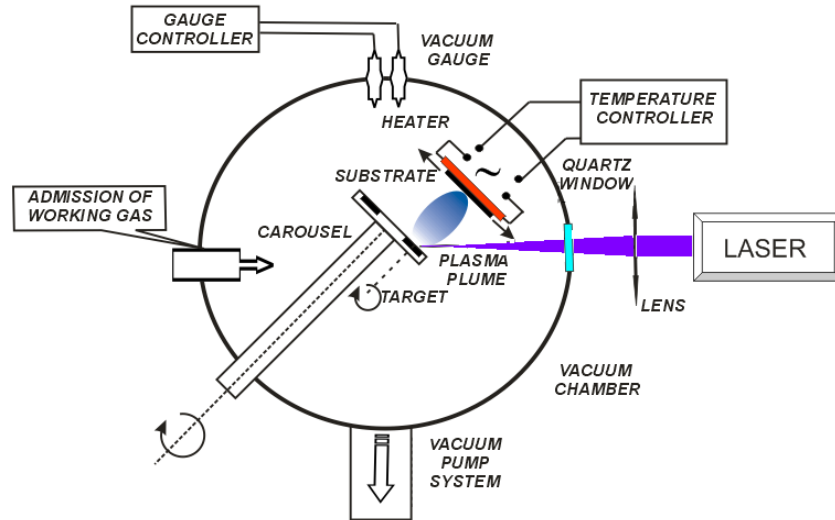


Figure 23 : Schéma du processus PLD

Pour éliminer la possibilité d'une contamination et pour garantir la pureté du gaz pendant le processus de dépôt, la chambre de réaction est vidée auparavant jusqu'à une pression résiduelle de 10^{-6} torr, en utilisant un système de pompage de vide élevé, composé d'une pompe à vide préliminaire Alcatel SD2033 et une pompe turbo-moléculaire Alcatel ATP400. Pour maintenir constante la pression dynamique pendant les manipulations, on utilise un dispositif de réglage fin de débit de pression MKS50 (MKS Instruments GmbH).

Avant l'introduction dans la chambre de réaction, tous les échantillons substrat sont nettoyés avec de l'alcool éthylique et de l'eau déionisée dans un bain ultrasons Transsonic T310.

Les cibles ont été préparées à partir de la poudre d'HA Calbiochem (Merck KGaA, 391948). La poudre est pressée à 4 MPa avec une presse hydraulique Bernardo WS 10 dans une matrice 20 mm SPECAC. La pastille est soumise ensuite à un traitement de frittage à 400 °C pendant 6 h dans un four Carbolite 1100.

Les couches minces d'HA ont été obtenues par PLD après l'irradiation de la cible avec 20000 impulsions. Les films ont été déposés sur des substrats de titane chauffés à 400 °C dans une atmosphère de vapeurs d'eau à la pression de 3.5×10^{-1} torr. Une image du plasma d'HA est présentée dans la Figure 24.

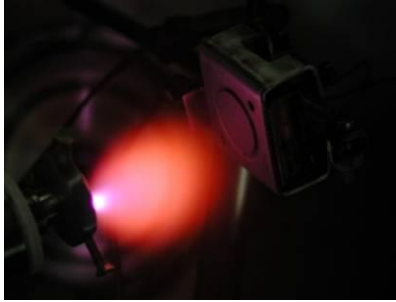


Figure 24 : Image du plasma HA dans la chambre de réaction pendant les manipulations PLD

Après les dépôts d'HA, tous les échantillons sont soumis à un traitement thermique sous vapeur d'eau pendant 6 h à 400 °C (Figure 25).

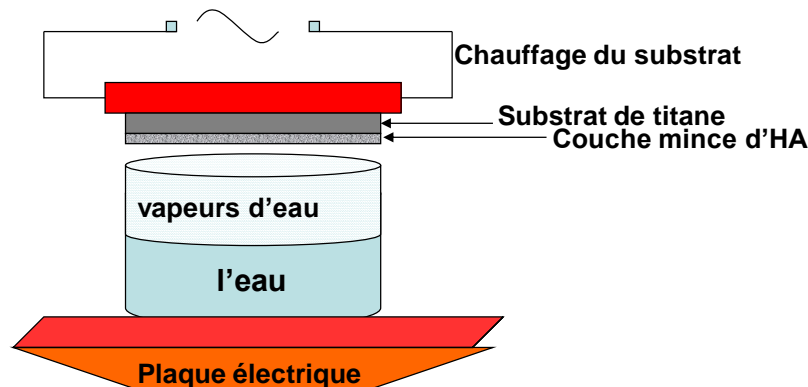


Figure 25 : Schéma du traitement thermique après dépôts laser pulsé

2.2.2. CARACTERISATION DES COUCHES MINCES D'HA PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE, MICROSCOPIE DE FORCE ATOMIQUE, ET DIFFRACTION DE RAYONS X

Les études MEB ont été accomplies grâce à un microscope électronique à balayage environnemental FEI modèle Quanta 400 couplé à un système d'analyse EDS. La résolution du microscope est de 3.5nm en haut vide et environ 5nm en modes vide faible et environnemental.

Dans les analyses AFM (Multimode avec Nanoscope IIIA ou Nanoscope IV, Digital Instrument, Santa Barbara), une fine pointe de diamant a été montée sur un bras cantilever et mis en contact avec les surfaces. Les mouvements du cantilever sont détectés par un rayon laser qui est réfléchi

sur le cantilever vers un photo-détecteur qui permet de repérer sa position. Une structure-tube piézo-électrique a été utilisée pour maintenir une force d'interaction constante entre l'échantillon et la pointe. Dans le plan X-Y la résolution est principalement limitée par le rayon de la pointe qui est souvent de 10 nanomètres. La résolution verticale (Z) n'est pas directement liée à la pointe, et peut être de l'ordre de 0.05 nanomètre (0.5 Å).

Les études de diffraction X (DRX) ont été effectuées avec un appareil Rigaku, Ultima IV (radiation CuK_α). Pour l'analyse, les spectres ont été enregistrés en incidence rasante ($\alpha=1^\circ$) dans l'intervalle 2θ de 10° - 40° (pas de 0.05° et temps par pas de 5s).

2.2.3. SYNTHÈSE DE COUCHES MINCES DE FIBRONECTINE ET DE VITRONECTINE PAR ÉVAPORATION PAR LASER PULSÉ ASSISTÉE PAR UNE MATRICE (MATRIX ASSISTED PULSED LASER EVAPORATION - MAPLE)

La limitation de la technique PLD réside dans les mécanismes d'ablation : dans le cas des molécules plus complexes (polymères ou matériaux organiques), l'irradiation provoque la destruction des liaisons chimiques, impliquant un changement de composition du film obtenu. La technique MAPLE a permis de passer outre cette limitation, permettant le transfert des substances organiques et polymériques.

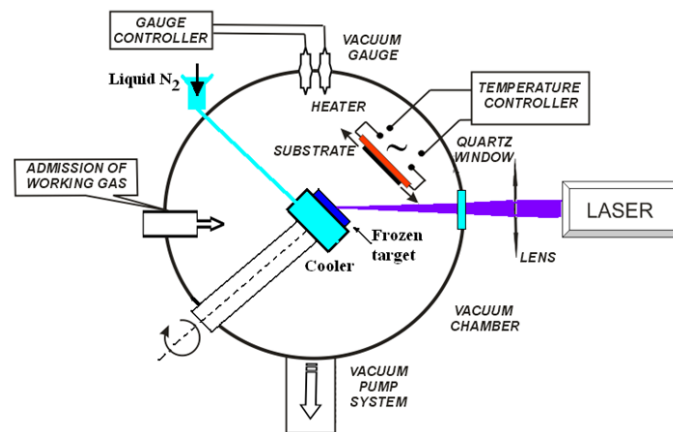


Figure 26 : Schéma du processus MAPLE

Comme le PLD, la méthode consiste en l'ablation de la substance dans différentes atmosphères, en utilisant l'irradiation par laser pulsé, mais aussi en un traitement cryogénique de la cible pour assurer la protection de la matière d'intérêt lors du transfert. Le matériel à déposer se présente sous forme solide à une concentration de ~5%, dissous dans un solvant (la matrice) puis congelé et maintenu à basse température avec un dispositif de refroidissement (cooler) (Figure 26). Pendant l'irradiation par laser pulsé, les complexes formés par des molécules organiques ou polymériques protégées par les molécules de solvant sont expulsés vers le substrat. Le solvant volatile inerte absorbe la majorité de l'énergie du pulse laser, puis se sépare du matériel d'intérêt avant d'être évacué par le système de pompage. Les molécules organiques sont ainsi déposées sur le substrat qui est maintenue à température ambiante (Figure 27).

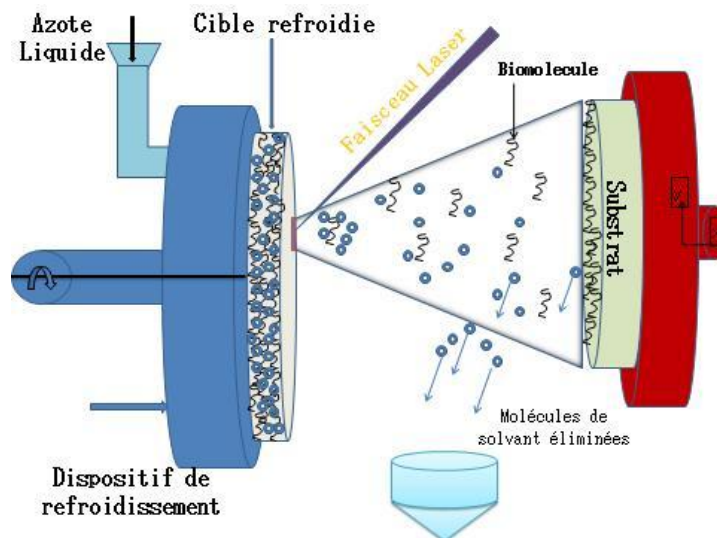


Figure 27 : Ablation de la cible cryogénique et transfert protégé de la matière sur le substrat

Nous avons déposé par MAPLE des couches minces d'ASB (albumine de sérum bovin), de FN (fibronectine) et de VN (vitronectine), sur les couches minces d'HA synthétisées par PLD.

Quelques photos de la cible avant, au cours et à la fin de l'irradiation laser sont présentés sur la Figure 28.

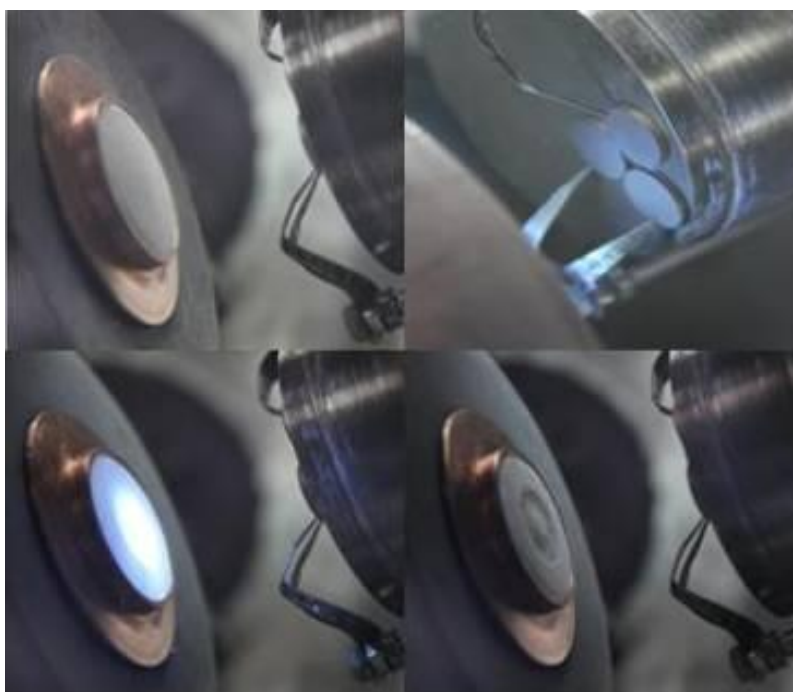


Figure 28 : Images de la cible cryogénique avant, au cours et après l'irradiation laser

Les conditions de dépôts de l'HA par laser pulsé et des protéines par évaporation laser pulsé assistée par une matrice cryogénique sont regroupées dans le Tableau IV ci-dessous.

Tableau IV : Conditions de dépôt par PLD et MAPLE

Code	Cible	Substrat	Distance C-S mm	T °C	Pression Torr	Energie mJ	Frequence Hz	L'aire du spot mm ²	N. de pulses
Ti/HA	HA	Ti	40	400	0.35	530	10	7	20000
Ti/HA/ASB	ASB (1.8 mg/ml)	Ti/HA	30	30	0.1	140	15	18	20000
Ti/HA/FN	fibronectine (1.8 mg/ml)	Ti/HA	30	30	0.1	140	15	18	20000
Ti/HA/VN	vitronectine (0.6 mg/ml)	Ti/HA	30	30	0.1	140	15	18	20000
Ti/FN	fibronectine (1.8 mg/ml)	Ti	30	30	0.1	140	15	18	20000
Ti/VN	vitronectine (0.6 mg/ml)	Ti	30	30	0.1	140	15	18	20000
Ti/ASB	ASB (1.8 mg/ml)	Ti	30	30	0.1	140	15	18	20000
Si/FN	fibronectine (1.8 mg/ml)	Si (111)	30	30	0.1	140	15	18	15000
Si/VN	vitronectine (0.6 mg/ml)	Si (111)	30	30	0.1	140	15	18	15000
Ti									

2.2.4. CARACTERISATION DES COUCHES MINCES DE FIBRONECTINE ET DE VITRONECTINE PAR MICROSCOPIE DE FORCE ATOMIQUE

Pour caractériser les couches de protéines, l'AFM (Multimode avec Nanoscope IV (Digital Instrument, Santa Barbara) a été utilisé en mode Tapping. Ici, le cantilever oscille rapidement comme un diapason, tapotant légèrement sur la surface. Dans ce mode de fonctionnement, l'amplitude et la phase de la poutre oscillante sont utilisés pour évaluer la topographie de la surface. Ce mode est très utilisé car il est idéal pour les échantillons délicats - comme des membranes humides - car elle évite les forces latérales entre la pointe et la surface.

2.2.5. CARACTERISATION DES COUCHES MINCES DE FIBRONECTINE ET DE VITRONECTINE PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE PAR TRANSFORMEE DE FOURIER

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF, en anglais Fourier transform infrared spectroscopy - FTIR) est une technique permettant l'acquisition de spectres infrarouges. Au lieu d'enregistrer la quantité d'énergie absorbée lorsque la fréquence de lumière infrarouge varie (monochromateur), la lumière infrarouge passe au travers d'un interféromètre. Après avoir traversé l'échantillon, le signal mesuré est un interférogramme. Après que le signal ait subi une transformée de Fourier, on obtient un spectre identique à celui obtenu par une spectroscopie infrarouge conventionnelle (dispersive).

Cette méthode est basée sur le principe d'absorption des ondes électromagnétiques par les liaisons chimiques et permet d'accéder directement à l'information moléculaire, à la nature chimique et à l'organisation conformationnelle et structurale des matériaux analysés. Sous l'effet du rayonnement IR, les molécules de l'échantillon analysé vont subir des changements d'état vibrationnel, à des fréquences de vibration caractéristiques de chaque groupement moléculaire. Cette méthode d'analyse vibrationnelle est non destructrice, qualitative et peut être aussi

quantitative. Les spectromètres mesurent les nombres d'onde (en cm^{-1}) et l'atténuation de l'énergie de la radiation que l'échantillon absorbe, permettant une identification des groupements chimiques et une évaluation de leur concentration. On peut interpréter également les spectres en termes d'orientation, de conformation et d'ordre structural des molécules à la surface.

Les spectromètres IRTF sont moins chers que les spectromètres conventionnels, la construction d'interféromètres étant plus facile que celle de monochromateurs. De plus, la mesure d'un spectre est plus rapide en IRTF car l'information à toutes les fréquences est collectée simultanément (une mesure au moyen d'un appareil dispersif dure par exemple une demi-heure ; elle dure deux minutes avec un appareil IRTF). Cela permet à de nombreux échantillons d'être analysés et moyennés ensemble, ce qui améliore la sensibilité.

Un spectromètre IRTF comporte essentiellement cinq parties (Figure 29) :

- i. une source lumineuse qui dans notre cas est avec un spectre continu entre 7500 et 350 cm^{-1} ;
- ii. un dispositif permettant de générer les interférences (l'interféromètre) ;
- iii. un compartiment échantillon qui permet d'accueillir plusieurs types d'accessoires (porte-échantillon) dépendant de la technique spectroscopique employée et le mode de mesures utilisé (réflexion ou transmission);
- iv. un détecteur ou capteur photosensible (différence de potentiel par absorption de photons) comme les détecteurs MCT. Pour une plus grande sensibilité, les détecteurs de type MCT sont refroidis à l'azote liquide (77 K);
- v. un convertisseur analogique numérique qui interroge le détecteur à des intervalles réguliers et transforme le signal analogique en un signal numérique manipulable par le système informatique.

Un schéma d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier est présentée dans la Figure 29.

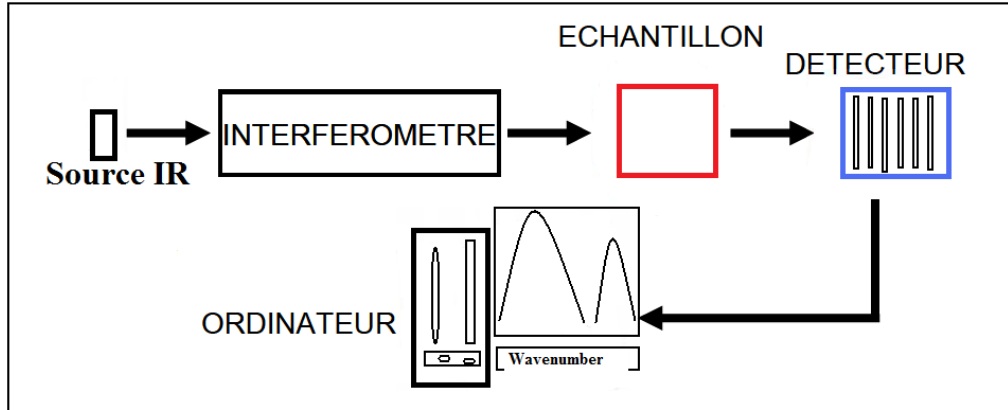


Figure 29: Schéma de principe d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier

Nos analyses ont été réalisées en mode transmission dans l'intervalle d'intérêt ($4000-1200$) cm^{-1} par un appareil FTIR Shimadzu 8400S associé au microscope AIM-8800 au détecteur MCT refroidi à l'azote liquide. La résolution dans les deux cas a été de 8 cm^{-1} . Les dimensions de l'ouverture dans le cas des investigations microscopiques sont de $50 \times 50 \mu\text{m}^2$.

2.2.6. ESSAIS DE MOUILLABILITE

La mesure de l'angle de contact permet l'évaluation de la capacité d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente à la périphérie d'une goutte déposée sur le substrat, avec la surface du substrat. Elle permet de calculer **l'énergie de surface** du liquide ou du solide. La mesure de l'angle de contact permet d'accéder à l'énergie libre d'une surface. Elle permet aussi la discrimination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide-solide. On peut ainsi déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface.

Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide est appelé angle de contact (θ) (Figure 30).

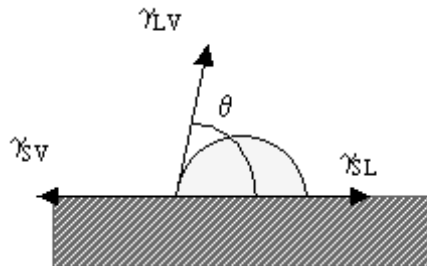


Figure 30 : Schéma d'une goutte de liquide sur une surface solide. θ est l'angle de contact, γ_{SV} la tension interfaciale solide-vapeur, γ_{SL} la tension interfaciale solide-liquide, γ_{LV} la tension interfaciale liquide-vapeur.

La forme d'une goutte à la surface d'un solide est régit par 3 paramètres : la tension interfaciale solide-liquide (γ_{SL}), la tension interfaciale solide-vapeur (γ_{SV}) et la tension interfaciale liquide-vapeur (γ_{LV})

Ces trois grandeurs sont reliées par l'équation de Young :

$$-\gamma_{SV} + \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta = 0 \quad (30)$$

Seules γ_{LV} et θ sont mesurables, par conséquent il est nécessaire d'avoir des relations supplémentaires pour estimer les inconnues γ_{SL} et l'énergie de surface γ_{SV} . Plusieurs modèles ont été développés pour déterminer ces inconnues.

La mesure de l'angle de contact nous fournit trois types d'information :

1. Si on utilise l'eau comme liquide de mesure d'angle de contact, on peut déduire le caractère hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle, grande énergie de surface) de la surface.
2. Si on utilise plusieurs liquides de référence différents, on peut accéder à l'énergie libre de la surface, tout en discriminant les composantes polaires ou apolaires de cette énergie en utilisant des modèles comme celui de Good Van Oss ou celui de Owens Wendt.

3. Si on mesure l'hystérésis entre l'angle à l'avancée de la goutte et au retrait de la goutte on obtient des renseignements sur la non homogénéité physique (rugosité) ou chimique de la surface.

Pour nos études, nous avons utilisé une goutte d'eau ultra-pure, déposée à l'aide d'une seringue sur la surface de l'échantillon à analyser (Figure 31).

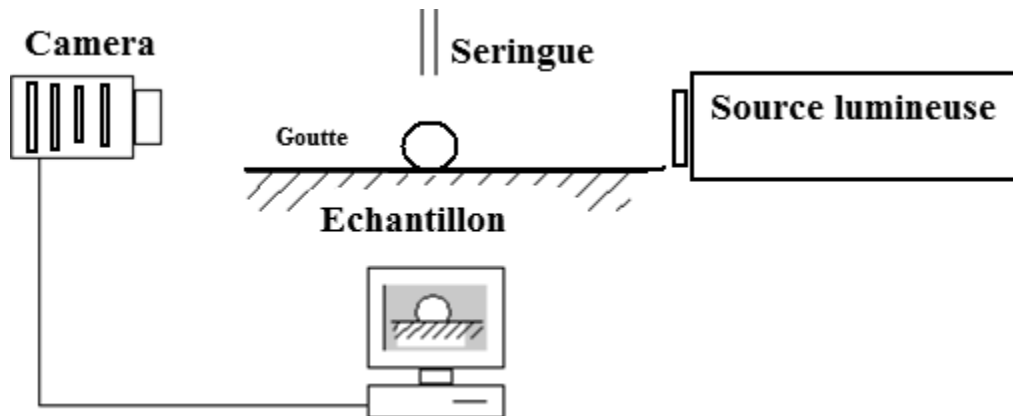


Figure 31: Schéma du montage pour la mesure de l'angle de contact

La mesure de l'angle a été faite à partir des images capturées par un PC via une caméra. Un logiciel a permis de numériser le contour de la goutte par traitement d'images. Il détermine ensuite l'angle de contact grâce à des méthodes d'interpolation.

Le système motorisé permet de faire des mesures d'angles à l'avancée et au retrait de la goutte.

2.2.7. ESSAIS DE PROFILOMETRIE

Les couches de protéines ont été analysées au profilomètre sur un modèle Veeco Dektak 150. Celui-ci est un profilomètre de contact (avec stylet) basé sur une palpation physique entre une pointe en diamant et la surface à mesurer. Le stylet qui consiste en une fine aiguille de diamant d'un diamètre de 25 μm balaie doucement la surface, alors que la déflexion verticale est mesurée en continu. Les variations dans la topographie de surface provoquent le mouvement

vertical du stylet qui est détecté par un capteur différentiel variable linéaire. Le capteur associé à la pointe mesure la position verticale Z lorsqu'elle se déplace horizontalement (axe X) sur la surface, ce qui permet ainsi d'établir le profil $Z=f(X)$ de la surface. Les mouvements verticaux du stylet sont transformés en signaux électriques proportionnels à l'amplitude du déplacement. Après amplification, les signaux sont convertis en données digitales. Pour les matériaux fragiles le profilomètre de contact dispose d'un contrôle de la force d'appui de la pointe.

L'appareil nous a permis d'obtenir des profils de surfaces et de lignes avec une bonne résolution horizontale et verticale. La résolution de l'instrument dépend du rayon de la pointe du stylet, et peut être aussi fine qu'un nanomètre de hauteur. Ainsi, le profilomètre nous offre une résolution verticale maximale de l'ordre du nanomètre, avec un déplacement vertical maximal de 1 mm. Ce profilomètre de haute précision nous a servi à analyser la topographie et la rugosité de surface. Il se prête parfaitement à l'analyse de surfaces avec un fort relief.

2.2.8. DOSAGE ET MARQUAGE DES PROTEINES PAR IMMUNOFLUORESCENCE ET DOT BLOT

La détection *in situ* de la fibronectine ou de la vitronectine adsorbée est réalisée par immunofluorescence. Ce marquage repose sur l'affinité spécifique d'un anticorps, l'anticorps primaire, pour le ligand d'intérêt, ici la fibronectine ou la vitronectine. Le signal de reconnaissance du ligand est ensuite amplifié par un anticorps secondaire, reconnaissant l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est couplé à une molécule permettant la visualisation du complexe ligand/anticorps. Dans le cas d'un marquage immunofluorescent, il est couplé à un fluorochrome qui permet sa visualisation en microscopie à épifluorescence. Le principe général d'un immunomarquage est illustré sur la Figure 32.

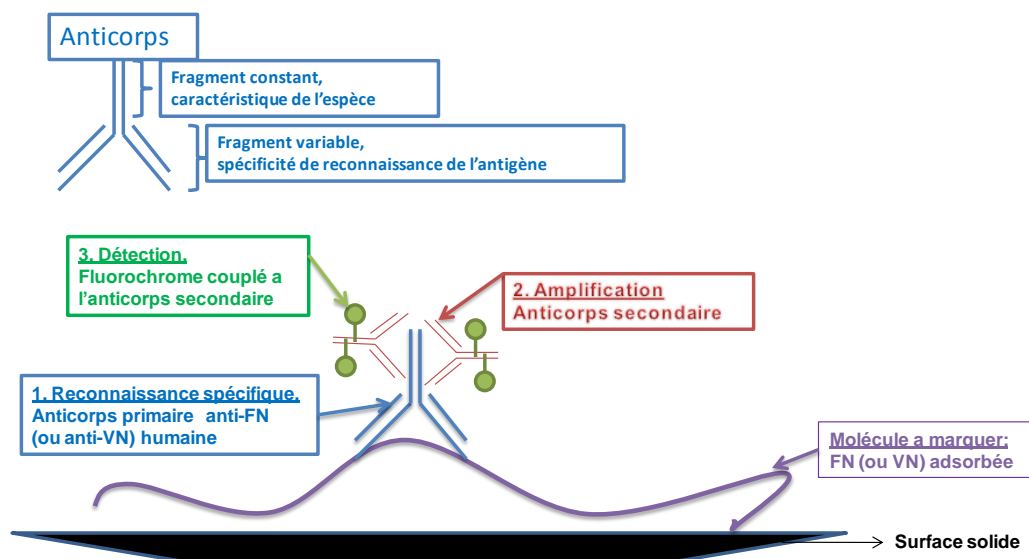


Figure 32 : Principe de l'immunomarquage fluorescent.

Suite à l'adsorption de la fibronectine (ou vitronectine), les surfaces sont saturées 30 min à 37°C dans le tampon d'adsorption. Les échantillons sont ensuite incubés 1 heure avec un anticorps polyclonal de lapin anti-Fn (ou anti-VN) plasmatique dilué au 1/50 dans le tampon de saturation. Ils sont ensuite rincés trois fois 10 minutes dans le tampon de saturation et incubés 45 minutes en présence d'un anticorps de chèvre anti-IgG du lapin couplé au FITC (Anticorps T6778, Sigma-Aldrich) dilué au 1/100 dans le tampon de saturation. Enfin, ils sont rincés deux fois 10 minutes dans le tampon de saturation puis maintenus immergés dans le tampon d'adsorption jusqu'au moment de l'observation. La fluorescence du FITC est observée à l'aide d'un filtre de bande passante. Les photos sont prises à l'aide d'un appareil photo numérique (Powershot S50, Canon) connecté au microscope à fluorescence (Leica Microsystems, Germany).

Western (Dot) Blot. Le protocole suivant a été utilisé pour mettre en évidence les protéines dans le surnageant ou sur différentes structures. Des gouttes (2, 3 ou 6 µl) de la solution surnageant sont déposées sur un papier de nitrocellulose. Le blocage des sites non-spécifiques est réalisé avec une solution de TBS-lait écrémé 3% TWEEN20 0.1 v.v., pendant 3 x 5 min. L'anticorps primaire est ensuite ajouté. Il est dilué au 1/10000 dans 50 ml de solution de TBS-lait écrémé 3% TWEEN20 0.1 v.v., pendant 45 min à température ambiante (TA) sous agitation mécanique. Trois rinçages de 5 min avec du TBS-lait écrémé 3% TWEEN20 0.1 v.v. (en abondance) sont

ensuite réalisé. L'anticorps secondaire dilué au 1/10000 dans 50 ml de solution de TBS-lait écrémé 3% TWEEN20 0.1 v.v., est ensuite incubé avec la membrane pendant 30 min à TA sous agitation mécanique. Après des rinçages avec du TBS-lait écrémé 3% TWEEN20 0.1 v.v. (3 x 5 min), un rinçage avec de l'eau distillé est fait pour éliminer les traces de lait. La membrane de nitrocellulose est ensuite immergée dans la solution révélateur (0.5 ml réactif A (basé sur la phosphatase alcaline) + 0.5 ml réactif B dans 50 ml de tampon révélateur) et agité doucement jusqu'au moment de l'apparition de la couleur. Finalement, la réaction est arrêtée avec une solution d'eau distillée sous agitation tranquille pendant 10 min.

2.2.9. QUANTIFICATION DES PROTEINES PAR BCA

La méthode BCA (BC Assay), est un dosage colorimétrique de protéines, basé sur l'acide bicinchonique.

Principe : les protéines réduisent l'ion de cuivre Cu(II) en Cu(I) en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique est un réactif colorigène hautement spécifique pour le Cu(I), qui forme un complexe pourpre ayant une absorption optique maximale à 562nm (lu entre 540 et 590nm). L'absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines (Smith P et al., 1985).

Usage: le BCA est utilisable dans une gamme de concentrations de 0.5µg/ml à 2mg/ml selon les formulations, et est beaucoup plus linéaire que l'autre dosage colorimétrique largement utilisé au laboratoire, basé sur le Coomassie (méthode de Bradford). Il présente en outre 2 à 3 fois moins de variations de signal selon le type de protéines. Il faut cependant réaliser une gamme d'étalonnage avec une protéine de référence (généralement l'ASB).

Son usage a été popularisé par le fait qu'il s'accommode d'échantillons contenant des substances classiquement interférentes avec le Bradford, notamment nombreux détergents (SDS), les lipides, les acides nucléiques. Ses limitations concernent les échantillons contenant des agents réducteurs ou chélatants (d'où la nécessité de combiner des méthodes de dessalage (dialyse, précipitation au TFA) pour enlever ces substances).

Protocole utilisé : pour la désorption des protéines déposées sur des substrats de Silicium nous avons utilisé du Tris 10mM, EDTA 1mM à 4 °C pendant 6 heures (de Bartolo L et al., 2002). Les concentrations de protéines désorbées (FN, VN, et ASB) en solution ont été normalisées par la surface des échantillons pour obtenir les quantités déposées par unité de surface (cm²). Ensuite, le dosage BCA est réalisé (Thermo Scientific). Une courbe étalon réalisée à partir de l'ASB est tracée puis les données sont collectées dans le milieu extrait à partir de toutes les pastilles. Les deux courbes étalons utilisées pour la quantification de l'ASB, la FN et la VN respectivement sont présentées ci-dessous (Figure 33).

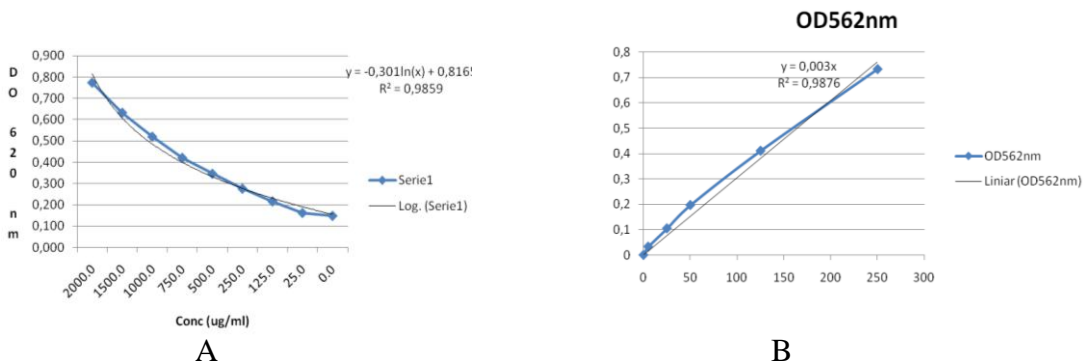


Figure 33 : Les courbes étalons utilisées pour la quantification de (a) l'ASB et (b) de la FN et la VN respectivement.

2.2.10. REPONSE CELLULAIRE AUX COUCHES MINCES

2.2.10.1. CULTURES CELLULAIRES

Les cellules utilisées lors de cette étude sont des cellules ostéoprogénitrices humaines (HOp) préparées à partir de moelle osseuse. Elles sont cultivées dans le milieu ISCOVE (Sigma I3390) modification du milieu Dulbecco (Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)), complété avec 10%(v/v) de sérum de veau foetal, 1%(v/v) de glutamine et 1%(v/v) de pénicilline et de streptomycine. Les cellules sont cultivées à 37°C, sous atmosphère humide à 5% de CO₂.

Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont décrochées par une solution de 0.25% trypsine dans EDTA pendant 5 min à 37 °C.

L'action de l'enzyme est inhibée par l'ajout de 15 ml de milieu de culture complet (avec sérum). Les cellules sont ensuite culottées par centrifugation à 1200rpm pendant 5 minutes. Elles sont ensuite resuspendues dans du milieu sans sérum pour les tests d'adhérence.

2.2.10.2. TESTS D'ADHESION PAR IMMUNOMARQUAGE

L'actine est une protéine bi-globulaire très importante pour l'architecture et les mouvements cellulaires. Elle est présente dans toutes les cellules du corps. Un filament d'actine, ou microfilament, est un homopolymère d'actine de 42 kDa. C'est un constituant essentiel du cytosquelette des cellules eucaryotes, ainsi que des fibres musculaires. L'actine représente ainsi environ 5% du total des protéines d'une cellule typique dont la moitié est assemblée en filaments d'actine tandis que l'autre moitié est libre dans le cytosol sous forme de monomères d'actine (Alberts et al., 2002). L'actine sous forme de filaments est parfois appelée actine F (Fibrillaire), tandis que la forme monomérique est appelée actine G (Globulaire). L'actine G globulaire se polymérise en actine F (filament d'actine). La polymérisation de l'actine commence par une phase de nucléation pendant laquelle des dimères (ou trimères) d'actine s'assemblent. Cette étape est lente et défavorable thermodynamiquement. Si la concentration en monomères d'actine est supérieure à une concentration critique, les monomères s'assemblent en filaments à partir des noyaux préformés. C'est l'étape d'élongation des filaments, cette étape rapide est souvent appelée phase de polymérisation, bien que l'actine filamenteuse ne soit pas un véritable polymère (les monomères ne sont pas liés entre eux par une liaison covalente au sein d'un filament). Une fois formés, les filaments d'actine sont à l'équilibre entre dissociation des filaments aux extrémités et association de monomères aux extrémités.

À l'une des extrémités, notée (+) ou extrémité barbue ou encore en brosse, les constantes cinétiques sont d'un ordre de grandeur 10 fois supérieur à celles de l'autre extrémité, notée (-) ou extrémité pointue. En outre, les monomères associés à l'ATP (ATP-actine), présents en majorité

dans les cellules vivantes, ont plus tendance à polymériser que ceux associés à l'ADP (ADP-actine). L'actine associée à un filament a tendance à hydrolyser son ATP. Cette propriété est, avec la polarité du filament, à l'origine du phénomène dit de « tapis roulant » (anglais : treadmilling). En effet, l'extrémité (+) va avoir tendance à capter en très grande majorité de l'ATP-actine, favorisant par conséquent la polymérisation à cette extrémité. En revanche, l'extrémité (-) étant moins active, l'actine du filament qui en est proche a passé plus de temps sous forme filamentaire, et est majoritairement sous forme d'ADP-actine. En conséquence, à l'extrémité (-) l'équilibre est déplacé vers la dépolymérisation. Cependant, aucune masse n'est transportée macroscopiquement. Ce processus permet la réalisation d'un moteur moléculaire qui permet à certaines cellules de se déplacer au moyen d'un lamellipode. Dans les cellules, la formation spontanée de noyaux d'actine est très défavorable.

La vinculine est une protéine membranaire et cytosquelettique présente notamment au niveau des plaques d'adhésion focale. Comme la taline ou l'actinine, elle permet la liaison entre les intégrines et le cytosquelette d'actine. Elle est donc associée à l'adhésion focale qui fait partie des jonctions adhérentes, des complexes qui nucléarisent les filaments d'actines et les liaisons entre le milieu externe, la membrane cellulaire et le cytosquelette (Xu et al. 1998) ainsi que la migration cellulaire. Les complexes formant les adhésions focales consistent en l'association de protéines comme la vinculine, l' α -actine, la paxilline, et la taline.

La phalloïdine est une protéine purifiée à partir de levures, qui est capable de se lier spécifiquement aux filaments d'actine cellulaire (Figure 34), empêchant sa dépolymérisation. Cette propriété de liaison avec l'actine lui permet d'être utilisée en imagerie cellulaire afin de la visualiser.

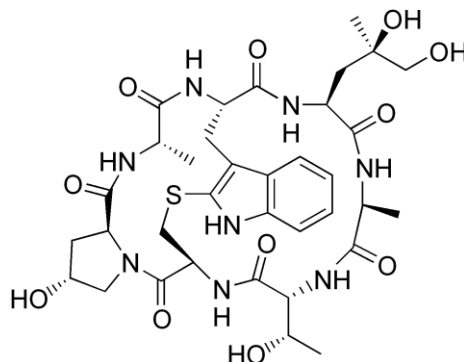


Figure 34 : Structure chimique de la phalloïdine

Le DAPI (4',6' Di Amidino-2-Phényl Indole – Figure 35) est une molécule qui s'intègre entre le brin d'ADN. C'est un marqueur fluorescent excité par la lumière UV présentant une forte fluorescence bleue quand il est lié à ADN. Il permet de rendre visible le noyau en bleu sous microscope à fluorescence.

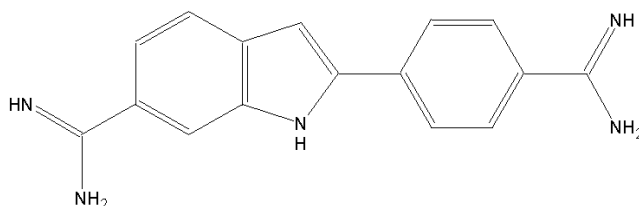


Figure 35 : Structure chimique développée du DAPI

Un fluorochrome ou fluorophore est une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation. Ce sont des substances composées de plusieurs noyaux aromatiques conjugués ou encore de molécules planes et cycliques qui possèdent une ou plusieurs liaisons π .

L'utilisation de fluorochromes en biologie moléculaire est plus récente que celle des isotopes radioactifs. Elle a l'avantage de donner des résultats immédiats en s'affranchissant des temps d'exposition longs requis pour la technique par radioactivité. La fluorescence a le désavantage de ne pas être permanente, notamment quand le fluorophore est exposé à la lumière, l'intensité de la fluorescence diminue avec le temps jusqu'à devenir indétectable.

Les fluorochromes sont utilisés dans plusieurs marquages immunologiques : cytométrie en flux, immunofluorescence. Les plus utilisés sont la phycoérythrine (PE), la Fluorescéine isothiocyanate (FITC), la gamme d'Alexa Fluor, la Protéine fluorescente verte (green fluorescent protein, GFP).

La FITC (Fluorescein isothiocyanate) est un dérivé fluorescent de fluorescéine fonctionnalisé avec un groupe (-N=C=S) réactif aux groupes amines des protéines cellulaires. Dans notre étude, il est conjugué à la phalloïdine.

Le TRITC est un dérivé de rhodamine (une famille de composés organiques hétérotricycliques fluorescents basés sur la fluorone), une molécule construite sur le squelette rhodamine de base

(3-désoxy-4,12-diamino-8-phényl-fluorone) fonctionnalisé par un groupe isothiocyanate (-N=C=S). Elle est réactive aux groupements amine des protéines.

Une liste complète des fluorochromes conjugués est donnée dans le Tableau V ci dessous :

Tableau V : Liste des fluorochromes conjugués :

fluorophore	λexcitation (nm)	λémission (nm)	PM	Notes
Hydroxycoumarin	325	388	331	Succinimidyl ester
Aminocoumarin	350	445	330	Succinimidyl ester
Méthoxycoumarin	380	410	317	Succinimidyl ester
Cascade Blue	(375);401	423	598	Hydrazide
Pacific Blue	403	455	408	Maleimide
Pacific Orange	403	551		
Lucifer yellow	425	528		
NBD	466	539	294	NBD-X
R-Phycocerythrin (PE)	480;565	578	240 k	
PE-Cy5 conjugates	480;565;650	670		aka Cyochrome, R670, Tri-Color, Quantum Red
PE-Cy7 conjugates	480;565;743	767		
Red 613	480;565	613		PE-Texas Red
PerCP	490	675		Perdinin chlorophyll protein
TruRed	490;675	695		PerCP-Cy5.5 conjugate
FluorX	494	520	587	(GE Healthcare)
Fluorescéine	495	519	389	FITC; pH sensitive
BODIPY-FL	503	512		
TRITC	547	572	444	TRITC
X-Rhodamine	570	578	548	XRITC
Lissamine Rhodamine B	570	590		
Texas Red	589	615	625	Sulfonyl chloride
Allophycocyanin (APC)	650	660	104 k	
APC-Cy7 conjugates	650;755	767		PharRed

Microscopie à fluorescence

La microscopie en fluorescence (ou en *épifluorescence*) est une technique utilisant un microscope optique et tirant profit du phénomène de fluorescence et de phosphorescence, au lieu de, ou en plus de l'observation classique par réflexion ou absorption de la lumière visible naturelle ou artificielle. On peut ainsi observer divers objets, substances (organiques ou inorganiques) ou échantillons d'organismes morts ou vivants.

La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. La microscopie en fluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise. En microscopie de fluorescence, on peut donc visualiser directement des substances fluorescentes. Pour des substances, des cellules, des molécules non fluorescentes, il est nécessaire de les marquer par des substances appelées fluorochromes (voir plus haut), comme par exemple le DAPI qui marque l'ADN et fluoresce en bleu.

De nombreuses techniques de marquage peuvent être utilisées : un marquage simple se fait par affinité entre un fluorochrome et la molécule à marquer, l'immunomarquage direct ou indirect fait intervenir un anticorps marqué, l'utilisation de protéines de fusion qui consiste à introduire dans la cellule à observer un gène de protéine recombinante fluorescente (par transfection ou infection), la protéine synthétisée devient alors fluorescente, le FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching) et le FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) qui consistent à irradier une zone dont la fluorescence va disparaître. Ces techniques permettent d'étudier la diffusion des molécules marquées, en effet si des molécules se déplacent la fluorescence se répartira, etc.

On peut exciter les substances fluorescentes par une *excitation monophotonique*. On utilise pour cela une lumière d'excitation dont la longueur d'onde excite directement le fluorophore. Donc, la fluorescence émise peut provenir de toute l'épaisseur de l'échantillon traversée par le faisceau d'excitation. Le microscope confocal permet d'éliminer la fluorescence provenant des régions non focales grâce à un sténopé (ou un iris confocal) placée devant le détecteur. L'observation de signaux de fluorescence dans le microscope confocal repose donc sur cinq éléments : une source de lumière pour l'excitation, un fluorophore, des filtres pour séparer les photons d'émission des photons d'excitation, un sténopé, un détecteur pour transformer le signal lumineux des photons en signal électrique. *L'excitation multiphotonique* consiste en l'absorption quasi-simultanée de plusieurs photons d'excitation d'une longueur d'onde proche d'un multiple de l'excitation optimale à un photon. On utilise pour cela un laser pulsé dans des fréquences proches de l'infrarouge. Dans ce cas, seul le point de focalisation du faisceau laser est excitateur (densité de photon suffisante pour coupler l'énergie d'excitation). Bien souvent les applications de

l'excitation multiphotonique sont limitées à la microscopie biphotonique (excitation du fluorophore par deux photons).

Dans nos études, nous avons utilisé des microscopes optiques classiques. Ce type de microscope est fait passer la lumière excitatrice soit par l'objectif (microscopie à épifluorescence) soit par en-dessous le spécimen. Ces appareils possèdent des filtres interchangeables disposés soit dans des cubes sur une tourelle rotative soit sur une tirette selon les fabricants. Ces dispositifs filtrent la lumière allant vers l'objectif et allant vers l'observateur ou le capteur, selon les fluorescences recherchées. Ils comportent 2 filtres et un miroir particulier, « dichroïque » qui réfléchit certaines longueurs d'onde et qui est traversé par d'autres. Vers la source se trouve le filtre d'excitation. Du côté observateur se trouve le filtre barrière. Les dispositifs interchangeables sont répertoriés selon les lumières d'excitation: ultraviolet, violet, bleu, vert, etc. Un schéma de fonctionnement d'un microscope à épifluorescence est présenté dans la Figure 36.

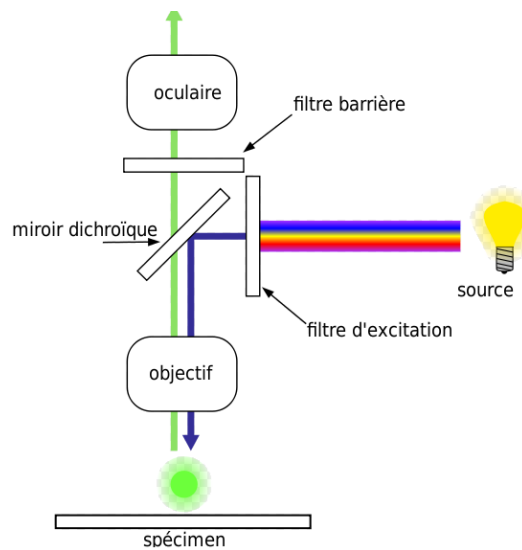


Figure 36 : Schéma du fonctionnement d'un microscope à épifluorescence

Protocole de marquage de filaments d'actine, de la vinculine et des noyaux

Les échantillonsensemencés à raison de 17 000 cellules par pastille, sont retirés au moment choisi (3 heures, 1 jour, 3 jours et 7 jours respectivement). Le milieu de culture est ensuite aspiré

puis on fait des lavages en PBS (3 x 5 min). Les cellules sont ensuite fixées avec du paraformaldehyde (2% dans du PBS, 300µL dans chaque puits) pendant 30 min à température ambiante suivie par une perméabilisation des membranes cellulaires avec du Triton X100 (0.2 dans du PBS, 300µL dans chaque puits) pendant 15 min à TA. Le blocage de sites non spécifiques se fait avec l'ASB (1% dans du PBS) 15 min à TA. Après 3 lavages, la phalloïdine couplée au TRITC (chaude à 37 °C) et/ou l'anticorps anti-vinculine couplé à FITC sont ajoutés sur les cellules. Après 45 min d'incubation à 37 °C, le milieu est aspiré puis les cellules sont incubées avec la solution de DAPI (chaude à 37 °C) durant 10 min à TA.

Après 3 lavages en PBS, les échantillons sont placés sur des lamelles microscopiques et montés avec une goutte de glycérol/PBS (50 :50) pour les études de microscopie en fluorescence.

2.2.10.3. ETUDES MORPHOLOGIQUES ET D'ADHERENCE CELLULAIRE PAR MICROSCOPIE A BALAYAGE

Protocole de préparation des échantillons pour MEB

Les échantillonsensemencés à raison de 17 000 cellules par pastille, sont retirés au moment choisi (4 heures, 1 jour, 3 jours et 7 jours respectivement). Le milieu de culture est aspiré puis des lavages à TA en PBS (3 x 5 min) sont réalisés. Les cellules sont ensuite fixées avec le fixateur électronique (paraformaldehyde 2%, glutaraldehyde 4% dans du NaK₂PO₄) pendant 30 min à TA.

Après un rinçage d'au moins 2 h dans du tampon NaK₂PO₄ (17%), les cellules sont déshydratées dans des bains successifs d'alcool : 50% - 70% - 80% - 95% - 100% (avec 2-3 bains de 5 minutes pour chaque alcool) suivie par des bains d'HMDS (hexamethyldisilazane) 50% (avec alcool éthylique 100%) et 100%, (bains de 10 min). L'HMDS est ensuite retiré et laissé évaporer sous la hotte jusqu'à déshydratation complète.

2.2.10.4. TESTS DE PROLIFERATION AU MTT ET PAR COMPTAGE DIRECT

Le test MTT est une méthode rapide de numération de cellules vivantes. Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). Le cycle de tétrazolium qu'il contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu-violet. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test mais aussi à leur activité métabolique.

Protocole

Les cellules sontensemencées sur les échantillons, à raison de 17 000 cellules par puits, dans du milieu, puis placées à 37 °C. Au moment choisi (4 heures, 1 jour, 3 jours et 7 jours respectivement), les échantillons sont résupérés et placés dans une plaque 24 puits propre. Puis, on ajoute 1 mL de MTT (MéthylThiazoleTétrazolium ou bleu de Thiazole, Sigma M5655), 10X dilué dans du PBS chaud (37°C). Les plaques de cultures sont placées à 37°C pendant 3 heures au bout desquelles la solution de MTT est éliminée par aspiration. Les cellules sont lysées par 1 ml d' HCl 0,1N dans de l'isopropanol anhydre libérant ainsi le MTT réduit par les déshydrogénases mitochondriales. On agite 10 min pour homogénéisation.

La densité optique lue à 570 nm est proportionnelle au nombre de cellules vivantes ayant adhéré aux différents substrats.

2.2.10.5. TESTS DE DIFFERENCIATION

Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)

La phosphatase alcaline (ou PAL) est une enzyme, c'est-à-dire un catalyseur biologique, une substance capable d'accélérer une réaction chimique. C'est une enzyme hydrolytique, qui détache les groupements phosphates en position 5- et 3- de plusieurs types de molécules telles

que les nucléotides, les protéines et les alcaloïdes. Ce processus est appelé déphosphorylation. Comme leur nom l'indique, les phosphatases alcalines agissent à des pH supérieurs à 7 (milieu alcalin).

Les phosphatases alcalines sont normalement présentes dans le sang, et sont en partie éliminées par la bile. Les PAL osseuses sont augmentés dans le sang dans le rachitisme et l'ostéomalacie entre autres. Dans l'os, la PAL est l'enzyme qui catalyse la fixation du phosphate de calcium au tissu osseux. Il est le marqueur de la formation osseuse le plus fréquemment utilisé. Il peut manquer quelquefois de sensibilité et de spécificité notamment dans l'ostéoporose. Cependant, le dosage de la phosphatase alcaline osseuse constitue un marqueur biochimique sensible de l'augmentation du remodelage osseux.

Cette méthode utilise du 4-nitrophenylphosphate comme substrat. En conditions optimisées, la PAL présente dans l'échantillon catalyse la réaction de transphosphorylation suivante :



ou : 4-NPP = 4-Nitrophénylphosphate, 4-NPO = 4-Nitrophénoxyde, AMP = 2-Amino-2-méthyl-1-propanol.

Au pH de la réaction, le 4-nitrophénoxyde a une couleur jaune intense. Le réactif contient également un système de tampon d'ion métallique qui garantit la conservation des concentrations optimales en zinc et en magnésium. Le tampon d'ions métalliques peut également chélater d'autres ions potentiellement inhibiteurs pouvant être présents. La réaction est suivie en mesurant le taux d'augmentation de l'absorbance à 405 nm qui est proportionnelle à l'activité PAL dans le sérum.

Protocole

Les échantillons ensemencés à raison de 17 000 cellules par pastille, sont retirés au moment choisi (7, 14, 21 jours respectivement) puis transférés dans une plaque 24 puits propre. Après des rinçages avec du PBS chaud (37 °C), on ajoute dans chaque puits 150 µL de Triton X100 (0.5% dans H₂O), 150 µL de solution substrat et on incube à 37 °C pendant 30 min. On ajoute ensuite 150 µL de solution blocage avant de mesurer à l'absorption à 405 nm. Des contrôles (sans échantillons) sont faits dans des puits séparés pour normaliser l'activité PAL.

Dosage du procollagène de type I

Le collagène fait part de la famille des protéines fibreuses de la matrice des tissus conjonctifs. Ces protéines ont pour fonction de conférer aux tissus une résistance mécanique à l'étirement. Le collagène n'a pas sa place dans les cellules et c'est pourquoi sa synthèse s'effectue à partir d'une molécule précurseur présente dans les cellules, le procollagène. Celui-ci est constitué de brins plus longs, rallongés par des structures polypeptidiques supplémentaires, de 15 kDa du côté aminoterminal et de 30 kDa du côté carboxyterminal. Ces structures portent le nom de propeptides. A l'extrémité carboxy-terminale existent des ponts disulfures intercaténaux à rôle stabilisateur. Les ponts sont intracaténaux à l'extrémité aminotermine. La détection quantitative de la synthèse de collagène a été rapportée par Taubman et al (1974) qui a réalisé une analyse radio-immunologique compétitive pour le procollagène de type I (PIP) en utilisant des anticorps polyclonaux. Lorsqu'un ostéoblaste est en activité il produit une molécule de collagène de type I qui va être incorporée à la masse osseuse. Il libère en même temps une molécule de propeptide aminotermine et C terminale. Il est donc possible de doser ces marqueurs de la formation osseuse par des méthodes immunologiques.

Le kit utilisé (Takara, MK101) est basé sur une méthode d'immunomarquage enzymatique *in vitro* (enzyme immunoassay – EIA) pour la détermination quantitative du PIP dans le plasma humain, bovin ou canin, dans le sérum, ou dans des extraits cellulaires, des surnageants ou des fluides biologiques. Le principe du kit est basé sur une méthode sandwich qui utilise deux

anticorps monoclonaux de souris anti-PIP pour détecter le PIP par une procédure one-step. Un des anticorps monoclonaux a été revêtu sur la surface des puits dans une plaque et bloqué contre les liaisons non-spécifiques. Les échantillons, les contrôles standards et les anticorps anti-PIP marqués à la peroxydase (POD) sont simultanément ajoutés dans les puits de la plaque et ensuite incubés. Pendant l'incubation, le PIP est lié aux anticorps anti-PIP (phase solide) sur une face et tagué par un anticorps anti-PIP POD sur l'autre. La réaction entre la POD et son substrat (H_2O_2 et tetraméthylbenzidine) induit une coloration à l'intensité proportionnelle à la quantité de PIP présente dans l'échantillon et le contrôle respectivement. Le PIP est quantifié par la mesure de l'absorbance en utilisant un lecteur de plaque EIA. La justesse des concentrations d'échantillons peut être déterminée par comparaison avec les absorbances spécifiques des contrôles standards reportées sur un graphique standard. Le schéma de principe de la procédure EIA est présenté ci-dessous (Figure 37).

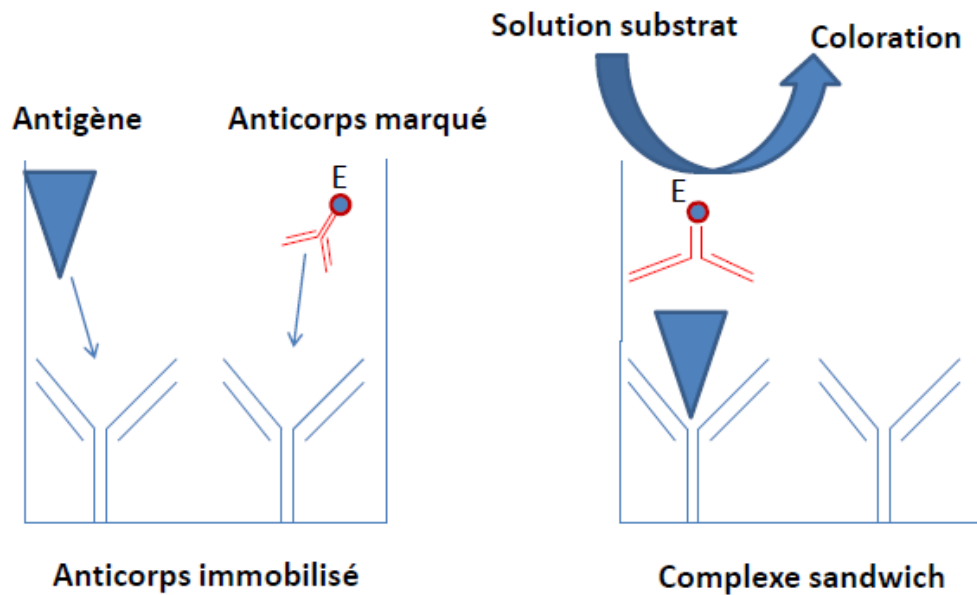


Figure 37 : Schéma de principe du test EIA pour la détection du procollagène

Protocole

Les échantillonsensemencés à raison de 17 000 cellules par pastille, sont retirés au moment choisi (14 et 21 jours respectivement). On transfère les spécimens dans une autre plaque et on garde le milieu de culture (échantillon).

Les matériels à notre disposition fournis par le kit sont :

1. Une plaque de 96 puits recouverts par l'anticorps monoclonaux murin anti PIP + matériel de blocage ;
2. Un tube (2) qui contient un anticorps conjugué au POD lyophilisé ;
3. Un tube (3) qui contient la solution standard (640 ng lyophilisé de PIP standard).
4. Un tube (4) qui contient une solution tampon pour la dilution du tube 3;
5. Un tube (5) qui contient la solution substrat (hydrogène-peroxydase + tetramethylbenzidine dans une solution tamponnée).

On ajoute 100 µl de solution de l'anticorps conjugué POD par puits dans la plaque 1. Ensuite on ajoute 20 µl de l'échantillon. On agite et on recouvre la plaque avec un film adhésif afin d'éviter l'évaporation. La plaque est ensuite incubée à 37 °C pendant 3 heures. On retire le surnageant par aspiration et on continue avec des lavages (4X) avec du PBS. A la fin, on retourne la plaque et on la tape vigoureusement sur une serviette en papier propre. On rajoute 100 µl/puits de solution substrat et on fait une autre incubation à TA pendant 15 minutes. On ajoute la solution stop et on mélange doucement. La lecture de la densité optique doit se fait rapidement (pour la protection contre la lumière) et l'absorbance de la solution est mesurée à 450 nm.

Dosage de l'ostéocalcine (OC)

L'ostéocalcine (OC) est une protéine non-collagénique spécifique des tissus osseux. Cette hormone trouvée dans l'os et la dentine est sécrétée par les ostéoblastes et favorise la fixation du calcium à la substance fondamentale (l'ensemble des protéines sur lesquelles se fixent les sels minéraux pour former différents tissus conjonctifs). L'OC contient deux ou trois résidus γ -carboxyglutamates, a une masse moléculaire de 5900 Da et est connue pour être une protéine avec une forte affinité au calcium et dépendante de la vitamine K. Elle est donc souvent utilisée

comme marqueur des ostéoblastes. Les trois résidus glutamates sont des résidus carboxyles et forment une poche qui permet à l'OC de se lier à la matrice osseuse. Pendant le métabolisme de l'os, l'OC est libéré de la matrice osseuse par l'activité des enzymes. Au cours de la libération de l'OC de l'os dans le sang, la plupart des résidus glutamates de l'OC sont décarboxilés (Glu-OC). Par conséquent, l'OC est présente dans le sang sous les deux formes Gla (carboxylée) et Glu (décarboxylée) et constituée par des spécimens moléculaires divers, entiers ou fragmentés.

Le kit utilisé (Takara, MK146) est également basé sur la méthode EIA et utilise un anticorps de rat dirigé contre la partie C terminale de l'OC. Cet anticorps a une interférence minimale avec l'OC bovine ou de lapin. De plus, un anticorps monoclonal spécifique des positions 21 et 24 des résidus Glu-OC est utilisé pour une détection plus sensible dans les surnageants ou les fluides biologiques. Le principe du dosage est basé sur une méthode sandwich similaire à celle précédemment décrite pour la détection du procollagène. Un schéma du principe est présenté dans la Figure 38.

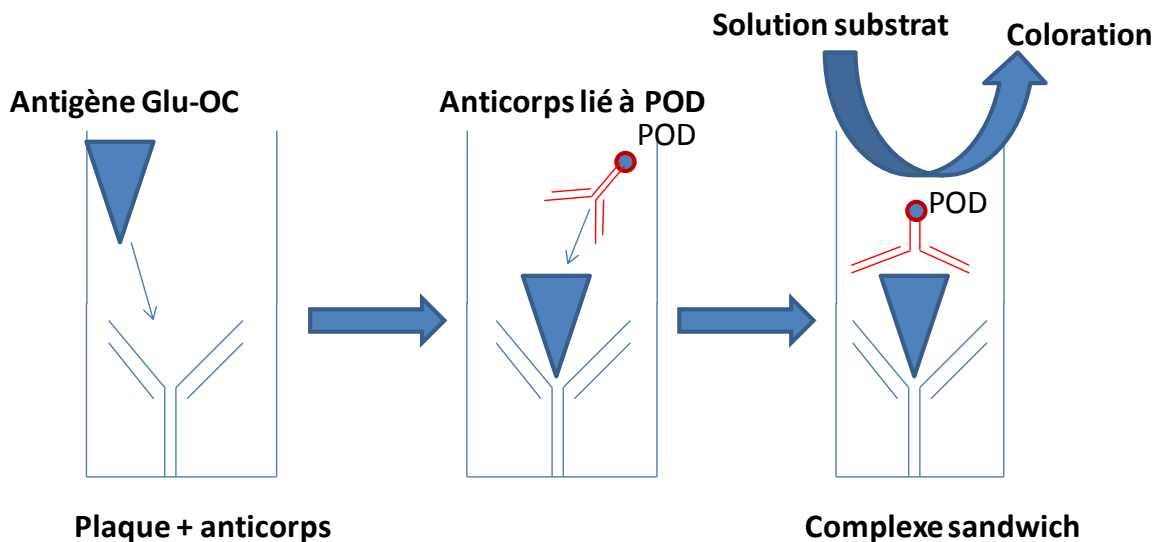


Figure 38 : Le schéma du principe EIA pour la détection de l'OC

Protocole

Les échantillons ensemencés à raison de 17 000 cellules par pastille, sont retirés au moment choisi (14 et 21 jours respectivement). On transfère les spécimens dans une autre plaque et on conserve le milieu de culture (échantillon).

Les matériels à notre disposition fournis par le kit sont :

1. Une plaque de 96 puits recouverts par l'anticorps monoclonal anti OC de rat + matériel de blocage ;
2. Un tube (2) qui contient un anticorps monoclonal Anti-Glu-OC conjugué au POD lyophilisé ;
3. Un tube (3) qui contient la solution standard (8 ng lyophilisé de Glu-OC de rat).
4. Un tube (4) qui contient une solution tampon pour la dilution du tube 3;
5. Un tube (5) qui contient la solution substrat (tetramethylbenzidine dans une solution tamponnée).

On ajoute 100 µl de l'échantillon solution + solution standard. On agite la plaque puis on la recouvre la plaque avec un film adhésif avant de l'incuber à TA pendant 2 heures. On enlève le surnageant et on procède à des lavages (3X) avec du PBS. On vide la plaque en la tapant vigoureusement sur une serviette en papier absorbant. On rajoute 100 µl/puits de la solution anticorps conjugué au POD et on agite. On recouvre de nouveau la plaque par un film avant de l'incuber à TA pendant 1 heure. On enlève ensuite le surnageant avant de faire les lavages (4X) avec du PBS. On retire toute trace de liquide par tapotage sur une feuille absorbante. Ensuite, on rajoute 100 µl de solution substrat et on incube à TA pendant 15 minutes. Finalement, on ajoute la solution stop et on mélange doucement. La lecture de la densité optique se fait rapidement après la fin de l'essai et à 450 nm.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. CONSTRUCTION DES BICOUCHES HYBRIDES HA/PROTEINES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE PAR PLD ET MAPLE

Le but de la thèse est de créer une structure de type implant capable de mimer les caractéristiques du tissu osseux. L'intégration de l'hydroxyapatite synthétique dans le tissu osseux viendrait en fait de sa capacité d'adsorption de protéines sériques adhésives (Wilson CJ et al., 2005 ; Kilpadi et al, 2001) ou de séquences peptidiques (Segvich SJ et al., 2009 ; Addison WN et al., 2010). La meilleure adhérence de précurseurs ostéoblastiques sur l'hydroxyapatite par rapport au titane est ainsi directement corrélée à une adsorption plus importante de fibronectine et de vitronectine sur la céramique, cette adsorption impliquant la reconnaissance de récepteurs cellulaires spécifiques (Wilson CJ et al., 2005). De plus, une inhibition compétitive de la reconnaissance de la fibronectine et de la vitronectine (avec des anticorps Anti- α V intégrine) diminue l'étalement cellulaire sur l'hydroxyapatite, mais pas sur le titane (Matsuura et al, 2000), confirmant l'intervention de mécanismes cellulaires spécifiques à l'origine de la meilleure biocompatibilité de l'hydroxyapatite.

Le rôle essentiel de la chimie de la surface sur l'adsorption des protéines (Llopis-Hernández V et al., 2011) peut être augmenté par la topographie. Il est confirmé qu'une surface structurée à l'échelle nanométrique favorise l'adsorption des protéines (Scopelliti PE et al., 2010) ainsi que la réponse des cellules et bactéries (Anselme K et al., 2010).

Notre objectif est de réaliser des revêtements bioactifs qui interagissent de manière permanente avec les cellules osseuses. Cette structure est basée sur le titane, le matériau le plus apprécié et le plus utilisé dans l'orthopédie grâce à ses qualités mécaniques et de biocompatibilité incontestables. Comme décrit précédemment, l'hydroxyapatite en tant qu'une couche intermédiaire a permis l'amélioration des surfaces de titane. Nous avons donc choisi de recouvrir le titane avec une couche nanostructurée d'HA par PLD, avec un protocole bien maîtrisé (Mihalescu IN et al, 2010 ; Sima F et al, 2011E), pour mimer les caractéristiques de la phase

minérale de la matrice osseuse. La nouveauté de nos études a été le recouvrement de la structure Ti/HA par une couche de protéines avec un potentiel très fort d'attachement au tissu. Ainsi, pour améliorer l'intégration de l'implant, des dépôts par MAPLE de fibronectine et de vitronectine, deux protéines de la matrice extracellulaire reconnues pour leur capacité à accélérer l'adhésion des cellules osseuses, ont été faits sur la couche inorganique d'HA, pour former des structures bicouches Ti/HA/FN et Ti/HA/VN respectivement. Une représentation schématique de ces bicouches est montrée dans la Figure 39.

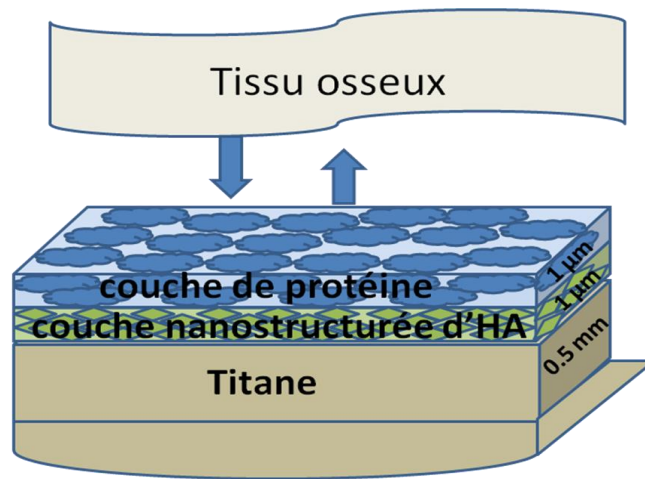


Figure 39 : Structure d'un implant basé sur du Ti recouvert par des couches hybrides HA nanométrique – protéines en interaction avec le tissu osseux

Pour évaluer nos structures, il est essentiel d'avoir des contrôles. Ainsi, nous avons utilisé dans nos études des structures Ti/HA/ASB (ASB est connue comme une protéine inerte en termes d'interaction avec les cellules) obtenues par le même protocole (dépôts de HA par PLD et d'ASB par MAPLE). Des structures Ti/HA et du Ti ont aussi été utilisés comme contrôle.

3.1.1. TRANSFERT D'HA PAR PLD SUR DES SUPPORTS DE TITANE. ANALYSE DE LA MORPHOLOGIE ET DE LA COMPOSITION DES COUCHES D'HA

Les premiers tests se sont concentrés sur la recherche des paramètres optimaux de dépôts de couches minces nanostructurées d'HA par PLD de point de vue physico-chimique (composition,

morphologie) mais aussi sur leur comportement en interaction avec les cellules. Le but était de trouver une couche d'HA d'une bonne qualité morphologique (homogène et uniforme) capable de permettre une conformation correcte de la protéine projetée par MAPLE au dessus. En même temps, notre objectif était d'avoir une rugosité contrôlable de la couche inorganique pour éviter le facteur morphologie dans les interprétations ultérieures pendant les études biologiques sur les structures bicouches.

Dans nos études récentes, nous avons observé un comportement différent des cellules humaines ostéoprogénitrices en fonction de la morphologie d'une surface d'HA. En modifiant la porosité du substrat à recouvrir, nous avons pu mettre en évidence une morphologie différente de la couche d'HA déposée par PLD (Sima F. et al., 2009A). Cette légère modification a tout de même modifié l'adhésion des cellules HOP (Sima F. et al., 2011E). Suite à cette observation, nous avons cherché un protocole permettant de conserver une reproductibilité assez importante dans la préparation des centaines d'échantillons.

La littérature qui concerne les couches minces d'HA obtenues par ablation laser est vaste et nous a permis de choisir facilement les meilleurs paramètres pour nos études. Ainsi, une étude a concerné en particulier l'adhésion de couches minces d'HA obtenues par ablation avec un laser à excimère KrF*. Dans cette investigation, l'intervalle d'intérêt pour les épaisseurs obtenu par la modification du nombre d'impulsions était de 170 à 1500 nm (Fernandez-Pradas J.M. et al., 2001). La morphologie des couches était composée généralement par des particules sous forme de grains et de gouttelettes. Pendant la croissance de la couche les particules augmentaient en taille et en nombre, ce qui masquait partiellement les gouttelettes en développant une structure colonnaire. La couche la plus fine était composée plutôt par des phosphates de calcium amorphes. La couche d'environ 350 nm d'épaisseur contenait déjà de l'HA tandis que les couches épaisses étaient composées d'HA et de phosphate alpha tricalcique. Des tests de griffures sur la couche mince déposée ont montré un résultat intéressant. Une défaillance cohésive a été observée pour les couches très minces tandis qu'une défaillance adhésive a été observée pour les couches plus épaisses. Pour cette raison, nous avons choisi d'utiliser dans nos études des couches d'environ 1 μm qui présentent une bonne stabilité au substrat.

D'autres paramètres importants sont la fluence laser et la température du substrat. Des couches minces d'HA ont été réalisées par PLD à température ambiante à trois fluences différentes: 4, 5 et $6\text{J}/\text{cm}^2$ (Katto M, 2007). La quantité de poly-cristaux d'HA est plus importante au fur et à mesure que la fluence laser augmente. Une autre étude a montré que la combinaison de la PLD avec un traitement thermique à $300\text{ }^\circ\text{C}$ a le potentiel de produire des couches minces d'HA pures, adhérentes et cristallines qui ne se dissolvent pas dans un milieu simulé (Dinda GP et al., 2009).

Dès les années 2000, l'activité et la morphologie des cellules ostéoblastes a été évalué sur des couches minces d'HA fabriquées par PLD dans des conditions différentes (Ball M.D. et al., 2001). Deux séries d'échantillons avaient été préparés à partir de cibles denses d'HA en utilisant trois fluences différentes: 3, 6 et 9 Jcm^{-2} . Une troisième série était représentée par des échantillons traités à $575\text{ }^\circ\text{C}$ pour améliorer la cristallinité des couches. Des ostéoblastes primaires ont été cultivées sur les structures obtenues et l'organisation du cytosquelette (les filaments d'actine) a été examinée par microscopie confocale à balayage laser. L'activité cellulaire a été trouvée augmentée sur les structures traitées thermiquement. Les cellules présentaient un meilleur attachement et une organisation des filaments d'actine mieux définie que sur les structures non traitées. De plus, les résultats ont été améliorés également avec la fluence. Une augmentation de l'activité cellulaire avec la fluence a été trouvée. La production de la phosphatase alcaline a été d'ailleurs étudiée et rapportée aux conditions de dépôts. En définitive, les surfaces optimales pour l'attachement et la prolifération des ostéoblastes ont été mises en évidence sur les structures HA obtenues à la fluence de 9 Jcm^{-2} (la plus élevée) et traités à 575°C .

Nous avons aussi cherché dans nos dépôts de couches minces de HA par PLD un régime qui nous permettait d'obtenir une surface d'une bonne qualité de point de vue de la rugosité, reproductible d'une structure à l'autre, et dont la composition reste inchangée. Nous avons tenté d'optimiser les surfaces d'HA en modifiant le paramètre laser le plus important, la fluence. Nous avons observé une modification drastique de la surface avec la croissance de la fluence. Dans les images MEB de la Figure 40, il apparaît que les couches formées aux fluences basses présentent beaucoup d'irrégularités (gouttelettes) qui disparaissent aux fluences les plus élevées. Serra P et al (1998) ont démontré la présence de deux composants (fronts) émissifs séparés dans le plasma

d'HA avec un retard d'une ms derrière l'impulsion laser. L'intensité de l'émission relative entre les deux composants dépend fortement de l'intensité de fluence et ensuite des vitesses d'expansion. Les spectres enregistrés ont relevé des espèces moléculaires prédominantes sur les espèces atomiques aux fluences réduites tandis qu'aux fluences plus élevées, les espèces atomiques deviennent prépondérantes. Aussi, les composants du premier front de plasma sont en majorité des atomes tandis que des radicaux moléculaires excités forment le deuxième front. Une fluence (la densité de l'énergie sur la surface irradiée) élevée représente un flux de chaleur supérieur (Eq. 16) à la surface de la cible et une vaporisation meilleure du matériau (Eq. 16, 18 et 19). C'est la raison pour laquelle la croissance des couches d'HA sur les substrats de Ti se fait par la condensation des espèces atomiques dans le cas des ablations aux fluences élevées tandis qu'aux fluences réduites ce sont aussi des grandes particules (espèces moléculaires) qui arrivent sur la surface.

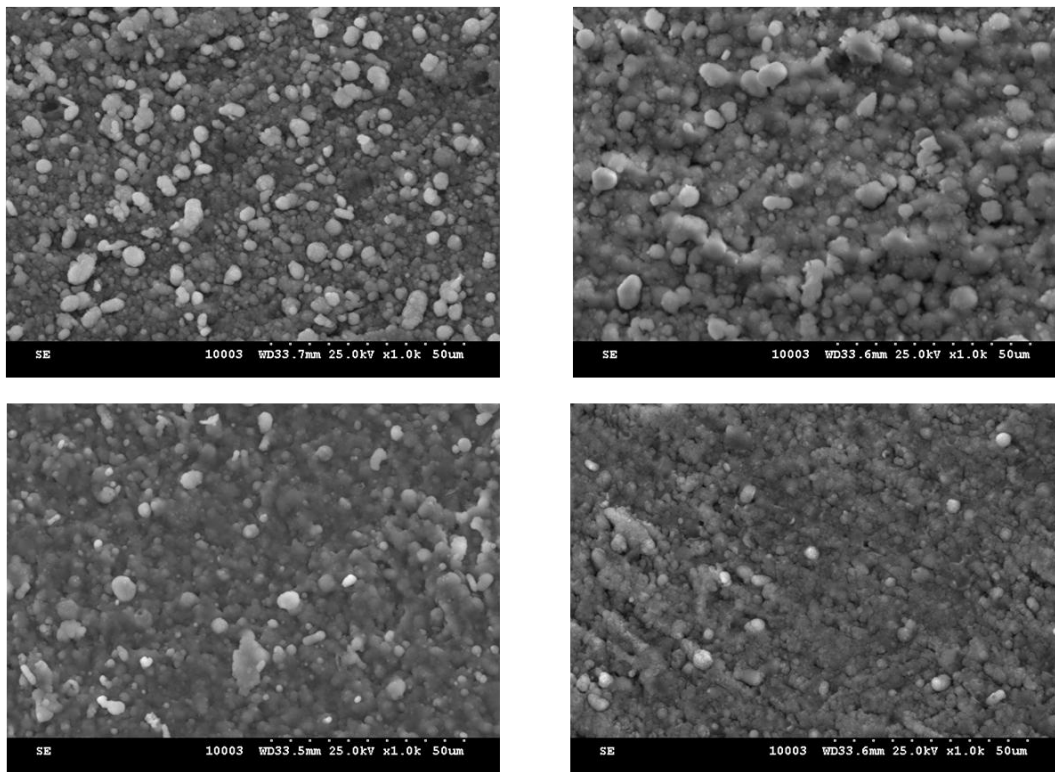


Figure 40 : Images MEB de la couche d'HA obtenue par PLD sur Ti aux différentes fluences laser: (a) 2, (b) 3, (c) 5 and (d) 7.5 J/cm²

La continuité des études s'est focalisée sur les surfaces d'HA obtenues aux fluences les plus élevées (7.5 J/cm^2 , le maximum possible avec un laser KrF*, COMPEXPro 205). La rugosité de ces surfaces mesurée par AFM a été maintenue scrupuleusement dans un intervalle de 370-400 nm. Une image AFM typique est reproduite dans la Figure 41 dans les modes profondeur et phase respectivement. On distingue ainsi une surface homogène, avec une structure en «choux-fleurs», composée par un assemblage de gouttelettes (Sima F et al., 2011D).

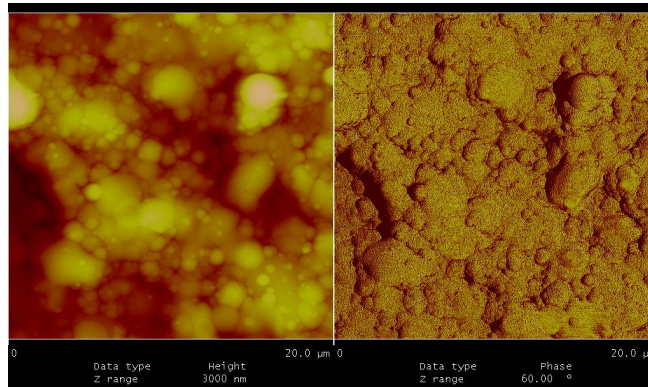


Figure 41 : Image AFM de la couche d'HA obtenue par PLD sur Ti à une fluence de 7.5 J/cm^2

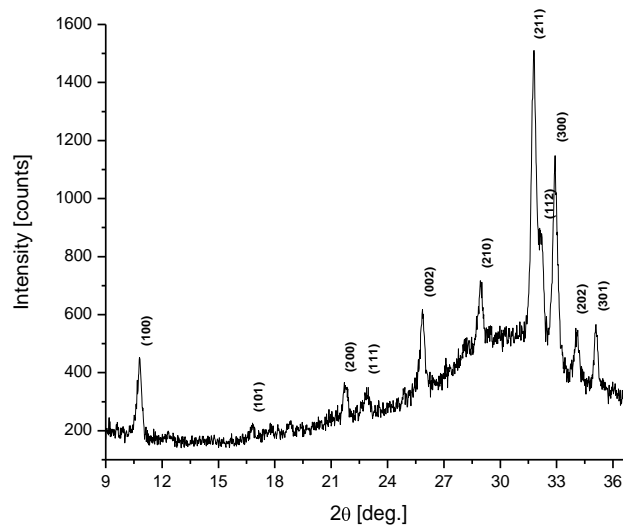


Figure 42 : Spectre DRX de la couche d'HA obtenue par PLD sur Ti à une fluence de 7.5 J/cm^2

Les échantillons Ti/HA ont été soumis à un traitement thermique en vapeurs d'eau pendant 6h à 400 °C. Le chauffage du substrat à 400 °C pendant les manipulations PLD suivi d'un traitement thermique est un régime plus doux que celui utilisé par Ball M.D. et al., mais qui nous a permis de conserver une composition polycristalline des couches d'HA. Un spectre DRX caractéristique des couches d'HA est donné dans la Figure 42 sur lequel les pics caractéristiques de l'HA sont identifiés.

3.1.2. LE TRANSFERT LASER DES PROTEINES PAR MAPLE: MECANISME ET DISTRIBUTION

Le mécanisme du transfert laser

Bien que l'optimisation du MAPLE ait bien avancé dans les dernières années, un protocole expérimental général pour l'éjection, le transfert et le dépôt de polymères (biomolécules), doit encore être établi. La difficulté consiste dans la variété des matériaux mais aussi dans leur complexité structurale et compositionnelle.

La compréhension du mécanisme d'éjection est encore limitée à présent. Un mécanisme photothermique est souvent évoqué (Chrissey DB et al., 2003), illustré par le terme « évaporation » dans l'acronyme MAPLE. Conformément à ce modèle, l'énergie laser est absorbée par la matrice (le solvant gelé) et convertie en énergie thermique, ce qui produit la vaporisation de la matrice et l'éjection de la molécule dissoute. Ce mécanisme semble expliquer quelques aspects du MAPLE mais d'autres ne sont pas encore compris. Par exemple, dans le cas des solvants qui ne sont pas sensibles aux photons UV, l'éjection des biomolécules est plutôt attribuée à l'expulsion de produits gazeux et de fragments de photolyse des molécules mères (mécanisme photochimique). Un mécanisme alternatif pourrait être l'éjection photomécanique (spallation). Cependant, cette contribution n'est que modérée dans le cas des lasers UV à cause du faible stress induit (pression développée réduite) dans la cible. Un modèle de bouillonnements explosifs basé sur des simulations en Dynamique Moléculaire a été proposé en considérant les phénomènes thermodynamiques impliqués (Zhigilei L.V et al., 2003). Dans ce cas, on a supposé que la vaporisation normale est trop lente pour être significative aux échelles de temps de l'ordre des nano-microsecondes. Ainsi, la température du système (région irradiée de la cible) s'amplifie

avec la fluence laser en produisant une région surchauffée. A une certaine température une vaporisation (explosion) violente se produit quand le système est éjecté de la cible sous forme de gaz et gouttelettes.

Dans nos expériences MAPLE le solvant utilisé est de l'eau distillée. La solution est complétée par du TRIS et du NaCl pour la stabilisation de la protéine. Comme connu et comme on voit dans la Figure 43 l'eau distillée n'absorbe pas fortement à la longueur d'onde du laser employé (248 nm) tandis que le TRIS, le NaCl ou les protéines absorbent plus énergiquement. De plus, on observe que les solutions congelées sont les plus absorbantes très probablement à cause des absorbances supplémentaires liées aux imperfections, aux interstices d'air ou même aux crevasses dans la cible gelée (Petrovich DK et al., 2002).

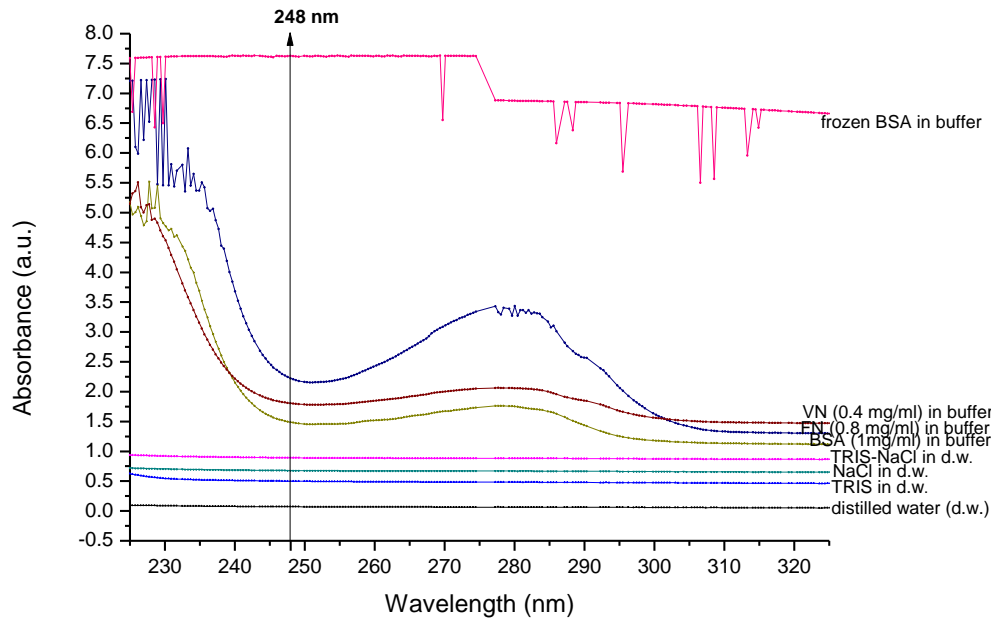


Figure 43: Les spectres d'absorption des matériaux en solution utilisés dans nos études

A première vue, dans ce cas l'eau n'est pas le solvant idéal ou la longueur d'onde utilisée n'est pas la meilleure. En effet, dans le MAPLE, le solvant est généralement choisi très absorbant à la longueur d'onde choisie pour une protection supplémentaire du matériau organique et la prévention de sa décomposition chimique. Cependant, avec l'eau comme solvant, certaines études ont démontré et expliqué le transfert protégé de matériaux organiques (Gyorgy E et al.,

2009A) et même la conservation de l'intégrité et de la fonctionnalité des structures immobilisées sur divers collecteurs (Sima F et al., 2011D, Gyorgy E et al., 2009B).

Une absorption multi-photon a été attribuée à des matrices d'eau givrées suite à l'interaction avec un faisceau laser à la longueur d'onde de 248 nm (Nishi N et al., 1984). Cependant, l'efficacité d'éjection des molécules de l'eau a été trouvée beaucoup plus faible que dans nos expériences dans des conditions comparables d'intensité laser. Dans ce cas, l'excitation électronique de la matrice gelée est produite par un processus d'absorption de deux photons étant donné que le seuil d'émission photo-électronique de la glace est de 10 eV (Rodrigo K et al., 2005; Delahay P et al., 1981). Ce processus devient dominant pour des intensités laser doublées (Rodrigo K et al., 2005). Cependant, pour des intensités laser similaires à nos études, l'éjection des molécules d'eau est plutôt attribuée aux formations d'excitons par absorption multiphoton dans la proximité des imperfections. L'énergie des excitons est transmise aux molécules d'eau faiblement liées qui se désorbent mais ce processus s'arrête après quelques impulsions laser (Bergeld J et al., 2006).

L'ablation photo-thermique est aussi exclue. Elle se produit à des intensités comparables à nos études mais pour des épaisseurs (profondeur) de surface irradiée de 1nm seulement (Ellegaard O et al., 1998). Pour des épaisseurs de plus de 2 μ m l'effet thermique disparaît complètement (Nishi N et al., 1984).

En définitive, nous proposons pour nos expériences un modèle d'interaction mixte où des mécanismes d'absorption non-homogènes sont impliqués (Esenaliev RO et al., 1994). Les molécules de protéines et de tampon et les clusters potentiels (groupement de protéines+sels formés pendant la congélation) présents dans la solution congelée absorbent à leur surface (la couche superficielle) l'énergie du faisceau UV, ce qui fait chauffer les molécules d'eau limitrophes et à la surface de la cible. A une pression dynamique de 6.5 Pa seulement, l'eau arrive à bouillir à la température de la chambre. Ainsi, les vapeurs d'eau sont dirigées à la normale de la cible emportant des molécules de protéines et de tampon sur les collecteurs placés devant ou parallèlement à la cible (Gyorgy E et al., 2009A; Smausz T et al., 2009).

A une distance de séparation cible-collecteur bien établie, à une fluence laser et à une pression dynamique dans la chambre de réaction optimales, les molécules d'eau sont aspirées par le système de pompage afférent pendant que les molécules, clusters de protéines et de tampon qui se sont développées dans la matrice irradiée arrivent et condensent sur le collecteur (Leveugle E et al., 2007). Après un certain nombre d'impulsions, l'amas de différentes molécules commence à s'organiser suite à la coalescence des clusters en formant une couche mince. Cette organisation dépend du type de substrat, de sa température mais aussi des composants de la matrice. Dans nos expériences, une température de 30 °C maintenue pendant les dépôts sous vide permet d'améliorer l'adhésion des molécules et en même temps d'évaporer l'eau qui accompagne les protéines à la surface des collecteurs. Un schéma du dispositif de dépôt MAPLE est présenté sur la Figure 44.

La distribution des protéines sur les collecteurs

Pour trouver les paramètres optimaux de dépôts et en vue d'améliorer la distribution sur les collecteurs, des expériences contrôlées ont été effectuées sur du papier de nitrocellulose (reconnu pour son affinité aux protéines). Les molécules protéiques expulsées de la cible ont ainsi été rassemblées sur des surfaces (aires) de nitrocellulose similaires aux collecteurs utilisés dans les études ultérieures (silicium carré ou titane rond). L'aire recouverte par les molécules de protéines a été révélée après un protocole de marquage avec la solution de Ponceau S (Salinovich O et al., 1986). Dans les figures suivantes sont présentés deux cas de distributions à travers des masques différents. Dans un premier cas (Figure 43) on a utilisé un masque rectangulaire avec les dimensions des plaquettes de silicium (10x10 mm²). Une distance optimale de 3.5 cm a été trouvée comme compromis entre l'efficacité de dépôt et l'uniformité de distribution.

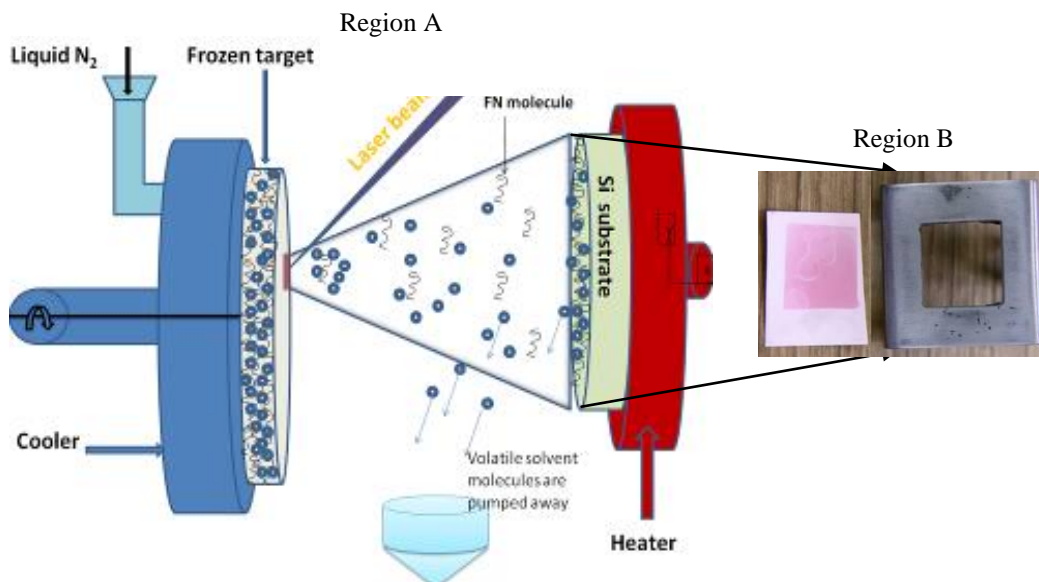


Figure 44: Région A : la représentation schématique du procédé MAPLE. Une solution tampon-protéine est congelée formant une cible solide (gauche). La cible est maintenue réfrigérée avec le dispositif de refroidissement constamment rempli avec de l'azote liquide. Le faisceau laser irradie la cible (au-dessus, centre) en expulsant le matériau qui est ensuite dirigé vers le substrat. Région B : la révélation Ponceau S de la protéine transférée (FN) sur le papier de nitrocellulose à travers un masque rectangulaire.

Dans le deuxième cas (Figure 45A) on a sélectionné un masque permettant d'immobiliser quatre supports de titane ronds de diamètres 12 mm. Pour trouver les conditions de distributions optimales on a aussi fait des essais sur des échantillons de nitrocellulose. On observe que pour une distance de 4 cm, on arrive à recouvrir une aire assez importante avec une distribution homogène du matériau. On bénéficie ainsi de l'avantage de préparer quatre échantillons dans une seule expérience MAPLE.

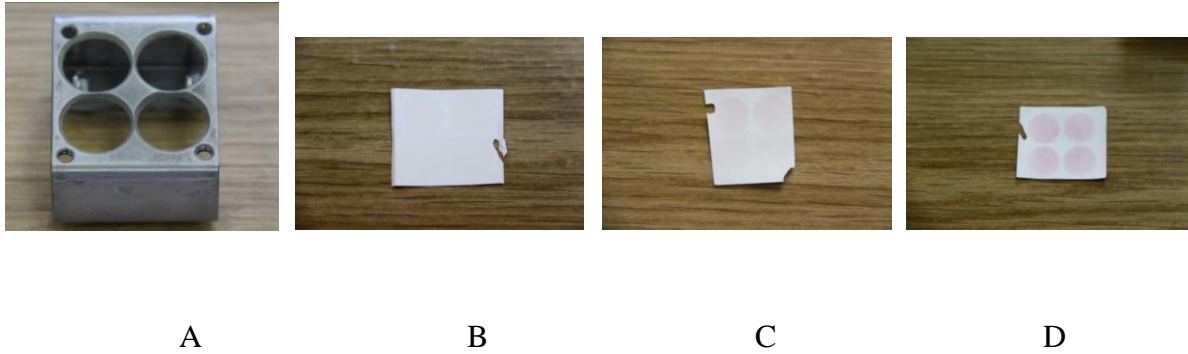


Figure 45: Révélation par le Ponceau S de la protéine transférée (ASB) sur le papier de nitrocellulose à travers un masque présentant quatre ronds de 12 mm de diamètre : le masque utilisé (A), révélation de l'ASB transférée d'une solution à 0.1 mg/ml (B), 0.25 mg/ml (C) et 1 mg/ml (D).

On voit sur la Figure 45 que la quantité de protéine transférée est plus importante (intensité plus forte de la couleur) quand on augmente la concentration de la protéine dans la solution mère. L'explication est donnée par le transfert plus abondant de molécules protéiques à chaque impulsion laser. La limite de détection du marquage Ponceau S sur une membrane de nitrocellulose est sensible pour une quantité inférieure à 250 ng de protéine transférée. On estime que nous arrivons à cette limite dans le premier cas (Figure 45 B). A partir d'une cible de concentration 0.1 mg/ml, nous obtenons quatre aires rondes de 12 mm de diamètre recouvertes par des couches homogènes de moins de 0.25 μ g de protéine (ASB).

Pour détecter des quantités plus réduites de protéines sur nitrocellulose il faudrait utiliser des révélations après marquage avec des anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques des protéines utilisées.

En conclusion, en utilisant des masques spécifiques, il est possible d'obtenir des régions recouvertes par de protéines aux bords bien délimités après le transfert par MAPLE ce qui représente un avantage majeur de la méthode par rapport aux autres, en particulier celles qui utilisent l'immersion des échantillons.

3.1.3. STABILITE DES PROTEINES TRANSFEREES PAR ETUDES DE MOUILLABILITE

La mouillabilité des surfaces (le caractère hydrophile ou hydrophobe) influence l'adhésion cellulaire. Des études avec des fibroblastes ont démontré que les cellules sont bien étalées et présentent des filaments d'actines plus étendus sur les surfaces hydrophiles que sur les surfaces hydrophobes. (Altankov G et al., 1997).

Nos essais de mouillabilité sur les structures PLD et PLD/MAPLE ont mis en évidence un comportement hydrophile de tous les substrats recouverts par rapport au Ti nu. Dans le cas du Ti des angles de contact de 93 – 95 degrés ont été mesurés tandis que pour les autres structures les valeurs d'angle étaient beaucoup plus faibles. Une diminution très importante de l'angle de contact est observée en recouvrant le Ti seulement avec la couche inorganique d'HA (20.6 et 31.44 respectivement pour deux structures similaires) mais aussi après le dépôt des protéines (52.78 pour la FN, 13.39 pour la VN et 40.39 pour l'ASB). Les angles de contacts obtenus pour les structures Ti/HA/FN, Ti/HA/VN et Ti/HA/ASB sont quasiment similaires (25.39, 30.36 et 25.77 respectivement) et raisonnablement reproductibles d'un échantillon à l'autre (25.39 vs 25.87, 30.36 vs 31.92 et 25.77 vs 39.10). On peut ainsi considérer que le facteur mouillabilité n'interviendra pas de manière majeure dans la réponse cellulaire au cours des études *in vitro* à effectuer.

Pour une évaluation préliminaire de la stabilité des couches protéiques sur les substrats de Ti et Ti/HA, nous avons mesuré aussi l'angle de contact d'une deuxième goutte d'eau remise sur la même région (surface) après le séchage de la première. Ceci permet de simuler le comportement de la couche organique dans le milieu de culture cellulaire. On observe une valeur similaire de l'angle de contact sur les couches de FN sur Ti/HA mais pas sur les couches de Fn sur Ti. De plus, une diminution considérable de la valeur de l'angle de contact est mise en évidence après séchage dans le cas des structures Ti/HA/VN. On peut soupçonner qu'une quantité de VN est dissoute dans la goutte et réorganisée à la surface pendant le séchage. On voit cependant une affinité plus forte de la FN que de la VN sur les couches d'HA ce qui signifie probablement

qu'une quantité importante de la protéine est stable sur la surface. Les valeurs des angles de contacts sont collectées dans le Tableau VI ci-dessous.

Tableau VI: Valeurs des angles de contacts des gouttes d'eau sur les échantillons étudiés

Structure	Angle de contact d'une première structure ($^{\circ}$)	Le deuxième angle de contact sur la première structure après séchage ($^{\circ}$)	Angle de contact d'une deuxième structure ($^{\circ}$)
Ti	95.78	88.46	93 $^{\circ}$
Ti/HA	20.60	15.44	31.44
Ti/HA/ASB	25.77	21.54	39.10
Ti/HA/FN	25.39	24.49	25.87
Ti/HA/VN	30.36	21.54	31.92
Ti/FN	52.78	33.89	
Ti/VN	13.39	10.29	
Ti/ASB	40.39		

Quelques images enregistrées par caméra sont présentées dans la Figure 46.

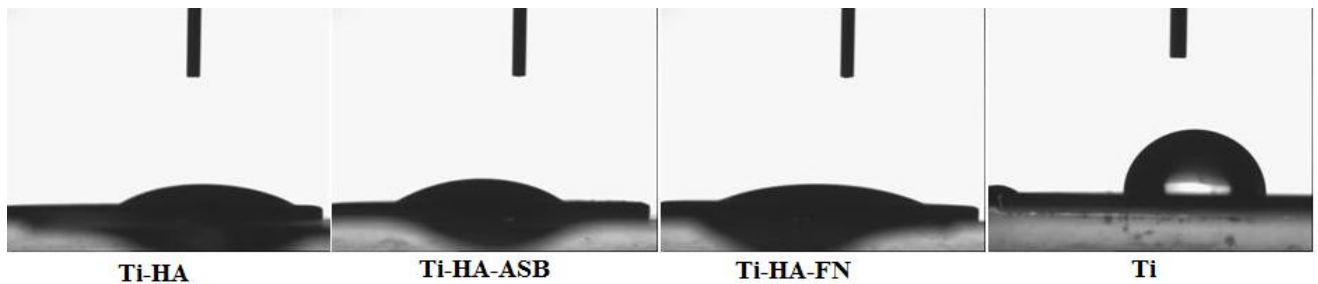


Figure 46 : Images des gouttes d'eau sur des surfaces de Ti et Ti recouvert par HA et protéines

3.1.4. RUGOSITE DES SURFACES PAR PROFILOMETRIE ET ETUDES PAR MICROSCOPIE OPTIQUE DES PROTEINES TRANSFEREES PAR MAPLE

Les tests suivants ont concerné les essais de profilométrie et les investigations optiques des structures transférées. Ces investigations ont été faites sur des structures de protéines déposées par MAPLE sur Silicium. Le Silicium a été choisi à cause de sa rugosité réduite (de l'ordre de quelques nm) (Figure 47).

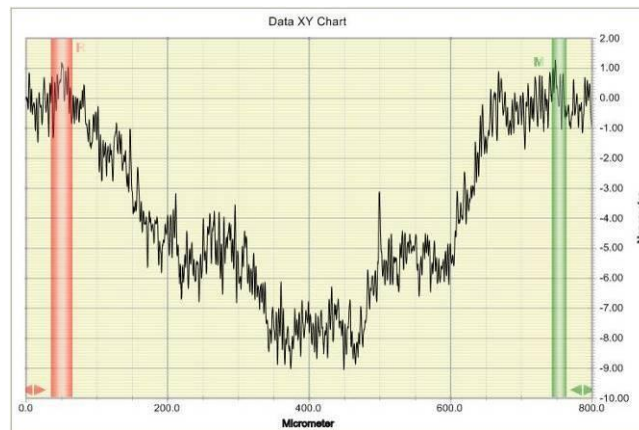


Figure 47 : Rugosité moyenne du Silicium mesurée par profilométrie. On voit que le z maximum est de 9 nm

Nous avons observé une couche très homogène mais rugueuse avec une épaisseur d'environ 453 ± 4 nm après transfert par MAPLE d'une cible qui contenait seulement le tampon salin (Figure 48 B, C). A partir du nombre d'impulsions laser utilisées au cours d'une seule expérience, il est possible d'estimer une épaisseur de dépôt moyenne de $0.3 \text{ \AA}/\text{pulse}$. Une telle petite quantité expulsée par une seule impulsion et déposée sur un collecteur parallèle représente un avantage très important du processus MAPLE par rapport aux autres méthodes de dépôts en solution.

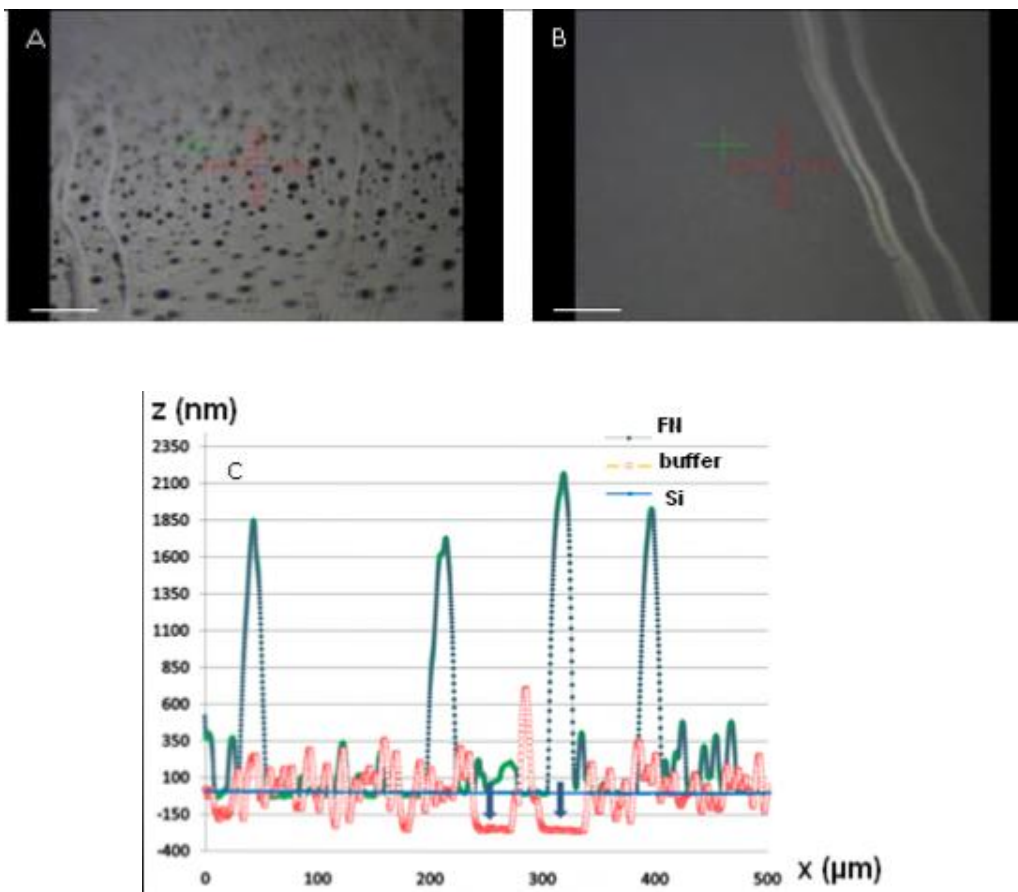


Figure 48 : Images optiques des couches de FN (a) et de tampon (b) obtenues par MAPLE sur Si. Profils des couches de FN et de tampon; l'épaisseur est mesurée par profilométrie (c)

Dans le cas des couches de protéines sur Si, nous avons mis en évidence des couches homogènes, avec des petites gouttelettes disposées dans une configuration aléatoire pour les structures recouvertes avec la FN (Figure 48 A, C) et des tapis plutôt non uniformes pour les recouvrements par la VN (Figure 49). Les profils présentés sur les Figures 47 et 48 mettent en évidence des couches rugueuses pour les deux structures protéiques. Dans le cas des couches de FN, la hauteur des gouttelettes visibles dans les images optiques a été évaluée par profilométrie et estimée entre quelques centaines de nanomètres jusqu'à plus de 1 μm (Figure 48 C). Ce type de gouttelettes est habituel pour les dépôts MAPLE (Rodrigo K et al., 2006 ; Leveugle E et al., 2007). On voit dans la Figure 47A que, dans le cas des couches de FN, les gouttelettes sont immergées dans une matrice compacte et homogène qui forme des couches minces sur toute la surface des substrats après le transfert MAPLE. Par contre, pour les couches de VN, les

gouttelettes sont plus large (Figure 49A) et leur distribution n'est pas homogène sur la surface (Figure 49B). On doit mentionner que la présence de ces particules pourrait représenter un bénéfice dans des applications biomédicales parce qu'elles augmentent la surface active et consécutivement la capacité des implants de s'accrocher aux tissus.

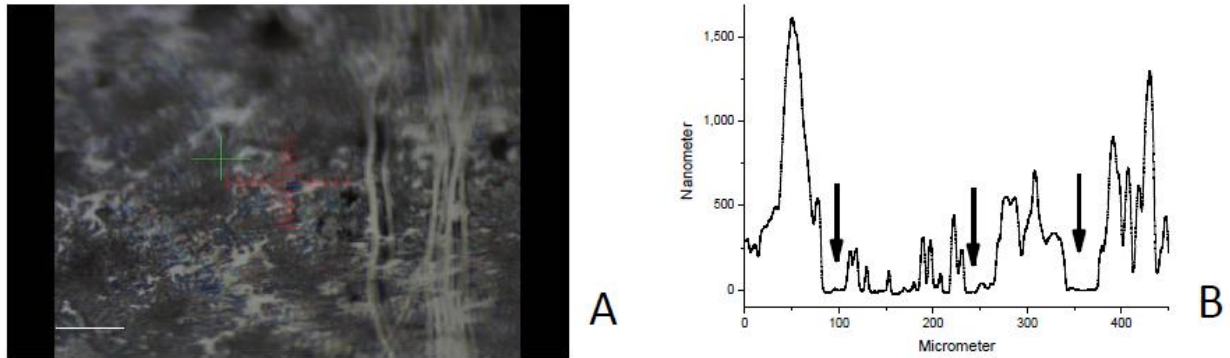


Figure 49 : Images optique de la couche de VN (a) obtenue par MAPLE et son profil (b). L'évaluation de l'épaisseur a été faite par des rayures fines faites dans le dépôt (les flèches en B). On estime une épaisseur de 500 ± 120 nm qui correspond à un dépôt de $0.3 \pm 0.08 \text{Å}$ par pulse laser.

3.2. ETUDES STRUCTURALES ET MORPHOLOGIQUES DES COUCHES MINCES

3.2.1. ANALYSE PAR FTIR DE LA STRUCTURE ET DE LA CONFORMATION DES PROTEINES APRES LE TRANSFERT MAPLE

Les spectres FTIR des couches protéiques obtenues par MAPLE sont comparés avec les spectres des couches déposées par « drop-cast » (adsorption d'une goutte de solution protéique). Tous les spectres sont présentés dans les Figures 50 et 51. Nous avons identifié des bandes d'absorption à 1631 , 2990 and 3186 cm^{-1} . Dans la littérature le pic à 1631 cm^{-1} correspond aux bandes amides I de la structure secondaire de la protéine (Goormaghtigh E et al., 1994 ; Bandekar J, 1992).

Le pic à 2990 cm^{-1} correspond aux vibrations $\nu(\text{CH}_3)$ and $\nu(\text{CH}_2)$ (Jung C, 2000) tandis que le pic à 3186 cm^{-1} est attribué aux bandes amides A et à l'absorption de H_2O superposées au « stretch » de OH (Jung C, 2000). On observe que les bandes principales présentes dans le spectre des couches « dropcast » se retrouvent dans le spectre de la couche FN ou VN respectivement déposées par MAPLE. C'est la confirmation de l'absence de modifications détectables et significatives de la structure de la FN et de la VN après le transfert MAPLE.

Les pics supplémentaires visibles dans le cas des couches FN (insertion dans la figure 50) à 1645, 1653, 1660 et 1668 cm^{-1} respectivement sont une indication d'un degré élevé de structure secondaire des protéines. Ils sont attribués aux structures des protéines non-ordonnées (1645 cm^{-1}) hélice alpha (1653 cm^{-1}) et structures tournées – boucles des 4 acides aminés, différentes de feuillettes β , (1668 cm^{-1}). Ces bandes sont absentes dans le spectre du « dropcast » et peuvent indiquer un niveau d'organisation plus élevé, nécessaire à l'activité biologique. Des structures secondaires similaires ont été trouvées pour la fibronectine deutérée ou non-deutérée (Benecky MJ).

Les études FTIR donnent aussi des informations sur la conformation de la protéine. Les bandes de vibrations amides sensibles à la conformation du squelette peptidique ont été mis en évidence par Jung (Jung, C, 2000). Elles sont listées dans le Tableau VII.

Tableau VII : Les vibrations des groupes amides dans les protéines ;

Band	Wavenumber (cm^{-1})		Assignment
	In H_2O	In D_2O	
Amide A	3250–3300		N—H stretch, in resonance with amide II overtone
Amide I	1600–1700	1600–1700	Mainly C=O stretching, slightly coupled with CN stretching, CCN deformation, NH bending
Amide II	1550	1450	N—H bending coupled with CN stretching.
Amide III	1230–1330		NH bending and CN stretching
Amide IV	625–767		OCN bending, coupled with other modes
Amide VI	640–800		Out-of-plane N—H bending
Amide VII	~200		Skeletal torsion

Dans le Tableau ci-dessus, la bande Amide I est la plus sensible à la structure secondaire; il y a un chevauchement avec la bande de H_2O ce qui nécessite donc habituellement une étude dans l'eau deutérée (D_2O) (amide I'). La bande Amide II est sensible à l'échange H/D dans l'eau

durant le dépliement des protéines tandis que la bande Amide III, d'habitude de faible intensité, est très sensible à la structure.

Une protéine compacte montre une bande amide I structurée avec des pics étroits tandis qu'une protéine étendue présente un spectre large autour de 1650 cm^{-1} , une caractéristique des structures non-ordonnées, où la bande amide I est d'habitude impossible à discriminer (Arrondo JLR et al., 1999).

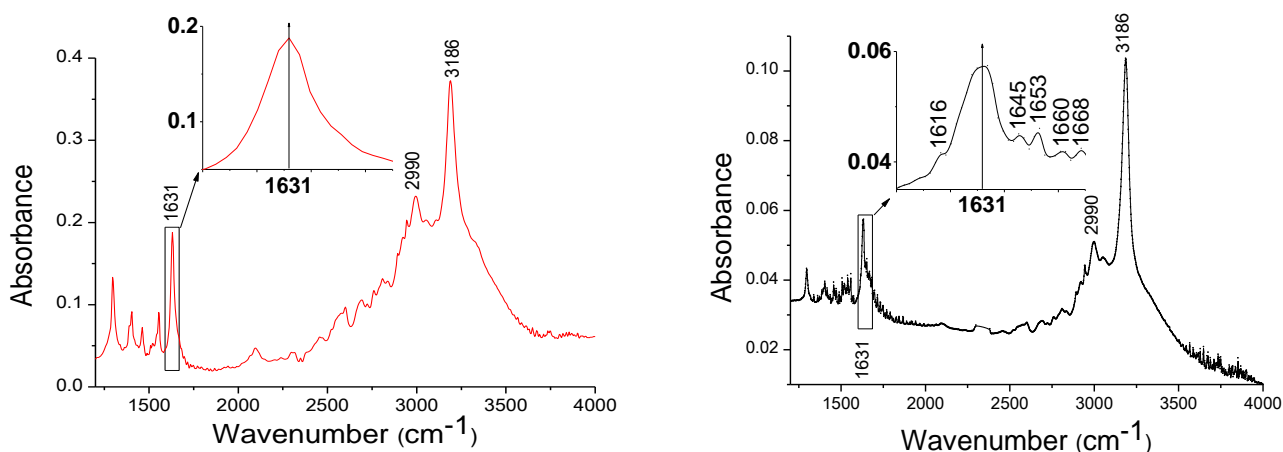


Figure 50: A. Spectres FTIR pour la couche FN-tampon par « drop-cast » et B. Spectres FTIR pour une couche FN-tampon déposée par MAPLE (Sima F et al., 2011A).

Le pic à 1616 cm^{-1} pourrait représenter une petite quantité d'agrégats de FN lyophilisés qui existent après le transfert MAPLE. Il est connu que la lyophilisation en l'absence de cryoprotectants peuvent causer des modifications spectrales attribuées plutôt à l'absence des molécules d'eau qu'à des changements structuraux secondaires de la protéine (van de Weert M et al., 2001). Cependant, la bande d'absorption centrée à 1631 cm^{-1} représente la preuve principale que la structure de la FN est maintenue intacte.

Il faut noter ici qu'il existe des sensibilités différentes des bandes amides aux modifications structurales et qu'il est nécessaire d'utiliser pour une interprétation correcte et une bonne détermination des changements dans la structure protéique secondaire non seulement la bande amide I mais également les bandes amides II et III. Cependant, les amides II et III sont très

faibles dans nos spectres et nous n'avons pas pu les discriminer. Il a été montré que ces bandes ne correspondent pas toujours à des changements structuraux des protéines (van de Weert M et al., 2001).

La poursuite des études FTIR a concerné les couches de VN obtenues par MAPLE. Les spectres de ces structures protéiques sont aussi comparés avec les spectres des couches « drop-cast ». Tous les spectres sont présentés dans la Figure 51. Les mêmes bandes d'absorption d'une protéine intacte ont été identifiées pour les couches VN « drop-cast » et VN par MAPLE à 1631, 2990 and 3186 cm^{-1} . La conclusion préliminaire est que les couches de VN n'ont pas subi de dénaturation en solution aussi bien que pendant le transfert MAPLE.

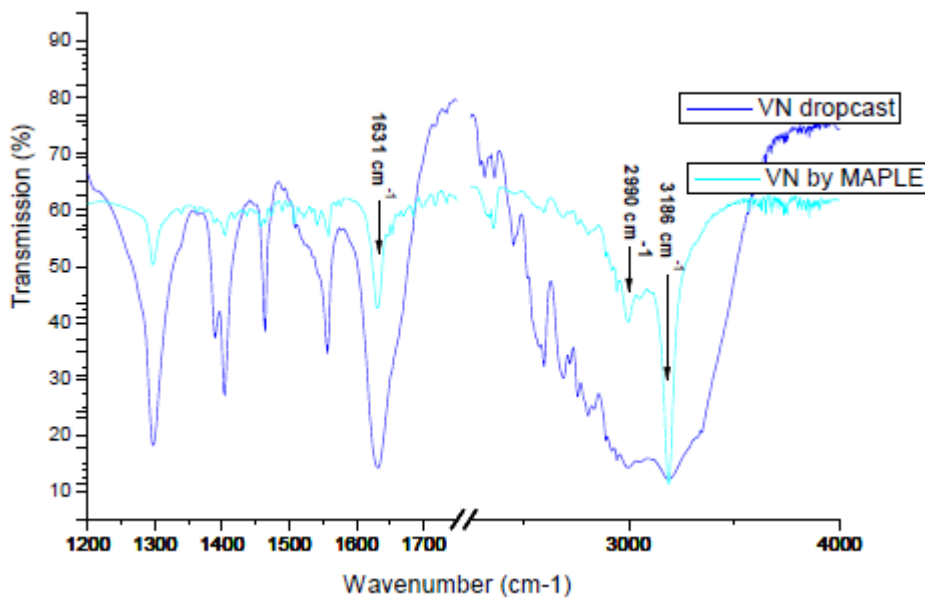


Figure 51 : Les spectres FTIR pour une couche VN-tampon par « drop-cast » et VN-tampon déposée par MAPLE (Sima F. et al., 2011B).

3.2.2. ANALYSE DE LA COMPOSITION PAR MICROSCOPIE FTIR DES COUCHES DE PROTEINES SUR SILICIUM ET SUR LES COUCHES MINCES D'HA

Pour une vérification de l'uniformité de la composition des structures d'HA ainsi que des structures de FN sur HA, des études de microscopie FTIR ont été effectuées pour la première fois dans la littérature sur des structures obtenues par PLD et MAPLE. On présente dans la Figure 52 les spectres 3D des structures d'HA (Figure 52A) obtenues sur Si (le Si est transparent aux IR) mais aussi sur les structures Si/HA/FN (Figure 52B). Il est ainsi possible d'avoir une confirmation physico-chimique de la préservation de l'uniformité de la composition sur des surfaces plus grandes que ce soit pour les couches d'HA ainsi que pour les couches de FN sur HA.

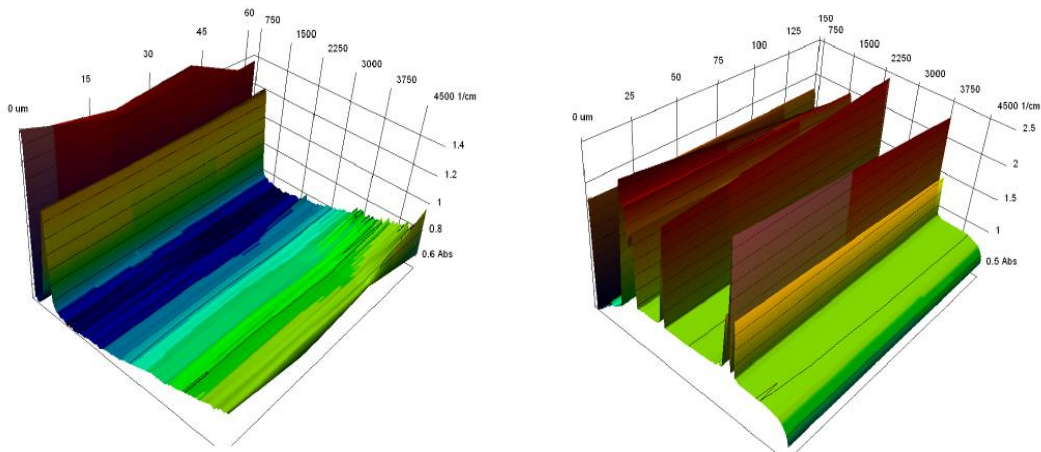


Figure 52 : Les spectres 3D AIM FTIR pour une couche HA sur Si (gauche) et FN-tampon déposée par MAPLE sur une structure Si/HA (droite). Le vert représente une absorption faible tandis que le rouge représente une absorption élevée

3.2.3. ORGANISATION DES COUCHES MINCES DE PROTEINES A L'ECHELLE MICROSCOPIQUE PAR INVESTIGATIONS AFM

Les analyses AFM ont été conduites en mode tapping dans lequel un contact intermittent avec l'échantillon est utilisé. Il permet le balayage de la surface en éliminant le risque de détérioration de la couche protéique. Des images enregistrées en profondeur pour des aires d'investigations de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ sont présentées dans la Figure 53 pour des structures FN-tampon ou tampon seul déposées par MAPLE.

Les investigations AFM ont été utilisées pour l'évaluation de l'organisation à l'échelle microscopique des couches déposées par MAPLE. Si la profilométrie a été conduite sur une ligne de $500 \mu\text{m}$ de longueur les études AFM étaient limitées à une aire de $5 \times 5 \mu\text{m}$ seulement. Dans l'image de la Figure 53 on voit des couches denses de FN-tampon, régions qui ne se trouvent pas sur les images de l'échantillon tampon seul. Entre ces régions de couches protéiques, l'arrière-fond est formé d'une couche certainement composée de tampon et d'agrégats et constituant la couche matrice.

Les objets plus larges visibles notamment dans le cas du tampon déposé par MAPLE et qui présentent un profil carré (visualisé quelquefois circulaire à cause du cantilever d'AFM) sont probablement des cristaux de sels provenant du tampon (voir flèches sur la Figure 53). Les petits objets similaires présents dans les couches tampon ainsi que dans les couches FN-tampon sont des cristaux de sels plus petits.

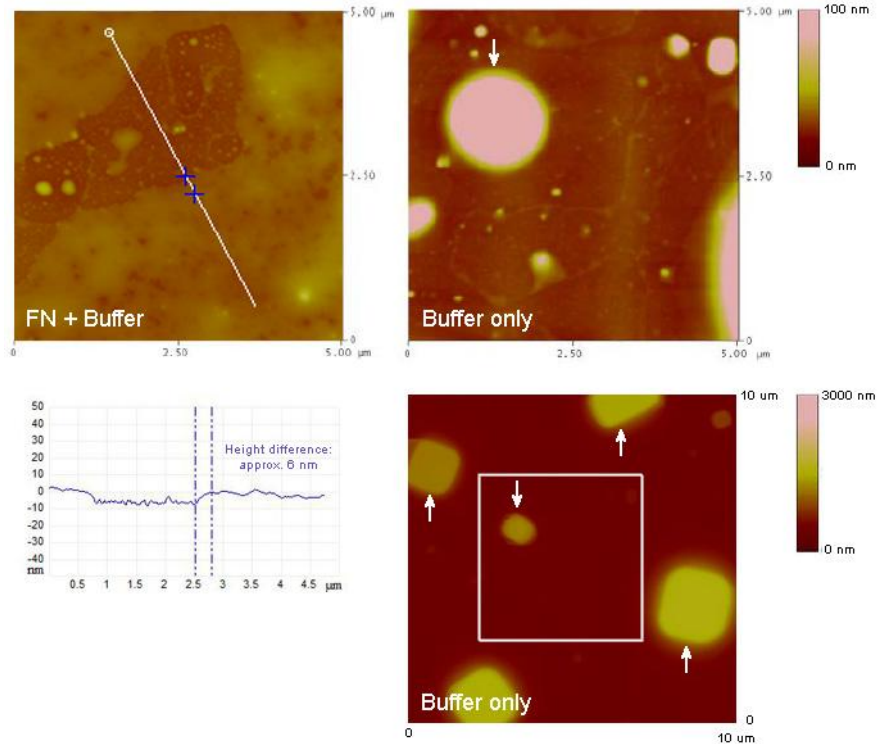


Figure 53 : Image AFM de la couche FN-tampon (en haut à gauche) et du tampon (en haut à droite) après le transfert MAPLE. En bas à gauche il est mis en évidence le profil AFM pour l'image de la couche FN-tampon du dessus. On estime une différence de hauteur d'environ 6 nm entre les régions les plus élevées et les régions les plus basses attribuées respectivement aux régions recouvertes de FN et aux régions qui ne sont pas recouvertes. En bas à droite on voit l'image à plus faible grossissement recouvrant la région (carré blanc) illustrée en haut à droite ; l'échelle de la profondeur est modifiée pour voir le contour des particules présentes dans les images. On remarque les angles droits des contours des particules, caractéristiques spécifiques aux cristaux de sels (flèches sur les figures) (Sima F et al, 2011A).

Des analyses similaires ont été conduites aussi sur les couches de VN sur Si. Dans ce cas, on observe une quantité plus importante de sels déposée avec la VN qu'avec la FN. Cet effet est sans doute lié à la concentration de VN plus basse dans la cible combiné avec la masse moléculaire plus faible de la VN par rapport à la FN. La matrice de sels uniformément distribuée sur la surface pourrait agir comme un médiateur d'organisation et pourrait aussi améliorer la stabilisation de la protéine à la surface. Les calculs de rugosité montrent des valeurs élevées de

Rms (100.6 nm) et de Rz (1 μ m) qui sont aussi reliées à la grande quantité de sels dans la couche matrice VN-tampon.

Une image AFM caractéristique pour des aires d'investigations de 10x10 μ m est présentée sur la Figure 54A pour des structures VN-tampon. Le profil AFM pour l'image de la couche VN-tampon est présenté sur la Figure 54 B.

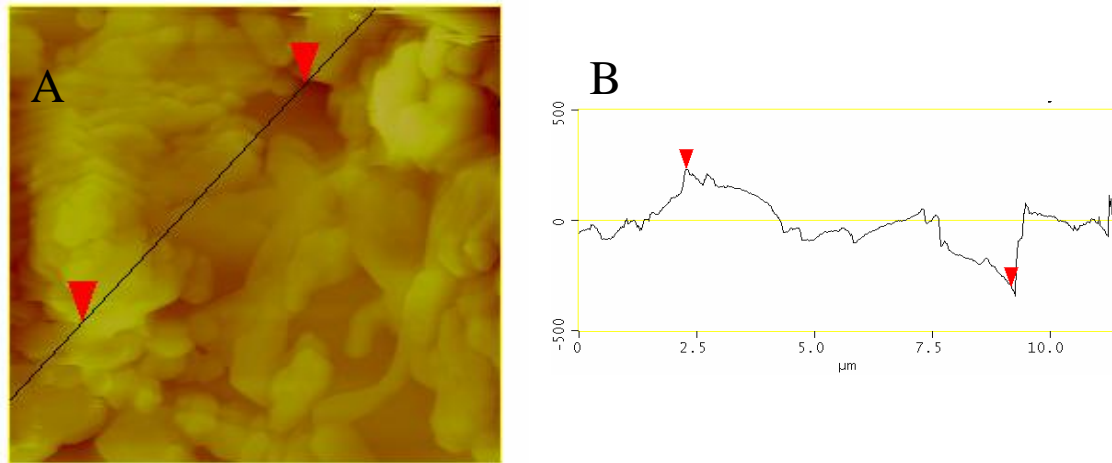


Figure 54 : Image AFM de la couche VN-tampon (A) et profil AFM (B) pour l'image de la couche VN-tampon. On estime une hauteur d'environ 157.08 nm entre les régions les plus élevées et les régions les plus basses (Sima F et al, 2011B).

3.3. ETUDES BIOCHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES COUCHES MINCES

La caractérisation biochimique des protéines déposées a été faite par dosages colorimétriques dot-blot et par visualisation directe des réseaux moléculaires en immuno- marquage. La validation de l'adhésion des cellules ostéoprogénitrices préparées à partir de moelle osseuse humaine sur les substrats revêtus Ti/HA/FN et Ti/HA/VN a été réalisée en culture statique. Les surfaces ont été comparées par rapport aux surfaces contrôles fonctionnalisées avec ASB (Ti/HA/ASB) ou HA (Ti/HA). Des quantifications cellulaires ont été réalisées au cours du temps et la visualisation des protéines cellulaires impliquées dans l'adhésion (actine, vinculine) a été

possible grâce à des techniques d'immunofluorescence. La morphologie cellulaire sur les biomatériaux recouverts a été analysée par microscopie électronique à balayage. La prolifération cellulaire a été calculée à partir du dénombrement des cellules vivantes par le dosage MTT. Enfin, la différenciation des cellules osseuses sur les biomatériaux fonctionnalisés a été quantifiée par leur activité phosphatase alcaline et leur synthèse d'ostéocalcine et de collagène de type I.

3.3.1. DETECTION DES PROTEINES TRANSFEREES PAR IMMUNOFLUORESCENCE ET DOT BLOT

Détection de la FN

Les images de fluorescence ont mis en évidence des agrégats fluorescents visibles sur toute la surface déposée (Figure 55 A) et des régions présentant des structures fibrillaires (Figure 55 B). Les contrôles pour les liaisons non spécifiques n'ont montré qu'une fluorescence faible correspondant à celle de l'HA (résultats non montrés). Pour accomplir le protocole d'immuno-marquage des protéines il est nécessaire de réaliser des manipulations répétitives avec des immersions dans des solutions liquides pour la saturation des surfaces, des lavages et rinçages fréquents sous une faible agitation ainsi que le marquage avec les anticorps spécifiques. Toutes ces interactions avec les surfaces déposées peuvent expliquer les non homogénéités observées dans la distribution de la FN sur la surface. Tous ces facteurs associés à une adsorption inégale sur la surface sont à mettre en relation avec l'organisation différente de FN précédemment rapportée (Pellenc D et al., 2006). Cependant, la présence de la protéine sur la surface a été confirmée par une révélation après contact direct de l'échantillon avec un papier de nitrocellulose puis par une révélation classique des Western blots en utilisant le protocole décrit dans la Section Expérimentale.

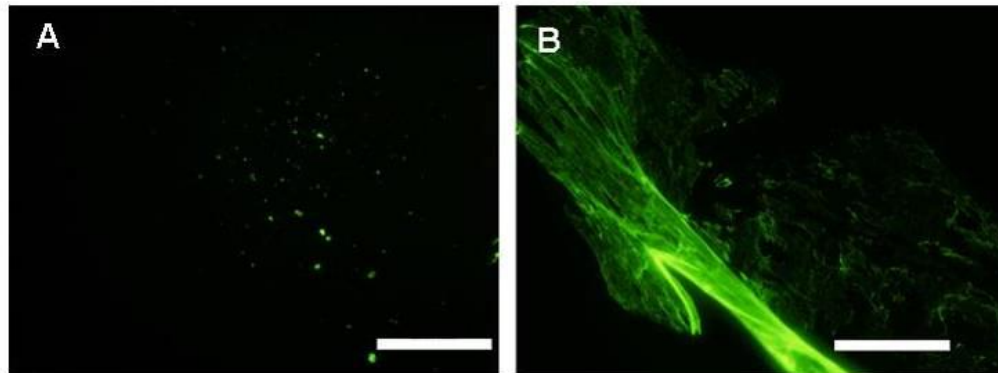


Figure 55: Les images de microscopie en fluorescence des structures de la FN après transfert par MAPLE et immuno-marquage : régions avec des agrégats de FN (A) et structures fibrillaires de FN (B). Barre: 100 μm .

La vérification des suppositions ci-dessus a été accomplie par le transfert MAPLE de molécules de FN conjuguées antérieurement au FITC afin d'éviter les artefacts produits par les lavages et rinçages sur les surfaces recouvertes. L'observation de tapis encore plus fluorescents (Figures 56 A et B) confirme notre hypothèse sur la réorganisation des molécules protéiques. Ils sont présentés dans les Figures 56 A et B deux cas de concentrations différentes de FN-FITC (0.25 mg/ml et 0.5 mg/ml). Nous avons remarqué que l'augmentation de la concentration de départ (cible MAPLE) fournit une quantité plus importante du matériau sur le substrat ainsi qu'une distribution plus homogène et uniforme. Les particules observées sur les images de microscopie optique (Figure 48), de diamètre de quelques microns à 20-25 μm , sont retrouvées dans les agrégats fluorescents (Figures 56 A et B). Notre opinion est que les spots plus fluorescents représentent des zones plus riches en protéine probablement assemblées autour des cristaux de sels. Cependant, il semble que les dépôts MAPLE donnent plutôt des couches homogènes de matrice protéine-tampon tandis que les sels donnent une distribution inhomogène de la FN sur le substrat dans le cas d'adsorption « drop-cast » à cause des forces capillaires (Figure 56 C).

Nous considérons que les particules protéine-tampon pourraient constituer des points d'ancrage de la couche de matrice après le transfert MAPLE. Les points fluorescents de la Figure 56 sont prédominants dans certaines régions où la matrice n'existe plus, probablement à cause d'une

désorption dans le milieu liquide au cours du protocole d'immuno-marquage. Les structures de FN déroulées (Figure 55 B) suggèrent un comportement de prédisposition à la fibrillation.

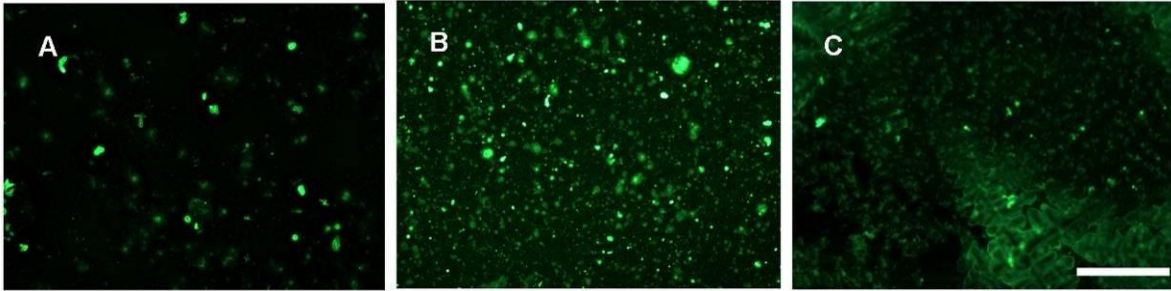


Figure 56: Les images de microscopie en fluorescence des structures FN conjuguées au FITC transférées par MAPLE d'une solution de 0.25 mg/ml (A) et 0.5 mg/ml (B) par rapport à 0.25 mg/ml FN drop-cast (C). L'échelle de 100 μ m.

Détection de la VN et de l'ASB

Le protocole d'immuno-marquage suivi pour la VN et l'ASB comprend comme précédemment décrit des immersions dans des solutions liquides pour la saturation des surfaces, des lavages et rinçages et le marquage avec les anticorps spécifiques. A nouveau, toutes ces interactions peuvent être à l'origine des inhomogénéités dans la distribution des protéines sur la surface.

Les images de fluorescence dans les cas de la VN et l'ASB montrent aussi la présence d'agrégats fluorescents réorganisés sur la surface (Figures 57 A et B). On y saisit la concordance avec les études de mouillabilité de la Section 3.1.3 qui ont mis en évidence une diminution considérable de la valeur de l'angle de contact après séchage dans le cas des structures Ti/HA/VN à cause de la réorganisation de la VN à la surface pendant le séchage. Les contrôles pour les liaisons non-spécifiques n'ont fourni que la fluorescence non spécifique de l'arrière-plan.

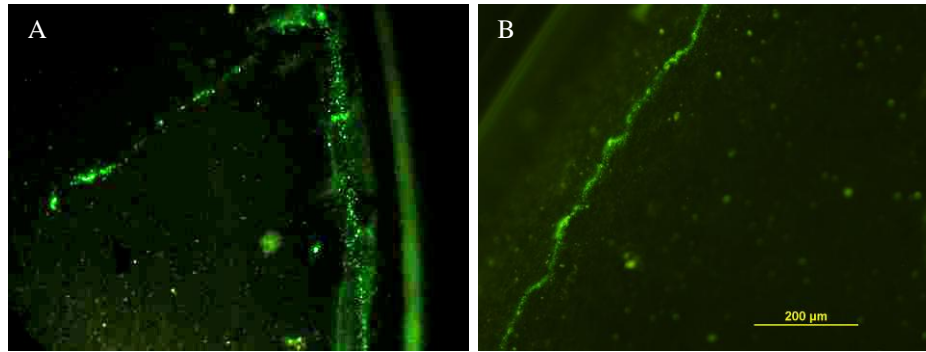


Figure 57: Les images de microscopie en fluorescence des structures après le transfert par MAPLE et l'immuno-marquage : régions avec des agrégats de VN (A) et structures d'ASB (B). Barre : 200 μ m.

3.3.2. CONFIRMATION DE LA VIABILITE, DE L'ADHERENCE ET DE LA PROLIFERATION DES HOP SUR LES COUCHES MINCES HYBRIDES PAR MTT

Le test du MTT est un indicateur de l'intégrité cellulaire et de l'activité mitochondriale assimilable à une mesure de la vitalité cellulaire. Le test permet une quantification rapide et sensible de la viabilité et de la prolifération cellulaires.

Pour une quantification correcte et pertinente, les résultats sont rapportés à l'activité des cellules cultivées sur le titane nu. Le Ti n'est pas obligatoirement une référence mais il est considéré comme le matériau contrôle dans nos études. Nous avons utilisé un milieu cellulaire IMDM pour stimuler la réponse des cellules. On voit dans la Figure 58 les courbes de viabilité et de prolifération des cellules HOP cultivées sur les structures Ti, Ti/HA (HA), Ti/HA/FN (FN), Ti/HA/VN (VN) et Ti/HA/ASB (ASB) pendant 1, 3, 7, 14 et 21 jours respectivement. On distingue au premier jour des comportements cellulaires différents entre les structures. Après un jour de culture, les cellules adhèrent très rapidement sur les couches minces d'HA. Bien qu'elle soit reconnue comme une protéine inerte, les couches d'ASB induisent au premier jour une adhésion plus importante des HOP que sur les FN et VN, mais qui reste plus faible que sur l'HA.

On ne peut cependant pas conclure au premier jour d'autant que les valeurs sont dans la limite de l'erreur standard. Après 3 jours de culture cellulaire, les cellules cultivées sur les couches de FN et de VN deviennent les plus prolifératives tandis que l'activité cellulaire sur les échantillons d'ASB et d'HA reste constante ou même diminue. Une activité comparable pour toutes les structures est visible au jour 7 avec une petite croissance dans le cas d'HA et une décroissance pour la VN. Une augmentation plus évidente de l'activité cellulaire est visible au jour 14 sur les structures HA, FN et VN par rapport à l'ASB. Au jour 21, les résultats sont assez homogènes sur les différentes couches avec toutefois une prédominance pour les structures VN. A ce délai on considère qu'une différenciation des cellules HOP en ostéoblastes est commencée. Cette observation est soutenue par une activité proliférative très élevée (confluence des cellules sur les supports), notamment pour HA, FN et VN. Cependant ceci doit être confirmé par des tests spécifiques de différenciation.

En conclusion, il n'existe pas, à l'exception de la VN, une différence majeure entre les structures Ti/HA, Ti/HA/FN et Ti/HA/ASB. Les tendances sont similaires pour tous les échantillons. On distingue de plus une prolifération plus élevée des cellules cultivées sur tous les échantillons par rapport au titane.

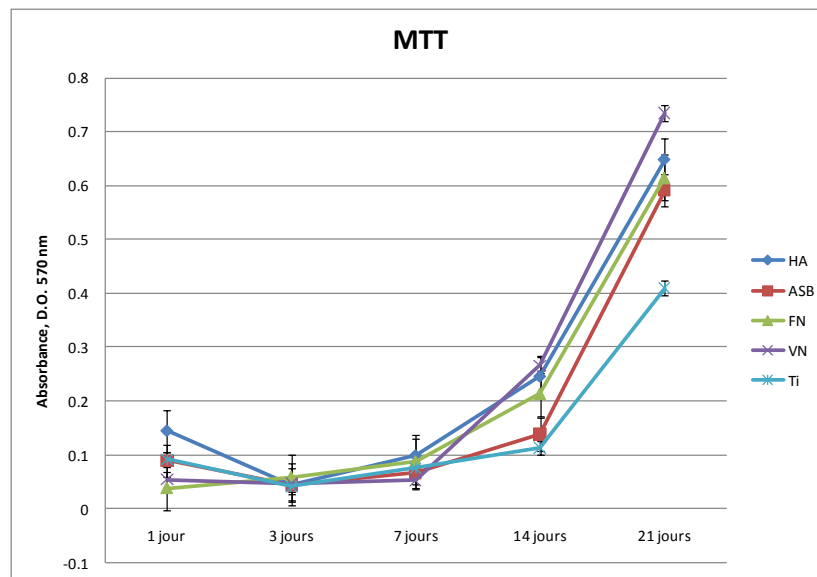


Figure 58 : Viabilité et prolifération des cellules cultivées en milieu IMDM de 1 à 21 jours mise en évidence par MTT

3.3.3. MORPHOLOGIE DES HOP PAR MEB

La morphologie des cellules HOP a été analysée par microscopie à balayage. Après 7 jours de culture on peut confirmer que les cellules HOP s'étalent bien (Figure 59) et présentent un contact intime (Figure 60) avec les surfaces fonctionnalisées (les protéines), en particulier pour les structures recouvertes avec la FN. Dans ce cas, on distingue des filopodes très denses en nombre et ancrés dans les couches de FN. On remarque aussi sur les images MEB à fort grossissement une structure des couches protéines très poreuse, bien différente de la structure de l'HA.

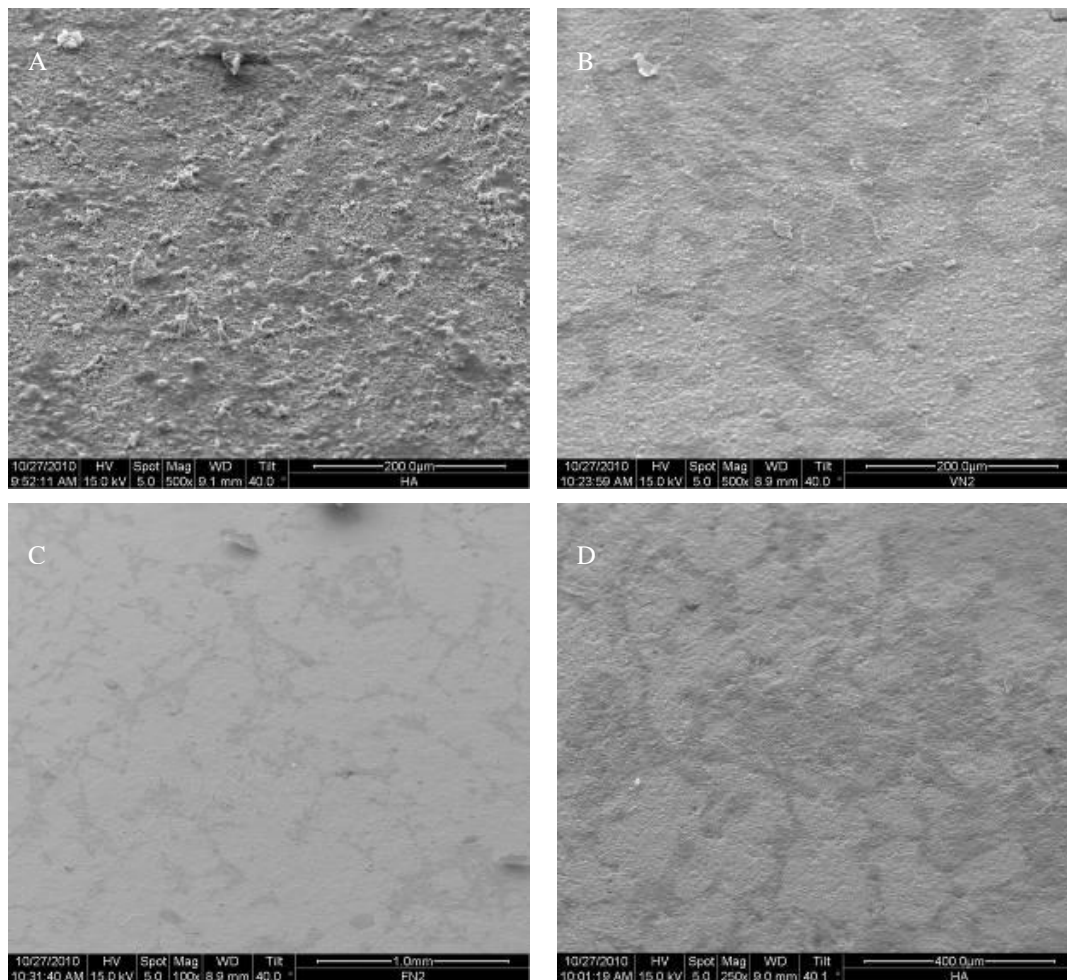


Figure 59: Images MEB des cellules HOP sur les structures (A) Ti/HA, (B) Ti/HA/ASB, (C) Ti/HA/FN et (D) Ti/HA/VN après 7 jours (vue générale)

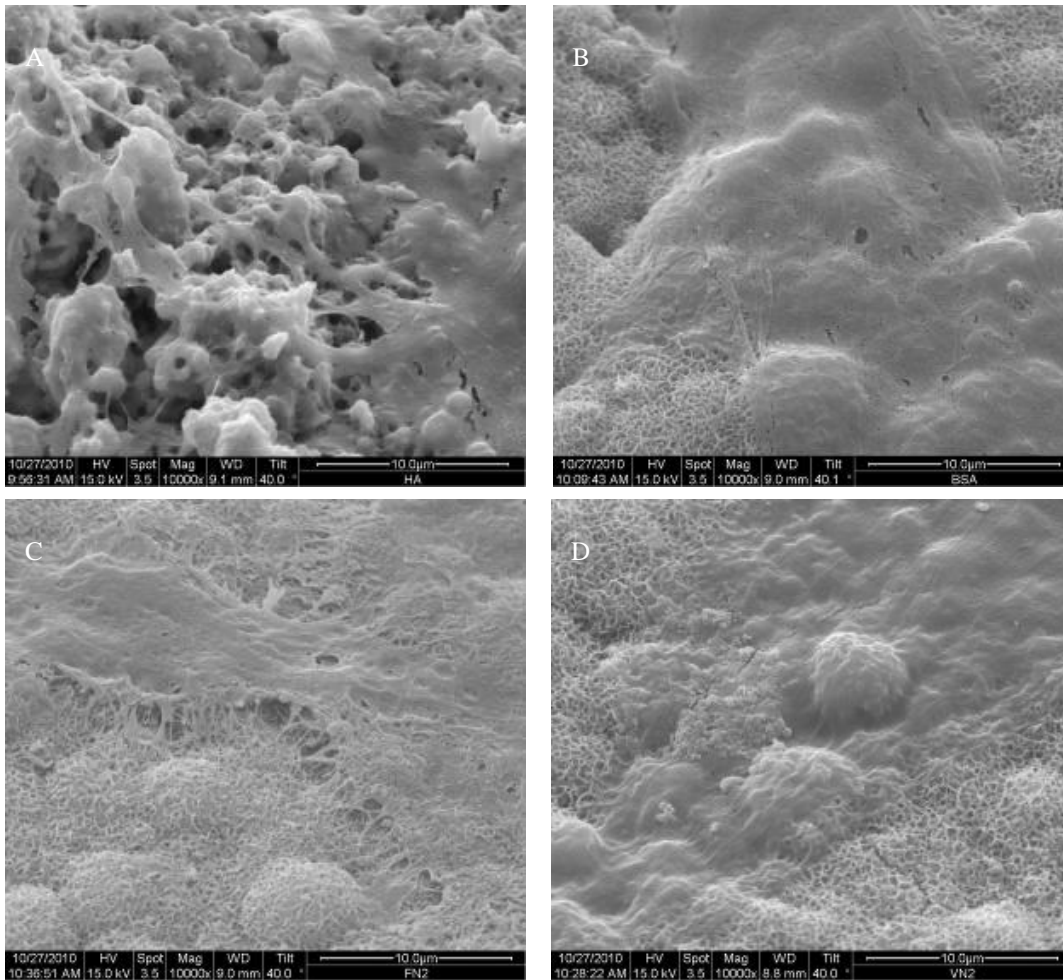


Figure 60: Images MEB des HOP sur les structures (A) Ti/HA, (B) Ti/HA/ASB, (C) Ti/HA/FN et (D) Ti/HA/VN après 7 jours (vue de détail)

3.3.4. DEMONSTRATION DE L'ADHESION ET DE L'ETALEMENT DES HOP SUR SILICIUM ET SUR LES COUCHES MINCES HYBRIDES PAR IMMUNOMARQUAGE

Dans une première étape nous avons utilisé comme substrat le silicium simple pour tester la fonctionnalité de la FN dans des tests d'adhésion cellulaires. Le silicium a été choisi pour limiter les effets de la rugosité à l'échelle nanométrique sur l'organisation de la protéine autant que sur le comportement cellulaire. Avant leur recouvrement, les substrats de silicium ont été nettoyés dans des bains ultrasoniques consécutifs d'acétone, d'alcool éthilique et d'eau ultra pure puis séchés avec de l'azote d'une pureté élevée.

L'observation de l'attachement des cellules HOP a été faite sur du silicium recouvert avec de la FN et comparé aux cellules cultivées sur le silicium nu ou sur du verre borosilicaté. Le marquage des filaments d'actine avec la phalloïdine conjuguée à l'Alexa Fluor 594 nous a permis de visualiser le cytosquelette trois heures après l'ensemencement des cellules. Le but de cette étude de l'adhésion à court terme était de tester si la FN déposée par MAPLE pouvait accélérer la phase initiale d'adhésion cellulaire (l'attachement) et par conséquent démontrer la fonctionnalité de la protéine projetée.

Le cytosquelette d'actine est en contact permanent avec la MEC, qui est un point essentiel à l'adhésion cellulaire sur toute surface. A l'inverse, la MEC contrôle les signaux d'adhésion, en influençant directement l'organisation des filaments d'actine. C'est la raison pour laquelle une analyse microscopique des patterns de filaments d'actine peut fournir une information qualitative sur l'influence des matériaux testés sur l'attachement cellulaire.

Après trois heures de croissance sur le verre borosilicaté, les cellules HOP présentent des formes caractéristiques rondes et une coloration essentiellement de l'actine corticale (Figure 61 A). Les filaments d'actines sont plus évidents dans le cas des cellules cultivées sur le silicium nu (Figure 61 B). Cependant, les cellules restent rondes, un comportement normal après cet intervalle de temps. Par contre, sur les échantillons de silicium recouverts avec FN par MAPLE, nous

observons des patterns de filaments d'actine parallèles et bien étalés dans le cytoplasme, allant de la membrane des noyaux à la membrane plasmatique (Figure 61 C).

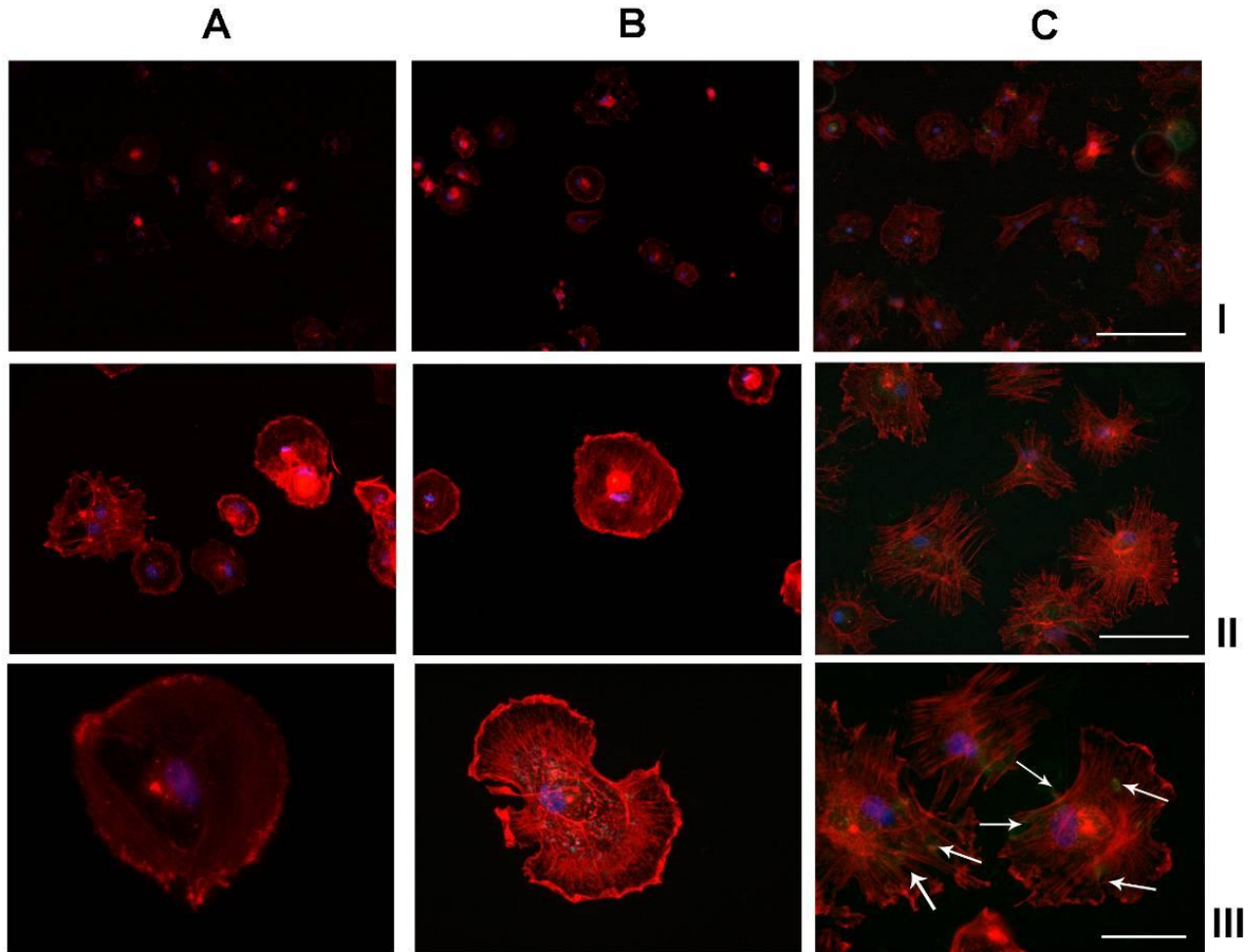


Figure 61 : Coloration des filaments d'actine des HOP ensemencées trois heures sur (A) le verre borosilicaté, (b) le silicium et (C) le silicium recouvert par la FN conjuguée FITC par MAPLE. Les cellules ont été fixées, perméabilisées et colorées par phalloïdine conjuguée à l'Alexa Fluor 594 (rouge) pour révéler l'actine. Les noyaux ont été colorés par le DAPI (bleu). Sur C III la FN conjuguée FITC peut se voir en vert (les flèches). Les échelles sont de 200 (I), 100 (II) et 50 (III) μm respectivement (Sima F et al, 2011A).

La FN induit la formation de filaments d'actine bien organisés dans les cellules HOP, qui adhèrent, se développent et prolifèrent sur la surface recouverte dès trois heures après leur ensemencement. De plus, les cellules exposent des filaments denses et en tension qui semblent ancrés dans les couches de FN-FITC (Figure 61 C III – les flèches indiquent la coloration verte spécifique FN). Ceci confirme donc la conservation de la structure et de la fonctionnalité des molécules protéiques déposées par MAPLE. Ceci peut être mis en relation avec ce qui a été observé par MEB pour les cellules HOP cultivées sur les couches de FN déposées par MAPLE sur les structures Ti/HA (Section 3.3.3).

Ces études ont été poursuivies par des études approfondies par immunomarquage et microscopie de fluorescence sur les structures bicouches HA/protéine. Les structures Ti/HA/FN et Ti/HA/VN ont été utilisées pour tester la fonctionnalité des couches protéiques après l'interaction avec des cellules HOP et comparées aux structures contrôles (Ti/HA/ASB, Ti/HA et Ti).

Un cytosquelette cellulaire normal et une bonne densité de cellules ont été observés après 1, 3 et 7 jours de culture sur tous les échantillons. Les cellules cultivées sur les revêtements de FN et de VN montrent des points d'adhésion (marqués par la vinculine) avec le substrat plus visibles après 1 jour que les cellules cultivées sur HA ou ASB (indiqués par des flèches sur les Figures 62 E, G et Figures 63 E). Les cellules cultivées sur la FN présentent de plus longs filopodes (Figure 62 F). Une tendance au détachement est observée au microscope de fluorescence pour les cellules cultivées sur les revêtements d'HA seuls (flèches sur la Figure 63 C). Sur les recouvrements avec FN les cellules forment après 7 jours des clusters (Figure 62 H) alors que sur les recouvrements avec VN elles forment un tapis homogène (Figure 63 F). Les filaments d'actine sont trouvés parallèles et bien étalés sur tous les échantillons. Ainsi, les cellules HOP adhèrent, se développent et prolifèrent sur toutes les surfaces de Ti recouvertes. Par contre, les cellules exposent des filaments d'actine plus denses et plus épais sur les couches FN.

D'images représentatives se trouvent dans l'Annexe I en pour les structures Ti/HA, Ti/HA/ASB, Ti/HA/FN, Ti/HA/VN et Ti respectivement pour les intervalles de temps 1, 3 et 7 jours.

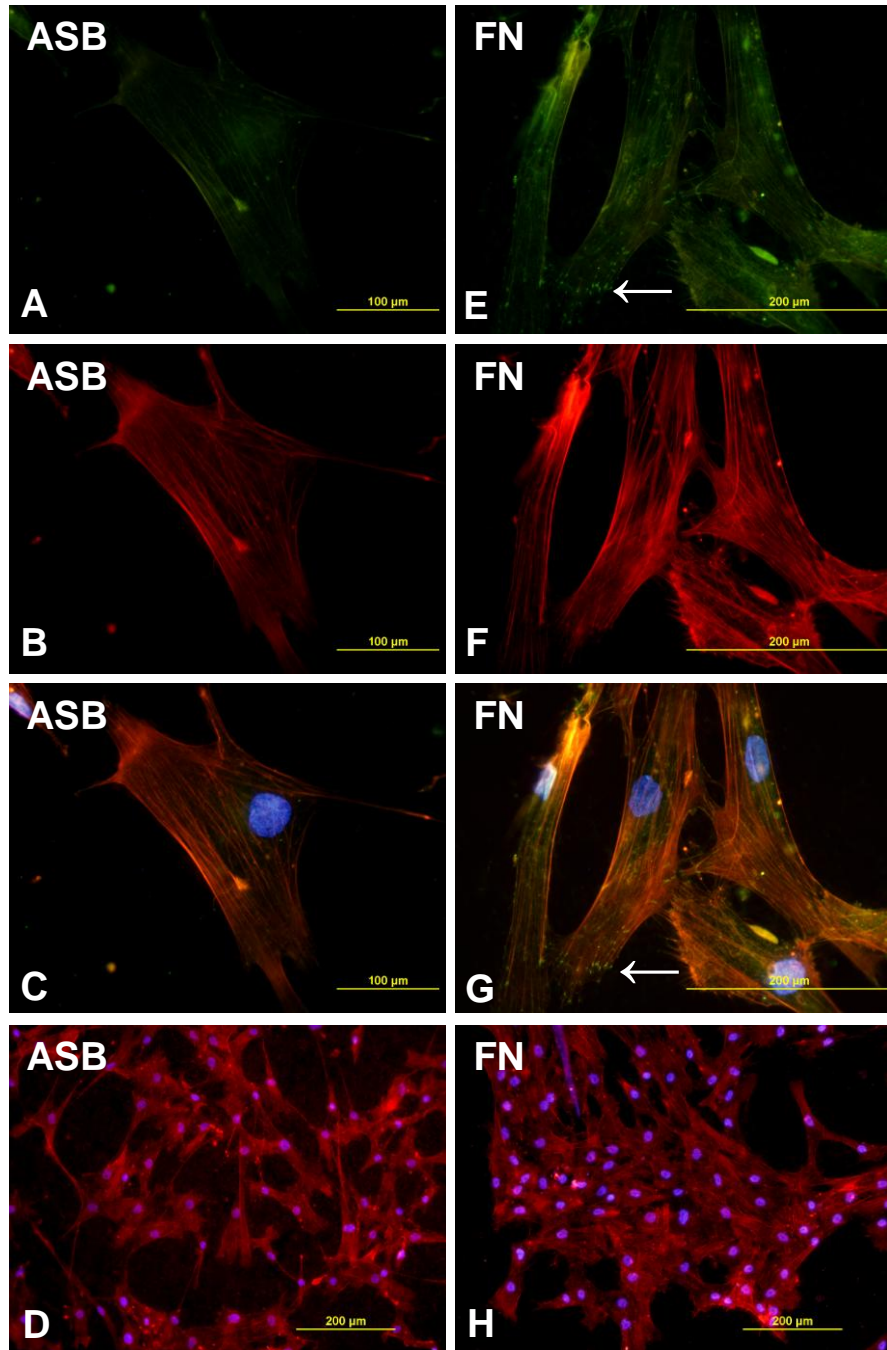


Figure 62 : Coloration des points de vinculine (A,E) et des filaments d'actines (B,D,F,H) des HOP ensemencées sur ASB (A,B,C,D) et FN (E,F,G,H). Les cellules sont fixées, perméabilisées et colorées pour l'actine par la phalloïdine conjuguée au TRITC (rouge) et pour la vinculine avec un anticorps anti-vinculine conjugué au FITC (vert). Les noyaux sont colorés par le DAPI (bleu).

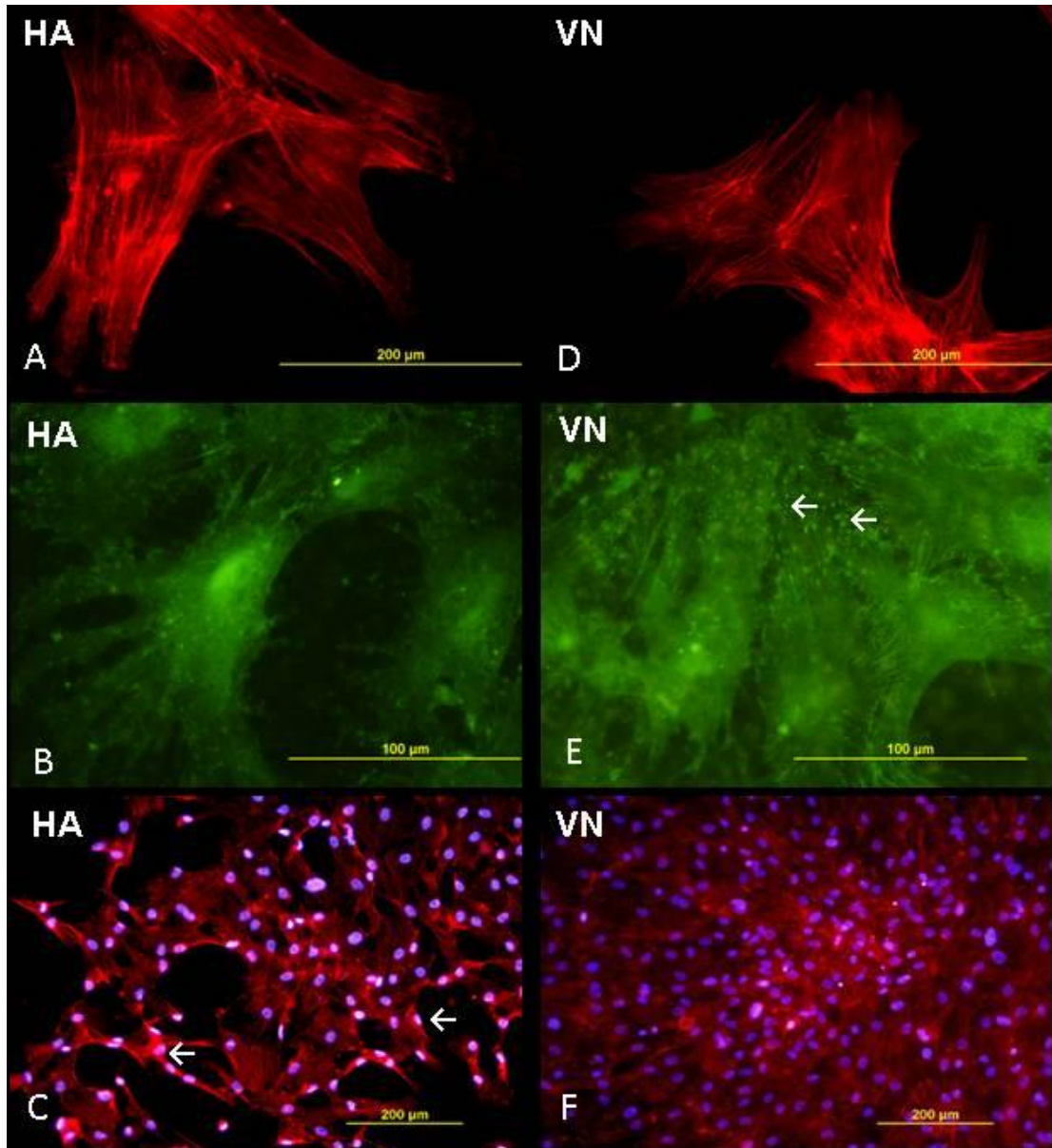


Figure 63 : Coloration de filaments d'actines (A,C,D,F) et des points de vinculine (B,E) des HOP ensemencées sur HA (A,BC) et VN (D,E,F). Les cellules sont fixées, perméabilisées et colorées pour l'actine par la phalloïdine conjuguée au TRITC (rouge) et pour la vinculine avec un anticorps anti-vinculine conjugué au FITC (vert). Les noyaux sont colorés par le DAPI (bleu).

Pour une co-visualisation de la FN déposée par MAPLE avec le cytosquelette cellulaire (filaments d'actine et noyaux) similaire aux études de la Section 3.3.4 nous avons fait des immuno-marquages anti-FN en utilisant le protocole décrit dans la Section 2.2.8. Ainsi, les échantillons de FN ont été analysés après 1, 3 et 7 jours pour une co-localisation de la FN et des cellules. De manière surprenante, après un jour en milieu de culture on ne voit pas la FN plasmatique déposée (pFN) mais une fibronectine cellulaire (cFN) secrétée dans la MEC qui apparaît plus dense autour des noyaux (en vert sur la Figure 64 – Jour 1). Après 3 et notamment 7 jours en culture (Figure 64), la cFN se développe en formant un vrai réseau grâce auquel les cellules communiquent et se développent.

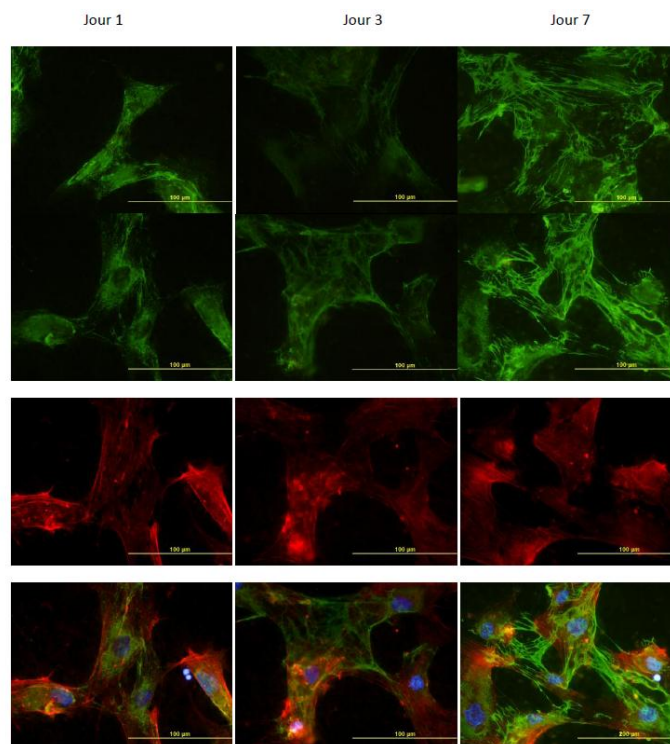


Figure 64 : Coloration de la cFN (en vert) et des filaments d'actine (en rouge). Les cellules ont été fixées, perméabilisées et colorées pour l'actine par la phalloïdine conjuguée au TRITC (rouge) et pour la fibronectine par l'anticorps anti-FN conjugué au FITC (vert). Les noyaux sont colorés au DAPI (bleu). Les images de l'actine, des noyaux et de la cFN sont superposées sur la dernière ligne d'images.

Pour comparer, on a essayé de voir le développement de la cFN sur d'autres structures (Ti, Ti/HA et Ti/HA/ASB). On a observé ainsi que la cFN est très réduite (Figure 65) dans ces cas ce qui signifie que la pFN déposée par MAPLE stimule la sécrétion de cFN.

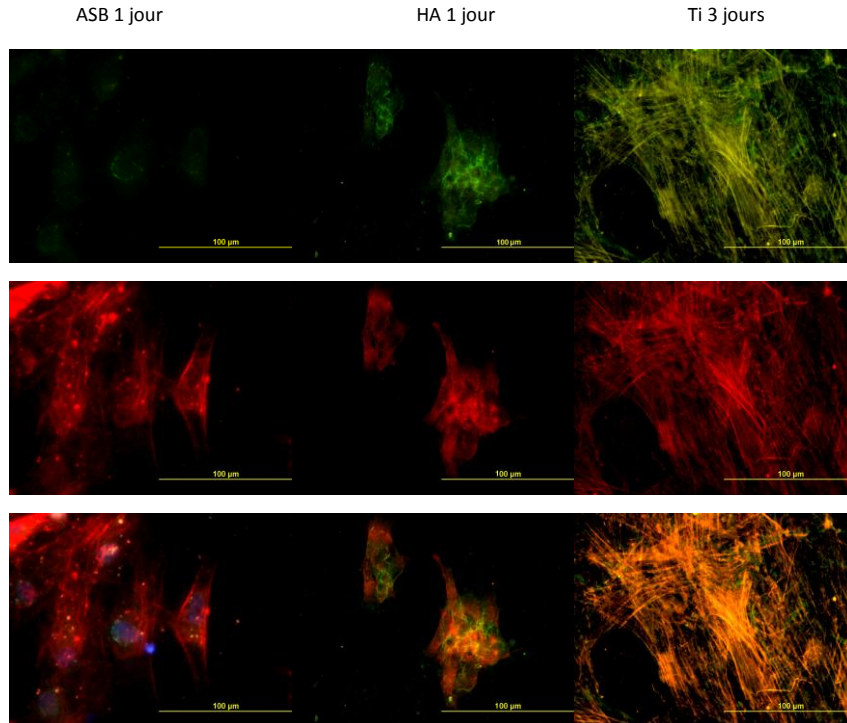


Figure 65 : Coloration des cFN (en vert) et des filaments d'actine (en rouge) sur les structures Ti/HA/ASB, Ti/HA et Ti. Les cellules ont été fixées, perméabilisées et colorées pour l'actine par la phalloïdine conjuguée au TRITC (rouge) et pour la FN par l'anticorps anti-FN conjugué au FITC (vert). Les noyaux sont colorés par le DAPI (bleu). Les images de l'actine et de la FN sont superposées sur la dernière ligne d'images.

Un effet similaire a été mis en évidence dans des études *in vitro* sur des cellules ostéoblastes MG63 cultivées sur des surfaces de Ti recouvertes par FN. Dans ces études, après 4 jours de culture cellulaire, les ostéoblastes en contact avec la pFN déposent des quantités importantes de cFN sous formes des patterns spécifiques bien organisées dans la MEC déposée sur toute la surface cultivée (Pegueroles M. et al., 2010). D'autres résultats *in vitro* et *in vivo* ont indiqué aussi que la pFN peut induire une stimulation de la sécrétion cellulaire de cFN. Cette stimulation est appelée chimiotaxie qui est le phénomène par lequel les organismes cellulaires dirigent leurs

actions en fonction de certaines espèces chimiques présentes dans l'environnement (Jimbo R et al., 2007). Dans notre cas concret, les cellules HOP secrètent plus de cFN en réponse à l'interaction avec la pFN déposée.

3.3.5. QUANTIFICATION DES AIRES ET PERIMETRES CELLULAIRES

Une quantification des aires et périmètres cellulaires a été faite sur les cellules HOPensemencées sur silicium recouvert avec de la FN et comparées aux cellules cultivées sur le silicium ou le verre borosilicaté. Après calcul des dimensions cellulaires, on observe que l'aire et le périmètre des cellules sur les couches de FN déposées par MAPLE sont très augmentés par rapport aux contrôles. Dans la Figure 66, sont présentés les histogrammes des aires et périmètres calculés. Les calculs sont faits sur un nombre de 10 cellules sur des images 20X. Les cellules ont triplé leur périmètre après ensemencement sur les structures Si/FN tandis que leur aire est doublée par rapport aux contrôles. Comme résultats similaires dans la littérature, on trouve une augmentation de l'aire cellulaire dans le cas des cellules endothéliales humaines sur des couches de FN déposée par adsorption en solution sur différents multistructures (Wittmer CR et al., 2007). Une autre étude de cellules mésenchymateuses cultivées sur des couches de FN sur des substrats d' Au ou d'HA a mis en évidence une forme cellulaire polygonale avec un cytosquelette bien défini ainsi que des aires et périmètres cellulaires plus larges une semaine après l'ensemencement sur la FN (Dolatshahi-Pirouza A et al., 2010). Un cytosquelette similaire à celui des Figures 61C et 66 a été trouvé pour des cellules ostéoblastiques primaires dérivées de l'os 2 heures après leur ensemencement sur des formes intactes de FN par rapport à des molécules de FN fragmentées (Dalton BA et al., 1995). Sur les molécules intactes de FN, ces auteurs ont observé un étalement cellulaire important avec des filaments d'actine bien étendus sur toute la surface cellulaire alors qu'un développement minimum des cellules a été observé sur les fragments de FN. Ceci suggère que l'interaction avec les domaines de liaison cellulaire de la protéine et donc la conservation de la structure intacte de la FN, est obligatoire pour un étalement optimal de la cellule. Par conséquent, il apparaît que les structures de FN transférées par MAPLE présentent des patterns fibrillaires intacts (non dénaturés) avec des domaines de liaisons cellulaires fonctionnels.

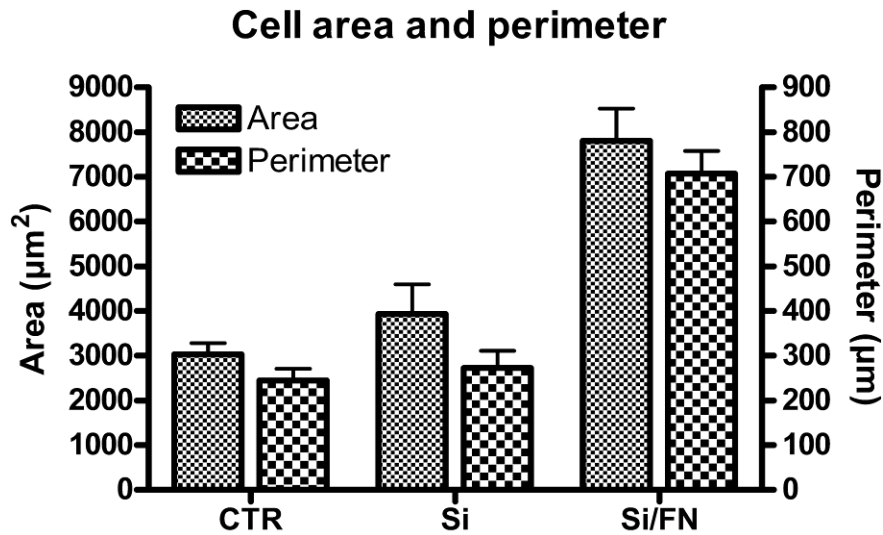


Figure 66 : Histogrammes des aires et périmètres cellulaires des HOP 3 heures après l'ensemencement sur les couches de FN déposées par MAPLE sur Silicium (Si/FN) comparées aux cellules sur Silicium (Si) et sur verre borosilicaté (CTR). La barre d'erreur a été calculée comme l'erreur standard de la moyenne (Sima F et al, 2011A).

3.3.6. EXPRESSION DES MARQUEURS DE DIFFERENCIATION

Les ostéoblastes qui sont responsables de la formation de l'os se caractérisent par une synthèse intense de protéines de la matrice et la présence d'une activité phosphatase alcaline (PAL) membranaire importante. En culture, la différenciation cellulaire est évaluée par le niveau d'activité de la PAL, et par l'évaluation de l'assemblage d'une matrice fibrillaire de collagène (type I) minéralisée.

Les assemblages d'HA et protéines d'adhésion réalisés dans ce travail de thèse permettent d'envisager un traitement des biomatériaux par adsorption de ces protéines, dans le but d'augmenter l'adhérence cellulaire. Cependant, l'adhérence cellulaire aux protéines de la matrice influe aussi directement sur la prolifération et la différenciation des cellules et constitue l'étape

critique de la colonisation d'un matériau (Anselme, 2000). Dans l'os, il a été montré que la FN possède notamment un rôle important dans la différenciation et la survie des ostéoblastes. De même, la VN est connue pour favoriser aussi la différenciation des ostéoblastes (Salasznyk et al, 2004).

3.3.6.1. ACTIVITE PHOSPHATASE ALCALINE DES HOP CULTIVEES SUR LES COUCHES HYBRIDES

La phosphatase alcaline a été testée après 14 et 21 jours de culture des HOP sur tous les échantillons, et normalisée par rapport au blanc (solution PAL seulement) (Figure 67). Même s'il existe une activité PAL sur tous les échantillons, on ne voit pas de différences importantes après 14 jours entre les différentes couches déposées (dans la limite des erreurs).

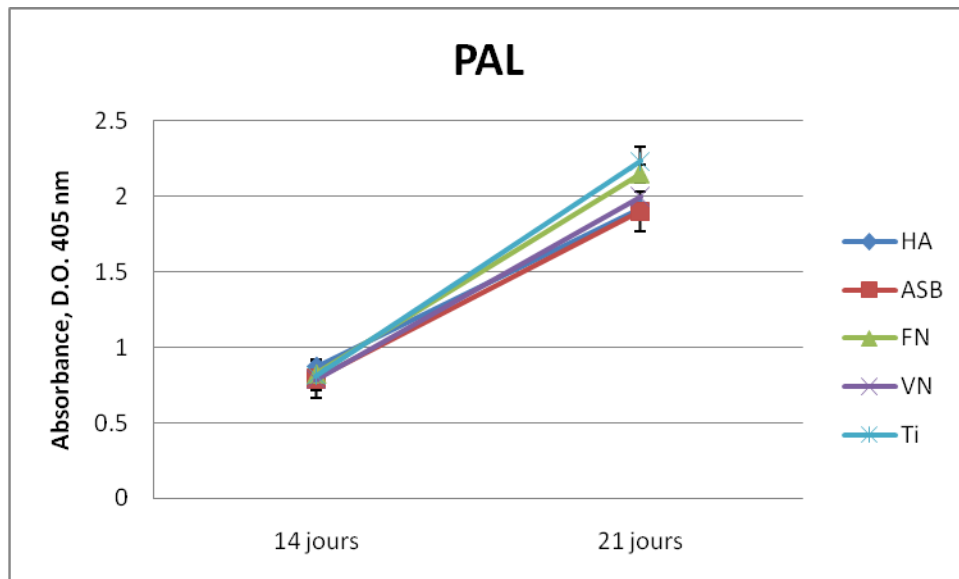


Figure 67: L'activité phosphatase alcaline (PAL) des HOP après 14 et 21 jours de culture sur les échantillons FN et VN comparée aux contrôles (Ti, Ti/HA et Ti/HA/ASB). Une normalisation a été faite par rapport au blanc (solution PAL seulement).

Par contre, après 21 jours, les valeurs PAL des échantillons FN et VN sont plus élevées que les contrôles Ti/HA et Ti/HA/ASB mais restent sous les valeurs du Ti, ce qui confirme que la FN et la VN induisent aussi la différenciation des HOP. On peut noter ici que les contrôles corrects de nos essais sont les échantillons Ti/HA et Ti/HA/ASB.

Une estimation du rapport PAL/MTT nous fournit des informations sur l'activité PAL d'une cellule. Les histogrammes de ce rapport sont présentés dans la Figure 68.

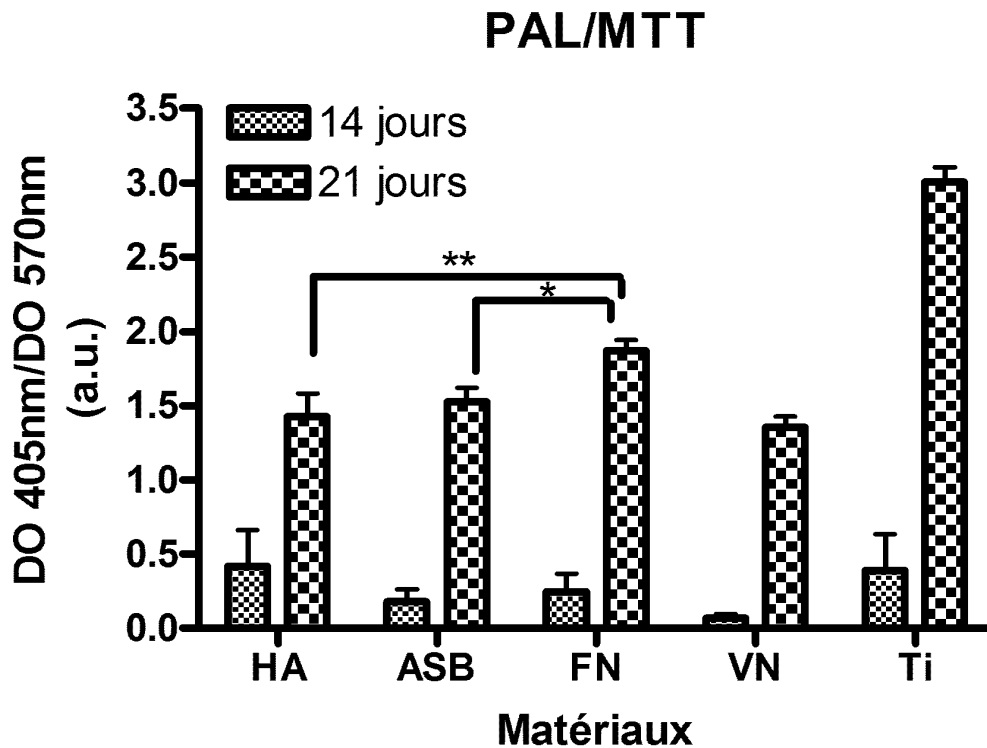


Figure 68: Le rapport PAL/MTT (Activité phosphatase alcaline normalisée sur le nombre de cellules) des HOP après 14 et 21 jours de culture sur les échantillons FN et VN comparé aux contrôles (Ti, Ti/HA et Ti/HA/ASB). *FN vs ASB ($p < 0.05$) ; **FN vs HA ($p < 0.005$)

On trouve un rapport PAL/MTT plus élevé après 14 jours pour les structures HA et FN par rapport aux structures ASB et VN. Les cellules présentent en moyenne dans ces cas une activité PAL plus importante. Après 21 jours de culture on distingue une augmentation de l'activité PAL

par rapport au délai 14 jours pour tous les échantillons, notamment pour les structures FN par rapport aux structures HA et ASB. On note qu'une diminution de l'activité PAL par cellule peut signifier le début d'une autre phase dans la différenciation comme la minéralisation.

3.3.6.2. SECRETION DE COLLAGENE DE TYPE I ET DE L'OSTEOCALCINE PAR LES HOP CULTIVEES SUR LES COUCHES HYBRIDES

Pour vérifier ces hypothèses de formation de matrice extracellulaire et de minéralisation, il est nécessaire de quantifier la synthèse de procollagène de type I et d'ostéocalcine par les cellules HOP ensemencées sur toutes les structures.

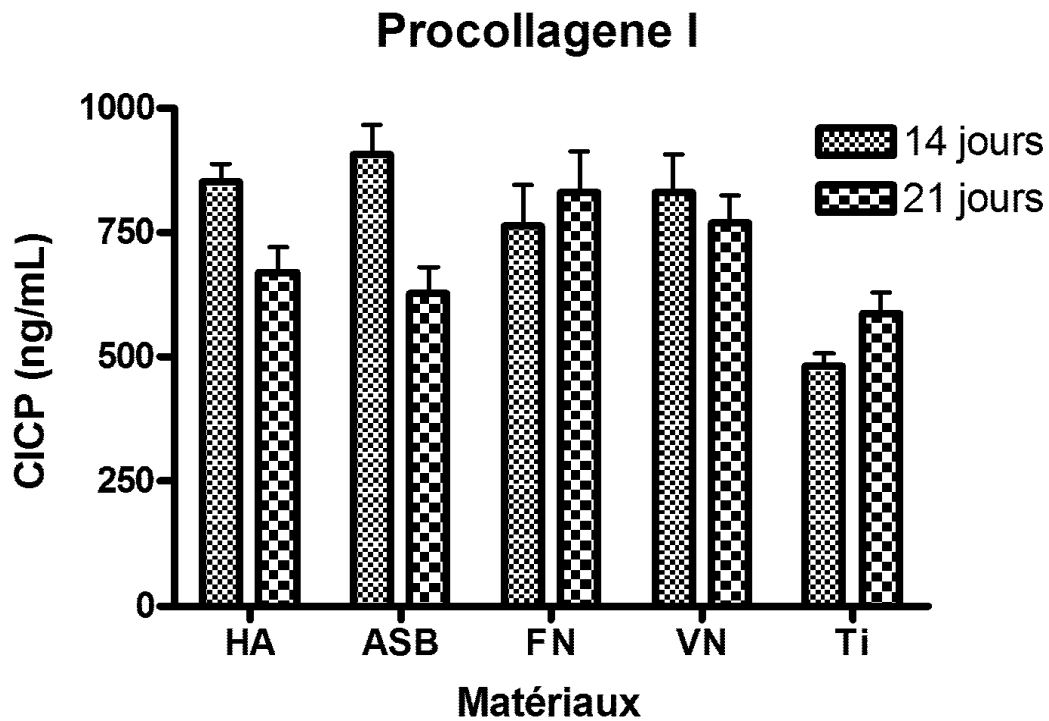


Figure 69: Sécrétion de procollagène de type I (coll I) par les HOP après 14 et 21 jours de culture sur les échantillons FN et VN comparée aux contrôles (Ti/HA et Ti/HA/ASB).

Dans la Figure 69 les valeurs de procollagène de type I sont plus élevées dans les cas de toutes les structures étudiées par rapport au Ti. Après 14 jours, les valeurs de procollagène des

échantillons HA et ASB sont plus élevées que FN et VN. Par contre, ces rapports changent après 21 jours, quand les valeurs FN et VN deviennent plus élevées que les contrôles Ti/HA et Ti/HA/ASB, ce qui confirme que la FN et la VN induisent une sécrétion de procollagène de type I plus abondante.

Le rapport procollagène/MTT (sécrétion de collagène normalisée par cellule) suggère une sécrétion réduite par cellule pour les structures HA, FN et VN à 14 jours comparé à l'ASB. Par contre, après 21 jours la sécrétion de collagène diminue fortement pour atteindre une valeur similaire sur toutes les surfaces (Figure 70). On note ici que la quantité de collagène synthétisé par cellules diminuée entre 14 et 21 jours est cohérente avec le fait que le collagène est un marqueur précoce de différenciation.

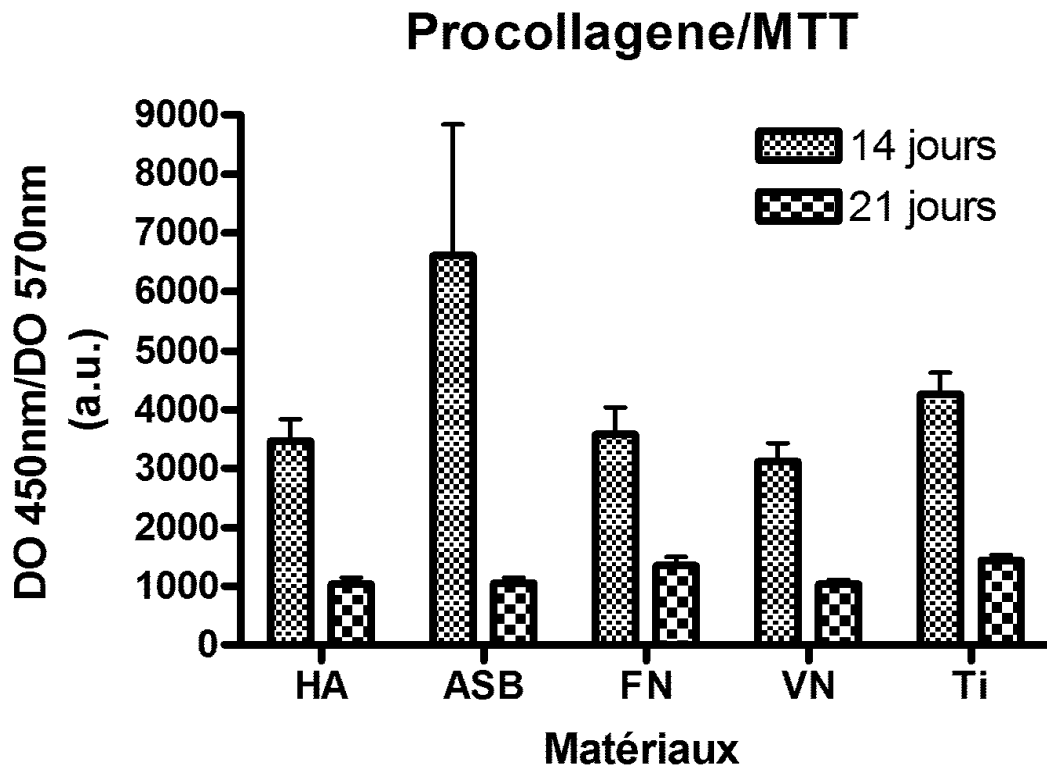


Figure 70: La sécrétion de procollagène de type I par cellule HOP (coll/MTT) après 14 et 21 jours de culture sur les échantillons FN et VN par rapport aux contrôles (Ti, Ti/HA et Ti/HA/ASB).

Un marqueur de différenciation plus tardif est la synthèse d'ostéocalcine (OC). Les histogrammes de synthèse de ce marqueur sont présentés sur la Figure 71.

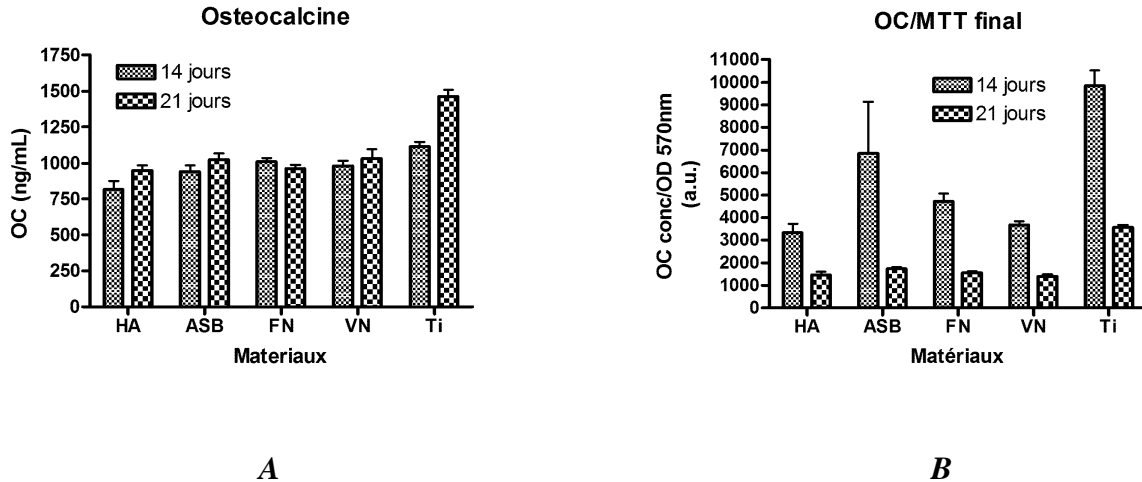


Figure 71: A. Synthèse d'ostéocalcine (OC) après 14 et 21 jours de culture des HOP sur les échantillons FN et VN comparée aux contrôles (Ti/HA et Ti/HA/ASB). B. La sécrétion d'OC par cellule HOP (OC/MTT) après 14 et 21 jours de culture sur les échantillons FN et VN par rapport aux contrôles (Ti, Ti/HA et Ti/HA/ASB).

On voit sur la Figure 71 qu'il n'y a pas de différences significatives entre les échantillons (Figure 71 A). Par contre, le rapport OC/MTT (sécrétion de collagène normalisée par cellule) suggère une sécrétion réduite par cellule pour les structures HA, FN et VN à 14 jours par rapport à l'ASB. Comme pour le collagène, un plateau semble atteint pour tous les échantillons après 21 jours (Figure 71 B).

On doit mentionner que les dosages procollagène et ostéocalcine ont été faits sur le milieu récolté. Une quantité importante des molécules, notamment dans le cas de l'OC qui a une affinité importante pour le Ca, a pu rester immobilisée sur la surface des échantillons avec HA, ce qui pourrait expliquer les valeurs plus élevées dans le cas du Ti par rapport aux autres structures.

D'autres études ont démontré que même s'il n'existe pas de réponse significative sur les derniers stades de différenciation cellulaire, une couche de FN est très importante dans les

premières phases d'ostéointégration (3-5 jours) parce qu'elle induit une chimiotaxie positive pour la cFN (Jimbo R. et al, 2007).

En effet, l'ostéointégration est définie par l'ancrage direct d'un implant grâce à la formation de tissu osseux autour de l'implant, sans formation de tissu fibreux à l'interface os-implant (Albrektsson T et al., 2001). Du point de vue clinique, il y a deux étapes très importantes dans le processus d'intégration d'un implant : une étape de stabilisation primaire (stabilité mécanique) et une autre de stabilisation secondaire (stabilité biologique après remodelage de l'os) (Berglundh T et al., 2003). Les durées de ces étapes dépendent bien sûr de l'âge et de la santé de l'organisme dans lequel on introduit l'implant. Pour une représentation plus claire, une possible phase critique dans le processus de réparation osseuse est présentée sur la Figure 72. Ce processus peut être extrapolé à la réparation osseuse autour d'un implant.

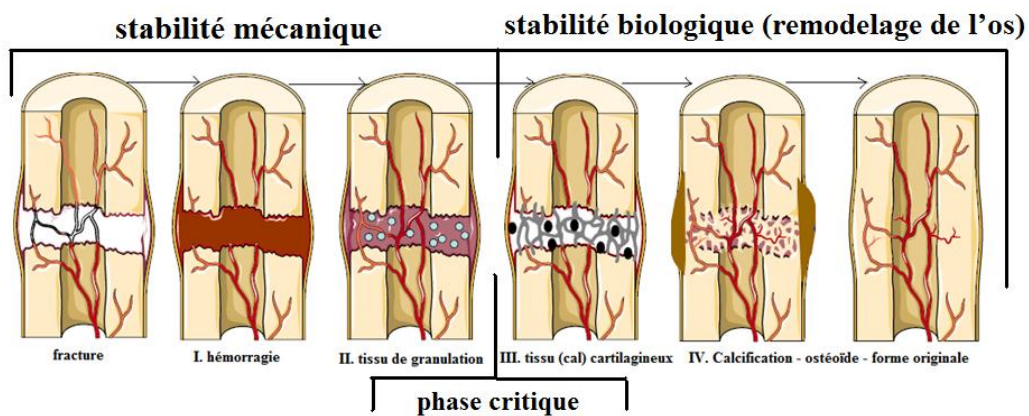


Figure 72 : Les étapes de la réparation osseuse d'une fracture. Possible représentation des étapes de stabilité mécanique, stabilité biologique et phase critique

L'étape de stabilité mécanique débute dès l'introduction de l'implant dans le corps. Cette stabilité est fonction ensuite du remodelage de l'os. La deuxième étape de stabilité biologique est représentée par un contact direct de l'os nouveau formé après le remodelage avec l'implant. La stabilité primaire est ainsi complètement remplacée par la stabilité secondaire quand le processus est complet. Cependant, à un point précis, la stabilité de l'implant peut diminuer fortement pendant la transition entre la stabilité primaire et la stabilité secondaire (phase critique). Beaucoup d'implants cèdent au cours de cette transition qui devient critique pour l'intégration de

l'implant (Raghavendra S et al., 2005). Nos résultats pourraient soutenir l'hypothèse selon laquelle les couches de protéines FN et VN déposées par MAPLE sur des structures de type implant permettraient d'accélérer le début de la phase secondaire.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Des revêtements bioactifs d'hydroxyapatite et de protéines de la matrice extracellulaire qui peuvent interagir avec les cellules osseuses ont été déposés par des méthodes laser sur le titane, matériau le plus utilisé dans l'orthopédie pour ses qualités mécaniques et de biocompatibilité incontestables.

Une couche intermédiaire de phosphate de calcium a été utilisée pour l'amélioration des surfaces de titane. Nous avons choisi de recouvrir le titane par une couche nanostructurée d'HA mimant les caractéristiques de la phase minérale de la matrice osseuse et déposée par PLD, un protocole bien maîtrisé dans notre laboratoire (Sima F et al., 2011E; Mihailescu et al, 2010; Nelea et al., 2007).

Nous avons trouvé pour nos dépôts de couches minces d'HA par PLD un régime de fluence laser qui nous a permis d'obtenir une surface de bonne qualité du point de vue de la rugosité (Rms 370-400 nm), reproductible d'une structure à l'autre, et dont, en même temps, la composition reste inchangée.

La nouveauté de ces études a été le recouvrement de la structure Ti/HA obtenue par PLD par une couche de protéines avec un potentiel très fort d'attachement au tissu. Ainsi, pour améliorer l'intégration de l'implant, des dépôts par MAPLE de fibronectine et de vitronectine, deux protéines de la matrice extracellulaire reconnues pour leur capacité à accélérer l'adhésion des cellules osseuses, ont été réalisées sur la couche inorganique d'HA, pour constituer des structures bicouches Ti/HA/FN et Ti/HA/VN respectivement.

Dans nos expériences MAPLE, le solvant utilisé a été de l'eau distillée. La solution a été complétée par du TRIS et du NaCl pour la stabilisation de la protéine. L'eau distillée n'absorbe pas fortement à la longueur d'onde du laser employé (KrF, 248 nm) tandis que le TRIS, le NaCl ou les protéines absorbent de manière plus importante. De plus, on a observé que les solutions congelées étaient plus absorbantes très probablement à cause d'absorptions liées aux

imperfections, à des bulles d'air ou même à des crevasses dans la cible congelée (Petrovich DK et al., 2002). Nous avons ainsi proposé un modèle d'interaction mixte entre le faisceau laser et la matrice cryogénique où des mécanismes d'absorption non-homogènes sont impliqués. Les molécules de protéines, de tampon et les clusters protéines-tampon dans la solution congelée absorbent à leur surface l'énergie du faisceau UV de laser, ce qui fait chauffer les molécules d'eau limitrophes et à la surface de la cible. A une pression dynamique spécifique, l'eau arrive à bouillir à la température ambiante. Ainsi, les vapeurs d'eau sont dirigées à la normale de la cible en emportant des molécules de protéines et de tampon vers des collecteurs placés en face de la cible.

La fibronectine et la vitronectine ainsi que l'albumine de sérum de veau ont été expulsées de la cible et collectées sur des surfaces de nitrocellulose similaires aux collecteurs utilisés dans les études ultérieures (silicium carré ou titane rond). L'aire recouverte par les molécules de protéines a été révélée par un protocole de coloration avec une solution de Ponceau S et a permis de trouver une distance cible-collecteur optimale de 3.5 cm, compromis entre l'efficacité de dépôt et l'uniformité de la distribution.

Dans le cas de couches de protéines transférées par MAPLE sur Si, nous avons mis en évidence des couches homogènes, avec des petites gouttelettes disposées dans une configuration aléatoire pour les structures recouvertes avec la FN et des tapis non uniformes pour les recouvrements avec la VN. Dans le cas des couches de FN, la hauteur des gouttelettes a été évaluée par profilométrie et estimée entre quelques centaines de nanomètres jusqu'à plus de 1 μm . Ces gouttelettes sont immergées dans une matrice compacte et homogène qui forme des couches minces sur toute la surface des substrats après le transfert MAPLE.

L'évaluation de l'organisation à l'échelle microscopique par AFM des couches déposées par MAPLE a mis en évidence des couches FN-tampon et VN-tampon denses. Entre les régions de couches protéiques, l'arrière-fond est formé d'une couche matrice composée de tampon et d'agrégats. La matrice est distribuée uniformément et pourrait agir comme un « médiateur » (agit comme régulateur chimique) pour les molécules. Une quantité plus importante de sels déposés a été trouvée avec la VN par rapport à la FN. La cause la plus probable de cette différence est la

concentration de VN plus basse dans la cible combinée avec une masse moléculaire réduite de la VN par rapport à la FN.

Les spectres d'absorption en IR des structures protéiques déposées par MAPLE ont été comparés avec les spectres des couches « drop-casts » (déposées par immersion dans une solution). Les mêmes pics d'absorption de la protéine intacte ont été trouvés pour les couches VN et FN obtenues par « drop-casts » et transférées par MAPLE à 1631, 2990 et 3186 cm^{-1} . La conclusion de ces études est que les couches de VN ne présentent aucune dénaturation que ce soit au cours du dépôt par « drop-cast » ou pendant le transfert MAPLE. Des pics supplémentaires visibles seulement dans le cas des couches de FN déposées par MAPLE sont indicatifs d'un degré élevé de structure secondaire des protéines, degré d'organisation nécessaire à l'activité biologique. La bande d'absorption centrée sur 1631 cm^{-1} , et qui correspond à la bande Amide I, la plus sensible à la structure secondaire, représente la preuve principale que les structures de la FN et de la VN sont maintenues intactes lors du transfert par MAPLE.

La préservation de la structure de ces deux protéines après transfert MAPLE est également confirmée par des immunomarquages où des agrégats fluorescents sont visibles pour la VN et la FN sur toute la surface et autour de régions où des structures fibrillaires ont été mises en évidence (pour la FN). Pour éviter le risque d'artefacts liés aux lavages et rinçages des surfaces recouvertes pendant les immunomarquages, de la FN conjuguée antérieurement au FITC a été déposée par MAPLE. L'observation de couches encore plus fluorescentes confirme le transfert des molécules protéiques. Une quantité plus importante du matériau sur le substrat ainsi qu'une distribution plus homogène et uniforme sous forme de couches minces ont été obtenues.

La première observation de l'attachement des cellules HOP a été faite sur du silicium recouvert par de la FN déposé par MAPLE et comparée aux cellules cultivées sur le silicium ou du verre borosilicaté. Après trois heures de croissance sur le verre borosilicaté, les cellules HOP présentent des formes caractéristiques rondes et une coloration de l'actine corticale tandis que les filaments d'actine (fibres de stress) sont plus évidents dans le cas des cellules cultivées sur le silicium. Des patterns de fibres d'actine parallèles et bien étalés dans le cytoplasme, allant de la membrane des noyaux à la membrane plasmique sont visibles sur les échantillons de silicium

recouverts avec la FN par MAPLE ce qui confirme la conservation de la structure et de la fonctionnalité des molécules protéiques déposées.

Des études plus approfondies par immunomarquage et microscopie de fluorescence ont ensuite été réalisées sur les structures bicouches HA/protéine. Les structures Ti/HA/FN et Ti/HA/VN ont été utilisées pour tester la fonctionnalité des couches protéiques après l'interaction avec des cellules HOP et comparées aux structures contrôles (Ti/HA/ASB, Ti/HA et Ti). Un cytosquelette cellulaire normal et une bonne densité de cellules ont été observés après 1, 3 et 7 jours de culture sur tous les échantillons. Les cellules cultivées sur les revêtements de FN et de VN montrent des points d'adhésion sur le substrat très visibles après 1 et 3 jours ainsi que de longs filopodes. Une tendance au détachement est observée au microscope de fluorescence pour les cellules cultivées sur les revêtements d'HA seuls tandis que sur la FN les cellules forment après 7 jours des clusters et sur la VN un tapis homogène.

La morphologie des cellules après 7 jours de culture confirme que les HOP s'étalent bien et présentent des contacts intimes avec les surfaces fonctionnalisées par les protéines, en particulier avec les structures recouvertes avec la FN. Dans ce cas, on distingue des filopodes très denses et ancrés dans les couches de FN. On observe aussi par MEB une structure très poreuse des surfaces recouvertes par les couches de protéines, bien différente de la structure de l'HA.

Les études de prolifération et différenciation cellulaire suggèrent une prédisposition des HOP à la prolifération induite par les revêtements VN et à la différenciation stimulée par les revêtements FN.

Les effets significatifs sur l'attachement, l'adhésion et la prolifération observés dans nos études sont très importants pour la première phase de stabilité mécanique d'un implant. Les couches HA/protéines déposées par laser pourraient permettre de réduire cette phase. Par contre, en ce qui concerne la différenciation cellulaire, nos résultats ne mettent pas en évidence d'effets significatifs de la présence de la fibronectine ou de la vitronectine.

Dans le cadre de l'élaboration de biomatériaux osseux, une préoccupation importante doit toujours représenter le contrôle du comportement des cellules osseuses sur les matériaux à plus

long terme (prolifération et différenciation), comportement sur lequel les protéines de la matrice extracellulaire, comme la FN ou VN, jouent un rôle prépondérant *in vivo* et qu'il conviendrait d'étudier, en utilisant aussi d'autres types cellulaires.

Comme perspective immédiate, une meilleure immobilisation de la ou des protéines sur la surface solide doit représenter un des intérêts majeurs dans ces procédés de dépôts. Il faudrait étudier aussi la cinétique de libération de la protéine immobilisée à la surface et corroborer cela avec les réponses cellulaires. De plus, un marquage avec des anticorps monoclonaux est obligatoire pour réussir à interpréter les voies de signalisation impliquées dans les interactions cellule-protéines. Ainsi, un meilleur contrôle de la rugosité et/ou de la mouillabilité des surfaces substrat pourrait fournir un changement conformationnel qui augmenterait l'accessibilité de la séquence RGD pour la fixation de l'intégrine. Nous proposons des traitements chimiques (des couches ligand intermédiaires) et thermiques (par laser ou par chauffage classique) des surfaces afin d'obtenir une topographie et une chimie améliorées capables de réaliser le compromis entre l'immobilisation et le maintien de la conformation de la protéine transférée. De plus, en appliquant des masques spécifiques micrométriques sur le substrat, il est possible d'obtenir des microspots de protéines avec des géométries diverses pour une évaluation parallèle *couches vs microspots*.

Une autre direction à suivre pourrait concerner la réalisation d'une couche hybride formée d'une protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire (comme la FN ou VN) et de protéines ostéoinductives (facteurs de croissance de l'os) capable d'induire la formation d'os ou de cartilage. Nous proposons aussi le développement de la technique MAPLE vers la MAPLE combinatoire, inspirée de la PLD combinatoire afin de synthétiser des matériaux organiques complexes et innovants et d'identifier le dosage optimum des deux protéines pour une application spécifique. Dans la MAPLE combinatoire, un faisceau laser est partagé en deux faisceaux qui irradient deux matériaux différents (M1 et M2) comme dans la Figure S1. On obtient ainsi un *gradient de composition* de 100% M1 (par exemple FN ou VN) à 100% M2 (facteur de croissance) (Figure S2).

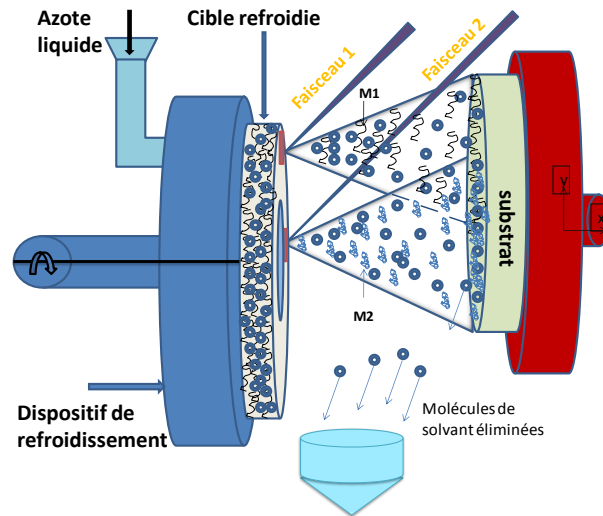


Figure 1S: Schéma de la technique MAPLE combinatoire

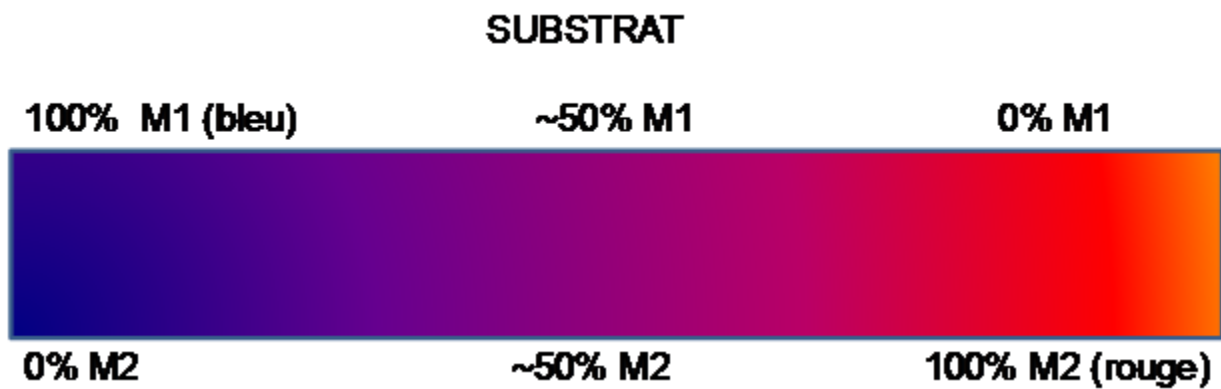


Figure 2S: Cartographie du gradient de composition des structures déposées

D'autre part, il est nécessaire de favoriser l'adhérence cellulaire et la régénération osseuse sur des implants et en même temps de comprendre les mécanismes impliqués dans l'interaction cellulaire avec la topographie et la chimie de surface via l'adsorption ou le greffage de différents biomolécules.

Finalement, l'objectif à terme serait de reproduire une structure complexe d'une conception et d'une forme plus sophistiquées permettant de réaliser une bonne interface avec le tissu osseux et de mimer le microenvironnement cellulaire natif. L'idée serait ainsi de créer une interface

tissulaire intelligente basée sur des biomatériaux présentant un gradient compositionnel, structurel et fonctionnel.

5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Addison WN, Miller SJ, Ramaswamy J, Mansouri A, Kohn DH, McKee MD, *Biomaterials*, 31(36):9422-30, 2010;
- Adler, S., Brady H. R., *Am J Med* 107(4): 371-386, 1999 ;
- Alberts et al. *L'essentiel de la biologie moléculaire*. Editions Médecine-sciences Flammarion p 530-532, 2002 ;
- Albrektsson T, Johansson C., *Eur Spine J*, 10:96–101, 2001;
- Altankov G, Groth T, Krasteva N, Albrecht W, Paul D, *J Biomater Sci Polym Ed.*;8(9):721-40, 1997 ;
- Anisimov SI, Bauerle D, Lukyanchuk BS, *Physical Review B*, 48 (16), p. 12076, 1993;
- Anselme, K., *Biomaterials* 21(7): 667-681, 2000;
- Anselme, K., Linez P., et al., *Biomaterials* 21(15): 1567-1577, 2000;
- Anselme, K., Bigerelle M., *Acta Biomater* 1(2): 211-222, 2005;
- Anselme K, Davidson P, Popa AM, Giazzon M, Liley M, Ploux L., *Acta Biomater.*; 6(10):3824-46, 2010;
- Antonakos, A., E. Liarokapis, et al., *Biomaterials* 28(19): 3043-3054, 2007;
- Applegate, Edith J. *The Anatomy and Physiology Learning System: Textbook*. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 1995;
- Arrondo JLR, Goni FM., *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 72:367–405, 1999;
- Arthur J.R., *Surface Science* 500, 189, 2002;
- Ball M.D., S. Downes, C.A. Scotchford, E.N. Antonov, V.N. Bagratashvili, V.K. Popov, W.-J. Lo, D.M. Grant, S.M. Howdle, *Biomaterials* 22:337-347, 2001;
- Bandekar J., *Biochim. Biophys. Acta.*;11, 20:123-143, 1992;
- Bauerle, D, *Laser processing and Chemistry*, Third Revised and Enlarged Edition, Springer, 2000;
- Benecky MJ, Wine RW, Kolvenbach CG, Mosesson MW, *Biochemistry*, 30:4298-306, 1991;
- Benoit, D. S., and Anseth, K. S., *Biomaterials*, 26, 5209, 2005;

Benoit, D. S. W., et al., *Biomaterials*, 28, 66, 2007 ;

Bergeld J. and Chakarov D., *J. Chem. Phys.* 125, 141103, 2006 ;

Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J., *Clin Oral Implants Res*, 3:251–62, 2003;

Betancor L, Lopez-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Dellamora-Ortiz Cesar Mateo G, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM., *Enzyme Microb Technol.*, 39:877-882, 2006;

Bigi A, Boanini E, Capuccini C, Fini M, Mihailescu IN, Ristoscu C, Sima F, Torricelli P., *Biomaterials*; 30(31):6168-77, 2009;

Bissell MJ, Aggeler J., *Prog Clin Biol Res*, 249:251–62, 1987;

Blodgett KB., *J Am Chem Soc*, 56:495-495, 1934;

Boccaccini AR, Keim S, Ma R, Li Y, Zhitomirsky I, 7 Suppl 5:S581-613, 2010;

Bökel, C., and Brown, N., *Dev. Cell*, 3, 311, 2002;

Bowers, K. T., Keller JC., et al., *Int J Oral Maxillofac Implants* 7(3): 302-310, 1992;

Boyan, B. D., Hummert TW., et al., *Biomaterials* 17(2): 137-146, 1996;

Bracci B, Torricelli P, Panzavolta S, Boanini E, Giardino R, Bigi A., 103(12):1666-74. 2009;

Briand E, Salmain M, Compere C, Pradier CM., *Colloids Surf., B.*, 53:215-224, 2009;

Brinker C.J., A.J Hurd, G.C Frye, P.R. Shunkand and C.S. Ashley, *J. Ceram. Soc. Japan* 99, 862, 1991;

Brown E, Dejana E, editors. Cell-to-cell contact and extracellular matrix editorial overview: cell–cell and cell–matrix interactions—running, jumping, standing still. *Curr Opin Cell Biol*, 15:1–4, 2003;

Bubb DM, O'Malley S., Antonacci C, Simonson D, McGill RA, *J. Appl. Phys.* 95, 2175, 2004;

Burdick JA, Anseth KS., *Biomaterials*, 23:4315–4323, 2002;

Capasso, F.; Munday, J.N.; Iannuzzi, D.; Chan, H.B., *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* 13 (2): 400, 2007;

Capuccini C, Torricelli P, Sima F, Boanini E, Ristoscu C, Bracci B, Socol G, Fini M, Mihailescu IN, Bigi A, *Acta Biomater.*, 4(6):1885-93. 2008;

Chandran P. et al., *Journal of Arthroplasty*, Volume 25, Issue 1, Pages 52-57, 2010;

Chrisey DB, Piqué A., McGill R. A., Horwitz J. S., Ringeisen B. R., Bubb D. M., Wu P. K., *Chem. Rev.* 103, 553, 2003 and references therein;

Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A et al., *Circulation*, 106:3006-3008, 2002 ;

Cristescu R., G. Dorcioman, C. Ristoscu, E. Axente, S. Grigorescu, A. Moldovan, I. N. Mihailescu, T. Kocourek, M. Jelinek, M. Albulescu, T. Buruiana, D. Mihaiescu, I. Stamatina, D. B. Chrisey, *Appl. Surf. Sci.* 252, 4647; 2006a;

Cristescu R., T. Kocourek, A. Moldovan, L. Stamatina, D. Mihaiescu, M. Jelinek, I. Stamatina, I. N. Mihailescu, D. B. Chrisey, *Appl. Surf. Sci.* 252, 4652, 2006b;

Cristescu R., T. Patz, R. J. Narayan, N. Menegazzo, B. Mizaikoff, D. E. Mihaiescu, P. B. Messersmith, I. Stamatina, I. N. Mihailescu, D. B. Chrisey, *Appl. Surf. Sci.* 247, 217, 2005;

Cristescu R., D. Mihaiescu, G. Socol, I. Stamatina, I. N. Mihailescu, D. B. Chrisey, *App. Phys. A* 79, 1023, 2004;

Crubezy, E., P. Murail, et al., *Nature* 391(6662): 29, 1998;

Curtis, A., and Wilkinson, C., *Biochem. Soc. Symp.*, 65, 15, 1999;

Dalby, M. J., et al., *Nat. Mater.* 6, 997, 2007;

Dalton BA, McFarland CD, Underwood PA, Steele JG., *J. Cell Sci.*, 108:2083-2092, 1995;

Danen, E. H. et A. Sonnenberg, *J Pathol* 201(4): 632-641, 2003 ;

Debenedetti P., *Metastable Liquids: Concepts and Principles*, Princeton University Press: Princeton, NJ, 1996;

Decher G, Hong JD, *Thin Solid Films*, 210:831-835, 1992;

Degasne, I., M. F. Basle, et al., *Calcif Tissue Int* 64(6): 499-507, 1999;

Delahay P. and Von Burg K., *Chem. Phys. Lett.* 83, 250, 1981;

Deligianni, D. D., N. Katsala, et al., *Biomaterials* 22(11): 1241-1251, 2001;

Dhert WJA, *Med Prog Technol.* 20, 143-154, 1994;

Dinda G.P., Shin J., Mazumder J., *Acta Biomaterialia* 5, 1821–1830, 2009;

Dobkin and Zuraw, *Principles of Chemical Vapor Deposition*, Kluwer, 2003;

Dolatshahi-Pirouza A, Jensea THL, Kolind K, Bünger C, Kassem M, Foss M, Besenbacher F., *Colloids Surf., B* , in press, doi:10.1016/ j.colsurfb.2010.12.004;

Doraiswamy A., R. J. Narayan, R. Cristescu, I. N. Mihailescu, D. B. Chrisey, *Mat. Sci. Eng. C* 27, 409, 2007;

Doraiswamy A., R. J. Narayan, T. Lippert, L. Urech, A. Wokaun, M. Nagel, B. Hopp, M. Dinescu, R. Modi, R. C. Y. Auyeung, D. B. Chrisey, *Appl. Surf. Sci.* 252, 4743, 2006;

de Bartolo L, Morelli S, Bader A, Driolia E., *Biomaterials*, 23:2485-2497, 2002;

de Oliveira PT, Nanci A., *Biomaterials*, 25: 403–413, 2004;

Dreesen L, Humbert Ch, Sartenaer Y, Caudano Y, Volcke C, Mani AA, Peremans A, Thiry PA, Hanique S, Frere JM. *Langmuir*, 20:7201-7207, 2004;

Ducheyne P, RAdin S, Heughebaert M, Heughebaert JC, 11, 244-254, 1990;

Ducy P, Geoffroy V, Karsenty G., *Connect Tissue Res.*, 35:7–14, 1996;

Ellegaard O. and Schou J., *J. Appl. Phys.* 83, 1078, 1998;

Esenaliev R. O., Karabutov A. A., Podymova N. B., and Letokhov V. S., *Appl. Phys. B: Lasers Opt.* 59, 73, 1994;

Fernandez-Pradas J.M., L. Cleries, E. Martinez, G. Sardin, J. Esteve, J.L. Morenza, *Biomaterials* 22, 2171-2175, 2001;

Flemming, R. G., C. J. Murphy, et al., *Biomaterials* 20(6): 573-588, 1999;

Geesink RGT, *Clin Orthop Relat Res*, 395, 53-65, 2002;

Giancotti, F. G. et E. Ruoslahti, *Science* 285(5430): 1028-1032, 1999;

Ginty, P. J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 7426, 2006;

Giordano C, Sandrini E, Del Curto B, Signorelli E, Rondelli G, Di Silvio L, *J Appl Biomater Biomech*, 2:35–44, 2004;

Goormaghtigh E, Cabiaux V, Ruyschaert JM. In: Hilderson HJ and Ralston GB editors. *Subcellular biochemistry*, Vol. 23: Physicochemical methods in the study of biomembranes. New York: Plenum Press; p. 405–450, 1994;

Grizon, F., E. Aguado, et al., *J Dent* 30(5-6): 195-203, 2002;

Grzesik, W. J. and Robey, P. G., *J Bone Miner Res* 9:487-496, 1994;

Gyorgy E., del Pino A., Sauthier G., Figueras A., *J Appl Phys.*, 106, 114702-1, 2009a;

Gyorgy E, Sima F, Mihailescu IN, Smausz T, Megyeri G, Kekesi R, Hopp B, Zdrentu L, Petrescu SM., *J Biomed Mater Res A.*, 89A:186-191, 2009B;

Ha TH, Jung SO, Lee JM, Lee KY, Lee Y, Park JS, Chung BH., *Anal Chem.*, 79:546-556, 2007;

Halpert I, Sires UI, Roby JD, Potter-Perigo S, Wight TN, Shapiro SD, Welgus HG, Wickline SA, Parks WC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:9748–9753, 1996;

Hao J, Kuroda S, Ohya K, Bartakova S, Aoki H, Kasugai S, *J Mater Sci Mater Med.* 22(6):1489-99, 2011;

Hatano, K., H. Inoue, et al., *Bone* 25(4): 439-445, 1999;

Hauert R., *Diamond Relat. Mater.* 12, p 583-589, 2003;

Helfrich, M. H., Nesbitt, S. A., Dorey, E. L., and Horton, M. A., *J Bone Miner Res* 7:335-343, 1992;

Hennessy K.M., Will C. Clem, Matthew C. Phipps, Amber A. Sawyer, Faheem M. Shaikh, Susan L. Bellis, *Biomaterials* 29, 3075–3083, 2008;

Hero H, Wie H, Jorgenson RB, Ruyter IE, *J Biomed Mater Res*, 28, 343-348, 1994;

Hozumi, K., D. Otagiri, et al. *Biomaterials*, 31, 12, Pages 3237-3243, 2010;

Hsu, S. H., B. S. Liu, et al., *Biomed Mater Eng* 17(1): 53-68, 2007;

Humphries M.J., *Integrin Structure, Biochemical Society Transactions* 28, (311–340), 2000;

Hynes RO, *Fibronectins, Springer-Verlag, New York, USA*, 1990;

Hynes R.O., *Cell* 69, 11–25, 1992;

Huang, J., et al., *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 16, 1137, 2005;

Itina, T. E., L. V. Zhigilei, and B. J. Garrison, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 180, 238, 2001;

Iwaya, Y., M. Machigashira, et al. *Dent Mater J* 27(3): 415-421, 2008;

Jimbo R., Sawase T, et al., *Biomaterials* 28, 3469–3477, 2007;

Johnson, K. J., Sage, H., Briscoe, G., and Erickson, H. P., *J Biol Chem* 274:15473-15479, 1999;

Juodzbaly, G., M. Saprioniene, et al., *J Oral Implantol* 33(4): 177-185, 2007;

Jung C. *J Mol Recognit.*, 13:325-351, 2000;

Kamikubo Y, De Guzman R, Kroon G, Curriden S, Neels JG, Churchill MJ, Dawson P, Ołdziej S, Jagielska A, Scheraga HA, Loskutoff DJ, Dyson HJ, *Biochemistry* 43 (21): 6519–34, 2004;

Kaplan FS, Hayes WC, Keaveny TM, et al. Bone biology. In: Simon SR, editor. *Orthopedic basic science.: American Academy of Orthopedic Surgeons*, p 127–185, 1994;

Karas M., Hillenkamp F., *Anal. Chem.* 60, 2299, 1988;

Katayama H., M. Katto, T. Nakayama, *Surface & Coatings Technology* 204,135–140, 2009;

Katto M, Ishibashi K., et al., *Journal of Laser Micro/Nanoengineering* Vol. 2, No. 2, 2007;

Kelly R., A. Miotello, *Phys. Rev. E* 60, 2616, 1999;

Khosroshahi, M. E., Mahmoodi M., et al. *Lasers Med Sci* 24(6): 925-939, 2009;

Kleinman HK, Philp D, Hoffman MP., *Curr Opin Biotechnol* 14(5) : 526–32, 2003;

Kieswetter, K., Schwartz Z., et al., *J Biomed Mater Res* 32(1): 55-63, 1996;

Kim, H. M., C. Rey, et al., *J Bone Miner Res* 10(10): 1589-1601, 1995;

Kilpadi, K., Chang, P.-L., and Bellis, S., *J Biomed Mater Res* 55:258-267, 2001;

Knabe, C., C. Koch, et al., *Biomaterials* 29(14): 2249-2258, 2008;

Kokkinaki O., Georgiou S., *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, Vol. 2, No. 2, p. 221 – 241, 2007;

Kubo, K., N. Tsukimura, et al., *Biomaterials* 30(29): 5319-5329, 2009;

Lacefield WR, *Adv Dent Res*, 13, 21-26, 1999;

Lacefield WR, *Implant Dent*, 7, 315-322, 1998;

Landis, W. J., M. J. Song, et al., *J Struct Biol* 110(1): 39-54, 1993;

Leeuwenburgh SC, Wolke JG, Siebers MC, Schoonman J, Jansen JA, *Biomaterials*,27(18):3368-78, 2006;

Leveugle E., Zhigilei L. V., *J Appl Phys.*, 102, 074914-1, 2007;

Li WJ, Jiang YJ, Tuan RS, *Tissue Eng* 12:1775–1785, 2006;

Lin DY, Wang XX, Jiang Y, Effect of trisodium citrate on electrolytic deposition of hydroxyapatite coatings, *J Mater Sci Mater Med.*, 22(5):1205-11, 2011;

Liu Y, Wu G, de Groot K., *J R Soc Interface*, 7: S631-S647, 2010;

Liu, X. H., and Ma, P. X., *Ann. Biomed. Eng.*, 32, 477, 2004;

Llopis-Hernández V, Rico P, Ballester-Beltrán J, Moratal D, Salmerón-Sánchez M., *PLoS One*; 6(5):e19610, 2011;

Ma, P. X., and Choi, J. W., *Tissue Eng.*, 7, 23, 2001;

Maheshwari, G. G., et al., *J. Cell Sci.*, 113 (Pt 10), 1677, 2000;

Mart, R. J., et al., *Soft Matter*, 2, 822, 2006 ;

Martin, J. Y., Z. Schwartz, et al., *J Biomed Mater Res* 29(3): 389-401, 1995;

Martin PM, *Handbook of deposition technologies for films and coatings*, 3rd Edition, Elsevier Inc., 2010;

Martynyuk M. M., *Sov. Phys. Technol. Phys.* 19, 793, 1974;

Matsuura, T., Hosokawa, R., Okamoto, K., Kimoto, T., and Akagawa, Y., *Biomaterials* 21:1121-1127, 2000;

Maurer P, Hohenester E, Engel J., *Curr Opin Cell Biol.* 8:609–617, 1996;

Mayasundari A, Whittemore NA, Serpersu EH, Peterson CB, *J. Biol. Chem.* 279 (28): 29359–66, 2004;

McCann TJ, Mason WT, Meikle MC, McDonald F., *Matrix Biol.*, 16:273–283, 1997;

Mihailescu, IN, Ristoscu C, Bigi A, Mayer I, Chapter 10 in Miotello A, Ossi PM, Editors “Laser-Surface Interaction for New Material Production”, Springer Series in Materials Science, 2010;

Mihryan A, Forsgren J, Strømme M, Engqvist H., *Langmuir*, 25(3):1292-5, 2009;

Milburn C., J. Chen, Y. Cao, G.M. Oparinde, M.O. Adeoye, A. Beye, W.O. Soboyejo, *Materials Science and Engineering C* 29, 306–314, 2009;

Nakata K, Umehara M, Tsumura T, *Surface and Coatings Technology*, 201, 9-11, Pages 4943-4947, 2007;

Nelea V., I.N. Mihailescu, and M. Jelinek, in *Pulsed Laser Deposition of thin films: applications-lead growth of functional materials*, R. Eason (Ed), Wiley & Sons, New York, USA, 2007;

Nishi N., Shinohara H., and Okuyama T., *J. Chem. Phys.* 80, 3898, 1984;

Papadopoulos, T., A. Tsetsekou, et al., *Eur J Prosthodont Restor Dent* 7(1): 15-21, 1999;

Pattanayak D. K., Matsushita T., et al., *Bioceramics Development and Applications Vol. 1*, Article ID D101206, 2010;

Patz T. M, A. Doraiswamy, R. J. Narayan, W. He, Y. Zhong, R. Bellamkonda, R. Modi, D. B. Chrisey, *J. Biom. Mat. Res. B-Appl. Biomat.* 78B, 124, 2006 ;

Pegueroles M., C. Aparicio, M. Bosio, E. Engel, F.J. Gil, J.A. Planell, G. Altankov, *Acta Biomaterialia* 6, 291–301, 2010;

Pellenc D, Berry H, Gallet O., *J. Colloid Interface Sci.*, 298:132-144, 2006;

Penel, G., G. Leroy, et al., *Calcif Tissue Int* 63(6): 475-481, 1998;

Petrie TA., Jenny E. Raynor, Catherine D. Reyes, Kellie L. Burns, David M. Collard , AndreJ. Garcia, *Biomaterials* 29, 2849–2857, 2008;

Petrovich D. K., UV Radiation and Arctic Ecosystems, edited by D. Hessen, Springer, Berlin, p. 73, 2002;

Pique A, McGill RA, Chrisey DB, Leonhardt D, Mslna TE et al., Thin Solid Films, 536:355-356, 1999.

Pique A, in Pulsed Laser Deposition of thin films: applications-lead growth of functional materials, R. Eason (Ed), Wiley & Sons, New York, USA, 2007;

Poulouin, L., Gallet, O., Rouahi, M., and Imhoff, J. M., Protein Expr Purif 17:146-152, 1999;

Qu J, Lu X, Li D, Ding Y, Leng Y, Weng J, Qu S, Feng B, Watari F., J Biomed Mater Res B Appl Biomater; 97(1):40-8, 2011;

Raghavendra S, Wood MC, Taylor TD. Int J Oral Maxillofac Implants, 20:425–31, 2005;

Raj J, Herzog G, Manning M, Volcke C, MacCraith BD, Ballantyne S, Thompson M, Arrigan DWM., Biosens Bioelectron., 24:2654-2658, 2009;

Ratner, BD et al. Biomaterials Science 2nd Edition. Elsevier academic press. 2004. p2, Amsterdam ; Boston : Elsevier Academic Press, 2004;

Rezwan, K., Q. Z. Chen, et al., Biomaterials 27(18): 3413-3431, 2006;

Ribeiro N., Sousa S.R., Monteiro F.J., J. Colloid Interface Sci. 351, 398–406, 2010;

Richardson J., Adv. Prot. Chem. 34 :174-175, 1981;

Roach, P, D. Farrar, and C. C. Perry, , J. Am. Chem. Soc., 128, 3939-3945, 2006;

Rodrigo K, Toftman B, Schou J, Pedrys R. J. Low Temp. Phys. 139, 683, 2005;

Rodrigo K, Czuba P, Toftmann B, Schou J, Pedrys R., Appl Surf Sci. 252:4824-4828, 2006;

Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A., J Cell Physiol, 199(2): 174–80, 2004;

Rupp, F., L. Scheideler, et al., Biomaterials 25(7-8): 1429-1438, 2004;

Ryan, G., A. Pandit, et al., Biomaterials 27(13): 2651-2670, 2006;

Salasznyk, R. M., Williams, W. A., Boskey, A., Batorsky, A., and Plopper, G. E., J Biomed Biotechnol 2004:24-34, 2004;

Salinovich O., Montelaro R. C., Anal. Biochem., 156, 341, 1986;

Sawyer A.A., K.M. Hennessy, S.L. Bellis, Biomaterials 26, 1467–1475, 2005;

Sawyer A.A., K.M. Hennessy, S.L. Bellis, Biomaterials 28, 383–392, 2007;

Schubert DW, Dunkel T., Materials Research Innovations Vol. 7, p. 314, 2003;

Schwartz, I., Seger D., and Shaltiel S., Vitronectin, Int J Biochem 31:539-544, 1999;

Scopelliti PE, Borgonovo A, Indrieri M, Giorgetti L, Bongiorno G, Carbone R, Podestà A, Milani P., PLoS One, 29;5(7):e11862, 2010;

Scriven, L.E., “Physics and applications of dip coating and spin coating”, Better ceramics through chemistry III. pp. 717–729, 1988;

Segvich SJ, Smith HC, Kohn DH, 30(7):1287-98, 2009;

Serra P, Morenza J.L, Thin Solid Films 335, 43-48, 1998;

Sheeja D, B.K.Tay, X. Shi, S.P. Lau, C. Daniel, S.M. Krishnan and L.N. Nung, Diamond Relat. Mater. 10, p 1043-1048, 2001;

Sherwood, J. K., et al., Biomaterials, 23, 4739, 2002;

Siebers, M. C., P. J. ter Brugge, et al., Biomaterials 26(2): 137-146, 2005;

Sima F, Davidson P, Pauthe E, Sima LE, Gallet O, Mihailescu IN, Anselme K., Acta Biomater., in press, 2011A;

Sima F, Davidson P, Pauthe E, Gallet O, Mihailescu IN, Anselme K., Applied Physics A., accepted, June, 2011B;

Sima F, Mutlu EC, Eroglu MS, Sima LE, Serban N, Ristoscu C, Petrescu SM, Oner ET, Mihailescu IN, Biomacromolecules. 13;12(6):2251-6, 2011C;

Sima, F.; Axente, E.; Ristoscu, C.; Mihailescu, I. N.; Kononenko, T. V.; Nagovitsin, I. A.; Chudinova, G.; Konov, V. I.; Socol, M.; Enculescu, I.; Sima, L. E.; Petrescu, S. M. J. Biomed. Mater. Res., 96A, 384, 2011D;

Sima F, Ristoscu C, Caiteanu D, Mihailescu CN, Stefan N, Mihailescu IN, Prodan G, Ciupina V, Palcevskis E, Krastins J, Sima LE, Petrescu SM, Journal of Biomedical Materials Research – Part B, 96B, 2, p. 218-224, 2011E;

Sima F, Ristoscu C, Stefan N, Dorcioman G, Mihailescu IN, Sima LE, Petrescu SM, Palcevskis E, Krastins J, Zalite I, Applied Surface Science, 255(10), p. 5312-5317, 2009A;

Sima F., Ristoscu C., Popescu A., Mihailescu I. N., Kononenko T., Simon S., Radu T., Ponta O., Mustata R., Sima L. E., Petrescu S. M., Journal of Optoelectronics and Advanced Materials, 11(9), 1170 – 1174, 2009B;

Sima F., Socol G., Axente E., Mihailescu I.N., Zdrentu L., Petrescu S.M., Mayer I., Applied Surface Science 254, 4, 1155-1159, 2007;

Sima LE, Stan GE, Morosanu CO, Melinescu A, Ianculescu A, Melinte R, Neamtu J, Petrescu SM, *J Biomed Mater Res A.*, 95(4):1203-14, 2010;

Singh RK, Narayan J, *Phys Rev B*, 41, 8843, 1990;

Skripov Y. P., *Metastable Liquids*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1974;

Smausz T., Megyeri G., Kekesi R., Vass C., Gyorgy E., Sima F., Mihailescu I.N., Hopp B., *Thin Solid Films*, 517, 4299, 2009;

Smith P et al., Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal.Biochem.* 150:75-85, 1985;

Stevens, M. M., and George, J. H., *Science*, 310, 1135, 2005;

Stevens, M. M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 11450, 2005;

Szmukler-Moncler, S., D. Perrin, et al. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 68(2): 149-159, 2004;

Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2, 151, 1988;

Taubman M.B. et al, *Science* 186, 1115, 1974 ;

Tiainen V.-M., *Diamond Relat. Mater.* 10, p 153-160, 2001;

Vacanti, J. P., and Robert, R. S., US Patent 5,770,193, 1998;

Valenick L. V., H. C. Hsia, J. E. Schwarzbauer, *Exp. Cell Res.*, 309, 48, 2005;

Van De Graaff, Kent M. *Human Anatomy 5th Edition*. WEB McGraw-Hill. Boston, MA. 1998;

Van de Weert M, Haris PI, Hennink WE, Crommelin DJA., *Anal. Biochem.* 297:160–169, 2001;

Vareiro MMLM, Liu J, Knoll W, Zak K, Williams D, Jenkins ATA, *Anal Chem* 77:2426-2431, 2008;

Webster TJ, Schadler LS, Siegel RW, Bizios R., *Tissue Eng.*, 7:291–301, 2001;

Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, et al. *Biomaterials* 21:1803–1810, 2000;

Webster, T. J., and Ahn, E. S., *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 103, 275, 2007;

Weiping Q, Bin X, Lei W, Chunxiao W, Danfeng Y, Fang Y, Chunwei Y, Yu W, *J Colloid Interface Sci.*, 214:16-19, 1999;

Weiss, P., L. Obadia, et al. *Biomaterials* 24(25): 4591-4601, 2003;

Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ, *Tissue Eng* 11:1–18, 2005;

Wittmer CR, Phelps JA, Saltzman WM, Van Tassel PR, *Biomaterials* 28, 851–860, 2007;

Wu P. K., B. R. Ringeisen, D. B. Krizman, C. G. Frondoza, M. Brooks, D. M. Bubb, R. C. Y. Auyeung, A. Piqué, B. Spargo, R. A. McGill, D. B. Chrisey, *Rev. Sci. Instrum.* 74, 2546, 2003;

Wu Z, Ding L, Chen H, Yuan L, Huang H, Song W., *Colloids Surf., B*, 69:71-76, 2009;

Xu, W.; Baribault, H.; Adamson, E.D, *Development* 125 (2): 327–337, 1998;

Yamada KM, Clark RAF, in *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (Ed. R. A. F. Clark), Plenum Press, New York, USA, p. 51, 1996;

Yang C, *J Oral Maxillofac Surg*, 60, 422-426, 2002;

Yang F, Williams CG, Wang DA, Lee H, Manson PN, Elisseff J., *Biomaterials*. 26:5991–5998, 2005;

Yang Y, Kim KH, Ong GL, *Biomaterials*, 26, 327-337, 2005;

Yang W, Trau D, Renneberg R, Yu NT, Caruso F., *J Colloid Interface Sci.*, 234:356-362, 2001;

Yatohgo T., Izumi M., Kashiwagi H., Hayashi M., *Cell Structure and Function* **13**, 281, 1988;

Yingling Y. G., L. V. Zhigilei, B. J. Garrison, A. Koubenakis, J. Labrakis, S. Georgiou, *Appl. Phys Lett.* 78, 1631, 2001;

Zeng H., W.R. Lacefield, S. Mirov, *J. Biomed. Mater. Res.* 50 (2), 248–258, 2000;

Zergioti I., A. Karaiskou, D. G. Papazoglou, C. Fotakis, M. Kapsetaki, D. Kafetzopoulos, *Appl. Phys. Lett.* 86, 163902, 2005;

Zhao, F., et al., *Biomaterials* 23, 3227, 2002;

Zhao J, Xiao S, Lu X, Wang J, Weng J., *Biomed Mater.*, 1(4):188-92, 2006;

Zhang Y, Chai C, Jiang X.S., Teoh S.H., Leong K.W., *Mat. Sci. Eng. C* 27, 213–219, 2007;

Zhigilei L.V., Leveugle E., Garrison B. J., Yingling Y. G., Zeifman M. I., *Chem. Rev.* 103, 321, 2003;

Zhigilei L. V., P. B. S. Kodali, B. J. Garrison, *J. Phys. Chem. B* 101, 2028, 1997;

Zhigilei L. V., B. J. Garrison, *J. Appl. Phys.* 88, 1281, 2000;

6. ABBREVIATIONS

Symboles et abréviations utilisées

ASB (BSA): Albumine de Sérum Bovin (ang. Bovine Serum Albuminae)

AFM: Microscopie à Force Atomique

BCA : (Bicinchonique Acid Assay) - dosage colorimétrique des protéines, basé sur l'acide bicinchonique.

CaP : Phosphates de calcium (ang. Calcium Phosphates)

cFN: fibronectine cellulaire (de la matrice extracellulaire)

DAPI: 4',6' Di Amidino-2-Phényl Indole

DMEM : milieu minimum essentiel de Eagle (ang. Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium) : il contient approximativement quatre fois plus de vitamines et d'acides aminés que dans la formule originale et de deux à quatre fois plus de glucose

DRX: Diffraction de Rayons X

EDS (EDX) : Analyse dispersive en énergie (ang. Energy-dispersive X-ray spectroscopy)

EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FBS: sérum foetal bovine (ang. Fetal bovine serum)

FITC: Fluorescein isothiocyanate

Fn: Fibronectine

FTIR : Fourier Transform Infrared Spectroscopy

GAG: glycosaminoglycanes

HA : Hydroxyapatite

HOP : Human Osteoprogenitor

IMDM: milieu minimum essentiel de Eagle (ang. Dulbecco modified Iscove minimal essential medium) : il contient approximativement quatre fois plus de vitamines et d'acides aminés que dans la formule originale et de deux à quatre fois plus de glucose

MAPLE : Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MEC : Matrice Extracellulaire

MTT : Methylthiazole-tetrazolium

NaCl : Chlorure de Sodium

OC : Ostéocalcine

PAL : phosphatase alcaline

PBS : Phosphate Buffer Saline

pFN: fibronectine plasmatique (purifiée de plasma sanguin humain)

PLD : Pulsed Laser Deposition

RGD: séquence peptidique Arginine-Glycine-Acide Aspartique

Si: Silicium

Ti: Titane

Tris: Tris-Hydroxymethyl-aminomethane

TRITC: Tetramethyl-Rhodamine-Isothiocyanate

UV : ultraviolet

Vn : Vitronectine

7. ANNEXES

Annexe I : Images de microscopie de fluorescence pour la visualisation du cytosquelette cellulaire (des filaments d'actines, points focaux de vinculine et noyaux) des HOP ensemencées sur HA, ASB, FN, VN et Ti. Les cellules ont été fixées, perméabilisées et colorées pour l'actine par la phalloïdine conjuguée au TRITC (rouge) et pour la vinculine par l'anticorps anti-vinculine conjugué au FITC (vert). Les noyaux sont colorés au DAPI (bleu).

Annexe II : Articles publiés ou en cours de publications