

N° d'ordre : 2583

# THÈSE

présentée à

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES PHYSIQUES ET DE  
L'INGENIEUR

par **Anne SIMON**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : **Lasers et Matière dense**

\*\*\*\*\*

**INTERET DE LA MICROSCOPIE DE FORCE ATOMIQUE SUR LA  
BIOFONCTIONNALISATION DE MATERIAUX : CARACTERISATION DU  
GREFFAGE ET DE L'ADHESION CELLULAIRE.**

\*\*\*\*\*

Soutenue le : 5 Novembre 2002

Après avis de :

**Mme F. Argoul  
M. P. Bongrand**

**Directeur de Recherche  
Professeur d'Université et Praticien Hospitalier**

**Rapporteurs**

Devant la commission d'examen formée de :

**M. A. Brisson  
Mme M. C. Porté  
Mme T. Cohen-Bouhacina  
M. J. P. Aimé  
Mme J. Amédée  
M. C. Baquey**

**Professeur d'Université  
Chargé de Recherche  
Maître de Conférences  
Directeur de Recherche  
Directeur de Recherche  
Directeur de Recherche**

**Président et rapporteur  
Examineurs**

**Invités**



*A mes Parents*

*A Emmanuel*



Le travail présenté dans ce manuscrit a un domaine d'application pluridisciplinaire (celui des biomatériaux osseux). C'est pourquoi il s'est déroulé dans deux équipes : celle des Biomatériaux et Réparation Tissulaire, dirigée par Monsieur Baquey et celle de Nanophysique par sonde locale de force, dirigée par Monsieur Aimé.

Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements à :

- Monsieur le Professeur A. Brisson. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse. C'est grâce à vous que j'ai pu découvrir, dans votre laboratoire situé alors à Groningen (Pays-Bas), la microscopie de force atomique en milieu liquide. Tout en m'initiant à cette technique avec I. Reviakine, sur l'étude de bicouches lipidiques supportées, vous m'avez montré ses potentialités dans le domaine de la biologie, ainsi qu'une façon de travailler avec une grande liberté intellectuelle mais en s'appuyant toujours sur des analyses rigoureuses. Veuillez trouver ici le témoignage de ma respectueuse considération.

- Madame F. Argoul. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude d'avoir accepté d'être rapporteur et d'avoir pris du temps pour examiner ce travail. Nos discussions et vos suggestions perspicaces ont été pour moi très constructives.

- Monsieur le Professeur Bongrand. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma respectueuse considération. Vos connaissances scientifiques et votre notoriété sur un sujet tel que l'adhésion cellulaire sont pour moi une reconnaissance de cette étude.

- Madame M. C. Porté avec qui j'ai travaillé pendant ces trois ans. Votre dynamisme, votre disponibilité et votre aide m'ont permis de faire aboutir ce travail. Enfin, vos qualités scientifiques ont été pour moi d'un bon secours.

- Madame T. Cohen-Bouhacina. Vous m'avez initiée à la tribologie avec beaucoup de patience ... Votre amabilité et votre bonne humeur ont entouré ce travail au cours de ces trois années.



- Monsieur J. P. Aimé. Je vous suis reconnaissante de vos suggestions lors de nombreuses discussions. Essayer de vous convaincre de résultats (aussi surprenant que l'effet « Kimwippes ») a toujours été très constructif pour moi et m'a permis de progresser. Enfin, j'ai apprécié votre aide à la fin de la rédaction de mon manuscrit, moment difficile, que ce soit pour la relecture ou pour l'établissement d'un modèle qui n'aurait pas abouti sans vous.

- Madame J. Amédée pour l'intérêt que vous avez montré envers cette étude lors de réunion de travail et pour l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à ce jury. Je vous remercie également pour la patience dont vous avez fait preuve lorsque, parfois inopinément, je me glissai dans votre emploi du temps. Encore merci.

- Monsieur C. Baquey. Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Vous m'avez fait bénéficier de vos connaissances avec beaucoup de gentillesse et je vous en remercie sincèrement.

Mille mercis enfin, à chacun d'entre vous que j'ai croisé tout au long de ces trois années ... Annie, Betty, Laure, Sandrine, Monique(s), Morgane, Nicole, Reine, Véronique(s), Bertrand, Frank, François, Olivier, Pascal, Fabien, Patrick, Stéphane ... Sophie, Fabien, Gérard, Laurent, Pascal ... Monsieur Salardenne ... Un merci un peu particulier à Monsieur B. Benettau et à Monsieur B. Desbat, pour leur aide dans ce travail.

Un grand merci à mes parents pour leur soutien constant, leur présence et la confiance dont ils ont fait preuve. Vous avez toujours été près de moi et vous avez tout fait pour vous rendre disponible, chaque fois que j'ai eu besoin de vous, même si de lourdes difficultés pratiques existaient.

Merci enfin à mon frère Jean-Luc, à Isabelle, pour les bons week-end passés ensemble et bien sûr, à Emmanuel pour sa présence à mes côtés (surtout dans les moments les plus difficiles) et pour tous ses encouragements.

Je vous exprimerai mes remerciements de façon plus précise directement.



# Table des matières

<b>Abréviations .....</b>	<b>13</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>17</b>
<b>Chapitre I. Généralités .....</b>	<b>23</b>
1. Interaction cellules/biomatériaux.....	27
1.1. La science des biomatériaux: une démarche pluridisciplinaire .....	27
a. Les biomatériaux.....	27
b. Propriétés des biomatériaux.....	27
c. Exemple de biomatériaux utilisés en orthopédie .....	29
1.2. Réactions du tissu hôte à un biomatériau.....	32
1.3. Adhésion d'une cellule à une surface .....	34
a. Stratégies d'amélioration des substituts osseux .....	34
b. Généralités sur les méthodes de traitements de surface de matériaux .....	36
2. Adhésion cellulaire .....	39
2.1. Adhésion cellulaire à l'échelle de la cellule .....	39
2.2. Adhésion cellulaire à un niveau moléculaire.....	42
2.3. Adhésion cellulaire au niveau du fonctionnement de la cellule .....	46
3. Objectif de cette étude : Evaluer dans quelle mesure l'adhésion d'ostéoblastes est favorisée par la bio-fonctionnalisation d'une surface. ....	49
 <b>Chapitre II. Evaluation de l'adhésion de cellules par Microscopie de Force Atomique (MFA) en mode contact et en milieu liquide.....</b>	<b>53</b>
1. Techniques d'étude de l'adhésion cellulaire.....	57
2. MFA en mode contact et en milieu liquide appliquée à l'étude d'ostéoblastes.....	65
2.1. Principe de la MFA en mode contact et en milieu liquide.....	65
a. Description des forces entre une nanopointe et une surface à l'air.....	65

b. Réduction des forces d'interaction entre une nanopointe et une surface en milieu liquide.....	70
c. Evaluation de la force externe appliquée par la sonde du MFA en mode contact et en milieu liquide .....	74
d. Evaluation des forces hydrodynamiques lors du balayage en cellule liquide.	77
2.2. Expérience par MFA en mode contact et en milieu liquide appliquée à l'étude d'ostéoblastes .....	79
a. Montage expérimental.....	79
b. Méthodologie .....	80

**Chapitre III. Biofonctionnalisation de surfaces de silice par modification biochimique..... 87**

1. Les matériaux biologiquement fonctionnels.....	91
1.1. Adsorption de protéines adhésives .....	91
1.2. Greffage de peptides adhésifs .....	92
1.3. Choix et description de protocoles de bioactivation des surfaces. ....	93
2. Modification de surface par silanisation.....	97
2.1. Procédures expérimentales de greffage .....	98
a. Traitement thermique de la surface de silicium .....	100
b. Silanisation.....	101
c. Les surfaces sont rincées puis séchées.....	105
2.2. Caractérisation physico-chimique du greffage .....	105
a. Mouillabilité.....	106
b. XPS .....	106
c. MFA.....	107
d. Choix du protocole de silanisation.....	112
3. Greffage de peptides RGD terminés par une cystéine.....	113
3.1. Description du protocole de greffage adopté.....	114
3.2. Caractérisation physico-chimique du greffage du peptide RGDC .....	116
a. Mouillabilité.....	116
b. XPS .....	117
c. Spectroscopie Infra-Rouge.....	118

d. MFA.....	119
3.3. Caractérisation physico-chimique du greffage du peptide DGRAFVLC.....	120
a. Mouillabilité.....	121
b. Spectroscopie Infra-Rouge .....	121
c. MFA.....	123
<b>Chapitre IV. Etude de l'adhésion d'ostéoblastes humains sur des matériaux biofonctionnalisés .....</b>	<b>127</b>
1. Résultats de l'évaluation de l'adhésion d'ostéoblastes bio-spécifiquement sur une surface de peptides RGDC greffés sur de la silice .....	129
1.1. Test d'attachement.....	129
1.2. Evaluation morphologique de l'adhésion de cellules ostéoprogénitrices de moelle osseuse humaine par MFA .....	131
a. Images d'ostéoblastes et de structures intra-cellulaires obtenues par MFA. ....	131
b. Suivi du processus de détachement d'ostéoblastes par MFA. ....	139
1.3. Mesures des propriétés mécaniques des ostéoblastes .....	149
2. Discussion.....	177
<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>183</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>189</b>
<b>Annexe 1 : Matériels et méthodes.....</b>	<b>191</b>
<b>Annexe 2 : Techniques de caractérisation chimique des surfaces de biomatériau.....</b>	<b>201</b>
<b>Annexe 3 : Code – couleur des images de MFA.....</b>	<b>229</b>
<b>Annexe 4 : Composition de l'os .....</b>	<b>231</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>237</b>



# Abréviations

APTES	3-AminoPropyl TriEthoxySilane
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSP	Bone SialoProtein
DGRAFLVC	Acide Aspartique-Glycine-Arginine-Alanine-PhenylAlanine-Valine-Leucine-Cystéine
DMF	DiMéthylFormamide
ESCA	Electron Spectroscopy for Chemical Analysis
HMBSC	Human Bone Marrow Stromal Cells
HOP	cellules ostéoprogénitrices humaines ou ostéoblastes (cellules osseuses)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell (cellule endothéliale)
IRM	Interference Reflection Microscopy
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MFA	Microscopie de Force Atomique
PI	Phosphoinositide
PI3 kinase	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Protein kinase C
PDMES	Phenyl DiMethyl EthoxySilane
POPC	Palmitoyl-oleoyl de phosphatidylcholine
Ptdins(3,4,5)P <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
PVD	Physical Vapour Deposition
RGDC	Arginine-Glycine-Acide Aspartique-Cystéine

Rack-1	Receptor for activated protein kinase C
SMP	N-hydroxySuccinimidyl-3-Maleimido Propionate
STM	Scanning Tunneling Microscopy
SVF	Sérum de Veau Fœtal
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy





# Introduction

Après le bouleversement des matériaux traditionnels (bois, pierre, métaux, ...) par les matières plastiques et composites (élastomères, polymères, ...) dans la seconde moitié du XX<sup>e</sup> siècle, des matériaux dits « intelligents » ont été développés afin de s'adapter au mieux et en permanence à des environnements de plus en plus spécifiques. Citons, par exemple, les alliages à mémoire de forme, appelés ainsi parce qu'ils retrouvent leur forme initiale après une déformation de grande amplitude provoquée par des variations de température de leur environnement. D'autres nouveaux matériaux intelligents qui trouvent de nombreuses applications dans le domaine des biomatériaux sont actuellement en cours d'étude. Les biomatériaux sont des implants caractérisés par leur destination qui impose des exigences évidentes de biocompatibilité. Celle-ci implique une interaction non défavorable entre le matériel et l'hôte et une fiabilité exceptionnelle. Les biomatériaux s'inspirent de plus en plus des propriétés des systèmes biologiques. En effet, la nature reste un modèle inégalé dans la production de matériaux aux propriétés exceptionnelles (soie, ailes de papillon, ...) que l'on est tenté d'imiter.

Le passage de « la matière au vivant » est donc en train d'émerger. Mais produire de la matière à l'échelle du nanomètre nécessite de développer des stratégies d'ingénierie macromoléculaire et cellulaire adaptées à la science des biomatériaux. Il faut également mettre au point tant conceptuellement qu'instrumentalement la chimie, la physique et la biologie de tels systèmes, certes complexes mais aussi très stimulants par toutes les applications potentielles qu'ils laissent imaginer. Les nanotechnologies, dont la Microscopie de Force Atomique<sup>1,2,3</sup> (MFA) fait partie, permettent d'explorer des domaines très divers avec

une grande précision. Elles apportent de nombreuses informations dans une grande gamme d'échelle spatiale et temporelle.

L'étude présentée dans les pages qui suivent est consacrée aux biomatériaux osseux. L'objectif, quelle que soit l'approche envisagée, est toujours de stimuler la croissance osseuse. Différents modes d'action de stimulation de la croissance osseuse sont ainsi explorés dans de nombreux laboratoires de recherche. L'usage des « Bone Morphogenic proteins »<sup>4</sup> peut être signalé : *in vitro*, ces protéines sont ajoutées au milieu où baigne la cellule et elles la stimulent pour synthétiser un nouvel os. Des techniques de génie génétique cherchent à modifier la cellule afin de lui conférer des propriétés particulières nécessaires à la synthèse d'un nouvel os. Ou encore, la production de tissus à partir des cellules d'un individu qui serait à la fois « donneur » et « receveur » de ces mêmes cellules fait l'objet du clonage thérapeutique. Toutes ces approches ne sont pas traitées dans cette étude, mais il est possible d'envisager à plus long terme que leur combinaison conduira à l'élaboration d'un os artificiel et à son contrôle dans le temps. C'est là un enjeu ambitieux et passionnant.

Parallèlement à ces approches, des traitements de surface peuvent être envisagés. L'étude et l'optimisation des processus de greffages de peptides et d'adhésion de cellules caractérisés par MFA s'inscrivent dans ces recherches. Une des voies de recherche explorée en vue de l'amélioration de prothèses osseuses, prévoit sur le contrôle de l'interface implant/os grâce à la bio-fonctionnalisation de la surface de l'implant. Pour développer de telles surfaces, un greffage de peptides adhésifs est ici proposé. En effet, après que le phénomène d'interaction cellule – surface ait été attribué à des forces physiques (forces d'adhésion...) entre la cellule et la matrice extracellulaire et grâce aux développements de techniques immunologiques et biochimiques, les influences chimiques et les bases moléculaires de l'adhésion cellulaire ont été comprises : parmi les différents mécanismes d'adhésion, l'adhésion des cellules à une surface peut se produire par une interaction spécifique entre des protéines membranaires d'adhérence, les intégrines, et des séquences peptidiques spécifiques. Le greffage de peptides de séquence analogue à une surface est donc susceptible de favoriser l'adhésion de cellules osseuses grâce à cette interaction spécifique. Ces surfaces sont ensuite pré-cellularisées avant l'implantation.

Le travail qui suit évalue dans quelle mesure l'adhésion des ostéoblastes est favorisée par la bio-fonctionnalisation de matériaux. Des approches de fonctionnalisation superficielle de matériaux ont été mises en œuvre afin de concevoir des implants osseux pré-cellularisés. Cette fonctionnalisation est destinée à promouvoir l'adhésion des cellules osseuses. Les ostéoblastes (cellules osseuses qui synthétisent l'os<sup>5</sup>) vont synthétiser un nouvel os en trois

étapes : leur adhésion (à une surface et entre elles), leur prolifération pour former une trame tri-dimensionnelle et leur minéralisation. Notre étude se situe à ce premier niveau : elle met en relation un traitement de surface et la réponse biologique à cette fonctionnalisation, puis elle essaie de comprendre les phénomènes d'attachement et d'adhésion de cellules osseuses à une surface donnée.

*In vivo*, il existe un couplage permanent entre les cellules et le milieu qui les entourent. Elles procèdent et s'adaptent à de perpétuels changements à chaque instant et les structures générées sont robustes et versatiles, mais toujours adaptatives.

*In vitro*, les cellules s'étalent sur les surfaces. Elles doivent, de la même façon, être en interaction avec la surface pour survivre. C'est ce qui est appelé « ancrage dépendance » (en anglais). De plus, dans le cas de certaines surfaces de matériaux, elles forment au niveau de la membrane plasmique de la cellule, des structures allongées, les contacts focaux, véritable « joint adhésif » entre la surface et le cytosquelette d'actine situé à l'intérieur de la cellule. La cellule est adhérente. Ainsi, la colonisation de matériaux par des cellules osseuses autologues adhérentes préalablement à leur implantation devrait permettre une meilleure intégration des prothèses au sens des organismes hôtes. Dans un second temps, la résorption du « matériau support des cellules » couplée à la multiplication de ces cellules et à la minéralisation de leur matrice *in vivo* laisseraient place à un os néoformé. Bien que ces nouveaux biomatériaux soient encore loin d'être utilisés, les recherches s'efforcent de réaliser de tels systèmes, analogues aux organes. Il est à noter que les cellules utilisées sont des HOP i.e. des cellules précurseurs des ostéoblastes, issues de cellules souches de moelle osseuse humaine. Comme leur nom l'indique, elles ont la capacité d'évoluer un type cellulaire différencié. La culture cellulaire, l'obtention et la caractérisation de cellules souches au stade de différenciation des ostéoblastes avaient déjà été mises au point au laboratoire des Biomatériaux et Réparation Tissulaire (INSERM U 443 – Bordeaux II), et ce point ne sera pas traité dans cette étude<sup>6</sup>.

Les cellules souches au stade ostéoblastiques sont déposées sur différentes surfaces et la réponse de la cellule couplée à la surface est observée par MFA. Celle-ci utilise une sonde très locale et il est connu qu'elle permet une observation directe de protéines<sup>7,8,9,10</sup> et de complexes de protéines<sup>11,12</sup>, de membrane et de protéines membranaires, ou de cellules. L'intérêt majeur réside dans le fait que les cellules sont observées vivantes en milieu liquide. Cette microscopie combine les avantages de la microscopie optique, qui permet d'observer des échantillons vivants en solution avec ceux de la microscopie électronique qui donne des

images de plus haute résolution. Ce microscope est aussi un « appareil de force » et ainsi, les informations d'élasticité au niveau cellulaire sont directement accessibles<sup>13</sup>. Il est possible de soumettre la cellule à une contrainte chimique ou mécanique et de suivre la réponse dynamique de cette cellule dans le temps. Nous exploitons cette potentialité de la MFA pour combiner la possibilité d'obtenir simultanément une image topographique d'une cellule et d'accéder par la nanoindentation de la cellule à la cartographie quantifiée de ses propriétés d'élasticité. Cette technique permet de démontrer sans ambiguïté qu'une cellule est adhérente à une surface. Nous pouvons ainsi aborder l'étude de l'adhésion d'une cellule, via l'évolution de sa morphologie sous l'application d'une force, et la mesure de sa réponse mécanique. La mesure de la réponse mécanique locale et sa relation avec sa structure permet d'aborder la complexité spatiale et temporelle du fonctionnement de la cellule. Il importait de se préoccuper de caractériser l'adhésion cellulaire par cette technique (Chapître I de ce manuscrit). Par cette technique, il est possible d'observer l'organisation et l'évolution des cellules tout en les manipulant et en les préservant. La complexité spatiale et temporelle du fonctionnement de la cellule est accessible.

Parallèlement aux développements de cette méthode de caractérisation, un traitement chimique de surface pour élaborer des surfaces homogènes et spécifiques promouvant l'adhésion des ostéoblastes est proposé (Chapître II de ce manuscrit). Le choix a été fait de fonctionnaliser et de caractériser des surfaces modèles (silice oxydée). Le principe de modification de surface est basé sur un greffage chimique de peptides à partir des groupements hydroxyles présents à la surface de la silice. Le protocole de greffage a été validé par XPS et par PM-IRRAS. Dans cette étude, notre intérêt s'est particulièrement focalisé sur un matériau modèle : le silicium oxydé dont la rugosité moyenne est de  $0,3 \text{ nm}/\mu\text{m}^2$ . En effet, le contrôle de l'homogénéité du traitement de surface apporté, ainsi que les mesures tribologiques (en fonction de la température) menées par MFA, ne peuvent être réalisées de manière cohérente qu'en présence d'une surface rigoureusement plane à l'échelle du nanomètre.

Le chapitre III de ce manuscrit rapporte une étude quantitative de l'adhésion d'ostéoblastes et tente de relier celle-ci à l'activité biologique des surfaces des matériaux traitées. Trois surfaces ont été testées : une surface de silice, une surface de peptides greffés sur de la silice, et une surface de protéines adhésives adsorbées à partir du milieu de culture complémenté en sérum de veau fœtal (SVF) sur une surface de silice silanisée.

Préalablement à la présentation de cette étude, une brève présentation de la problématique de l'interaction cellules – surface dans le cadre des biomatériaux osseux ainsi qu'une synthèse de ce travail sont proposées dans le chapitre « Généralités ».



# Chapitre I. Généralités



Les séquelles de traumatologie osseuse, des tumeurs de l'appareil locomoteur, mais aussi des pathologies ostéoarticulaires dégénératives, une malformation ou une déformation des vertèbres, par exemple constituent des pertes fonctionnelles osseuses, qui sont compensées chez l'homme.

Cette compensation est réalisée par des transplantations de greffe osseuse ou par des prothèses.

La restauration du tissu osseux est réalisée à partir de fragment de tissu de même nature prise sur une autre partie du corps (transplantations de greffe osseuse autologue) ou sur un autre sujet (transplantations de greffe osseuse allogène). Mais, elles sont de plus en plus abandonnées par les chirurgiens orthopédiques. En effet, l'autogreffe présente des risques liés à une disponibilité volumique réduite et à une morbidité associée à son recueil. L'allogreffe est limitée par les risques de transmission d'agents infectieux.

Les chirurgiens ont recours actuellement à des prothèses, des transplantations de cellules, normales ou transgéniques, des biomatériaux naturels ou artificiels, diversement traités, supportant divers facteurs de croissance, voireensemencés de cellules autogéniques ou allogéniques et facilitant une régénération normale.

La régénération (aptitude à reconstituer des parties perdues par une reprogrammation du développement chez l'adulte) est quasi-inexistante chez l'homme. Mais en pathologie humaine, elle est réellement d'actualité, puisque des matériaux bioactifs qui prennent part, par leur implantation, au processus de régénération des tissus lésés sont recherchés et sont en cours d'étude. Le pari de développer un os synthétique est relevé...



# 1. Interaction cellules/biomatériaux

## 1.1. La science des biomatériaux: une démarche pluridisciplinaire

### a. Les biomatériaux

Les biomatériaux sont des matériaux non vivants conçus pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'ils participent à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique, à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle (définition élaborée à Chester en 1986 par la conférence de Consensus organisée sous l'égide de la Société Européenne des Biomatériaux)<sup>14</sup>.

Un biomatériau est un matériau appelé à travailler sous contrainte biologique, mais aussi et à la fois sous contrainte mécanique, chimique et biochimique. Il soutient ou remplace les fonctions de cellules ou de tissus humains.

### b. Propriétés des biomatériaux

Tout d'abord, le biomatériau ne doit pas être toxique : il utilise des produits inertes qui n'entraînent pas de risques toxiques et qui sont bien acceptés par le receveur<sup>15</sup>.

Actuellement, en médecine, la biocompatibilité des implants est une condition indispensable à leur usage. La biocompatibilité peut être définie par « la capacité d'un biomatériau à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique » (ESB-Chester, 1986 et 1991). Elle est caractéristique de l'endommagement que pourrait provoquer l'implant sur les tissus l'avoisinants<sup>16</sup>. Si les cellules ne sont pas endommagées par le biomatériau ou par des produits libérés par la corrosion ou le frottement, le matériau est considéré comme compatible avec l'organisme. L'implant est un « corps étranger » qui ne

doit pas non plus être endommagé par les fluides corporels ou par les mécanismes de défense de l'organisme.

D'autres exigences qui dépendent de la fonction et de l'endroit d'implantation du biomatériau sont aussi recherchées : la connaissance des propriétés mécaniques du biomatériau est indispensable dans le cas de prothèses osseuses. Il faut être en mesure de connaître les contraintes et les déformations mécaniques du biomatériau, qui sont liées à sa structure et à sa composition<sup>17,18</sup>. Les contraintes qui s'exercent sur les biomatériaux sont statiques mais aussi dynamiques. Une prothèse de hanche subit des alternances de charge. Les propriétés chimiques comme l'oxydation, la corrosion ou la résistance à l'usure, doivent aussi être prises en compte et connues.

A l'interface du biomatériau et des tissus environnants, des réactions se déroulent<sup>16,19,20,21,22,23</sup>. Elles ont des répercussions sur les cellules des tissus hôtes et peuvent être à l'origine de nombreuses irritations (inflammations, allergies) ou au contraire, avoir un effet stimulant pour la régénération des tissus environnants.

Idéalement, il devrait y avoir interaction entre les cellules des tissus environnants et le matériau de manière à reconstruire au contact de l'implant les tissus lésés et à incarner activement l'implant dans le tissu hôte. Les interactions entre l'environnement biologique tels que les tissus durs ou mous environnant l'implant, le sang et le liquide corporel peuvent provoquer à l'interface des biomatériaux de nombreuses réactions non désirées (inflammatoires, mutagènes, carcinogènes...). Elles permettent de distinguer trois sortes de matériaux :

- Les matériaux bio inertes qui s'intègrent dans l'os sans interposition de couche fibreuse
- Les matériaux bio tolérés qui s'intègrent dans l'os avec interposition d'une couche tissulaire fibreuse
- Les matériaux bio actifs qui réagissent « positivement » à leur environnement biologique en permettant des réactions spécifiques à l'interface implant-tissu receveur. A leur contact, il se forme un os néo-formé, avec l'établissement par des processus physico-chimiques, d'une continuité entre le matériau et la matrice osseuse.

Ces matériaux sont tous biocompatibles ; ils ne libèrent pas de substances toxiques et n'endommagent pas non plus les tissus environnants.

Les réactions qui se produisent à l'interface entre le biomatériau et les tissus environnant l'implant se déroulent durant les premières secondes ou minutes de contact. Elles peuvent durer aussi sur plusieurs mois ou même sur plusieurs années et engendrer des dommages cellulaires de grande étendue comme la lyse de tissu par des contraintes

mécaniques à l'interface, ou l'endommagement de cellules par des ions toxiques libérés par biocorrosion. Le matériau peut ainsi être modifié au cours du temps pendant toute la durée de l'implantation. Enfin, il est à noter que des effets à distance peuvent être provoqués par des particules détachées par des mécanismes chimiques ou tribologiques. Ces particules sont réparties dans tout l'organisme par les fluides corporels. L'implant est, au mieux, toléré mais il n'est pas intégré dans le tissu hôte de l'organisme.

Cet ensemble des propriétés biologiques, mécaniques, physiques et chimiques rendent compte de la complexité de développer un substitut osseux. Un biomatériau « idéal » devrait être ostéoconducteur, ostéoinducteur et résorbable<sup>24</sup>. L'ostéoconduction est la propriété d'un matériau à recevoir et à guider la repousse osseuse à partir du tissu osseux dans lequel il est implanté. Actuellement, les biomatériaux sont ostéoconducteurs, à des degrés divers, mais aucun n'est ostéoinducteur : aucun n'a la propriété d'induire par lui même la repousse osseuse. De plus, conjointement à la formation d'un os néo-formé, la dégradation *in vivo* de ce biomatériau idéal devrait se produire grâce à sa résorption, liée à la solubilité de ses constituants, par des processus physico-chimiques ; et à une dégradation liée à des processus cellulaires. Ces paramètres sont tous les trois reliés à des facteurs chimiques et physico-chimiques et à des facteurs biologiques (cellules et milieu environnant) des biomatériaux.

### c. Exemple de biomatériaux utilisés en orthopédie

Le Tableau 1 présente quelques types de biomatériaux utilisés en orthopédie<sup>25</sup>. Chaque biomatériau est choisi par rapport à sa fonction, à sa localisation, des combinaisons de différents matériaux peuvent être envisagées.

Les biomatériaux dans les tissus osseux sont utilisés :

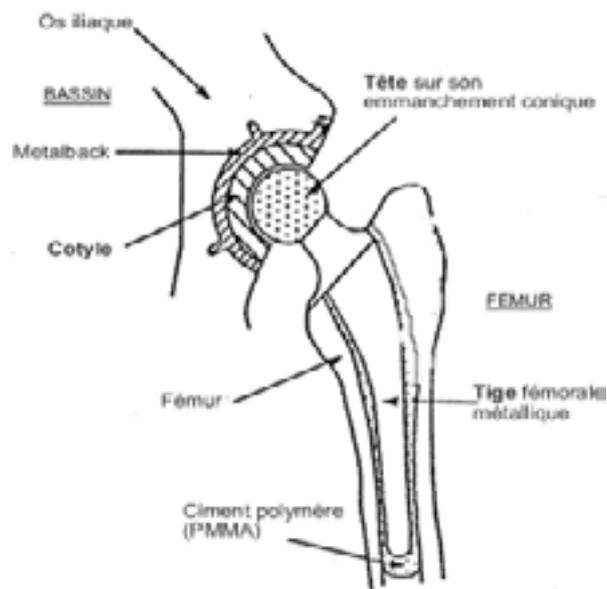
- Pour la fixation d'os entre eux (clous, vis, plaques) lors de fracture. Dans ce cas, l'implant doit être proche de l'os et la régénération des tissus doit pouvoir se faire rapidement. Les matériaux n'ont pas d'influence particulière sur l'os.
- Pour combler des défauts de taille importants de l'os (tumeur, vieillissement). Dans ce cas, le comportement du matériau dans le système biologique est important.
- Pour remplacer des parties non fonctionnelles (prothèses, remplacement d'os et de dents). Les tissus osseux nouvellement formés doivent être en mesure de « traverser » l'implant, ce qui présuppose un comportement adéquat du matériau utilisé

Catégorie	Type	Composition
Matériaux inorganiques non métallique (minéraux)	Bioverre	Céramique d'oxyde d'aluminium ( $Al_2O_3$ )
	Céramiques	HAP ou céramique d'hydroxyapatite $\{Ca_5(PO_4)_3(OH)\}$
		TCP ou céramique de tricalcium phosphate $\{Ca_3(PO_4)\}$
	Corail	Carbonate de calcium $\{CaCO_3\}$ à l'état cristallin sous forme d'aragonite
	Ciment	HAP, di, tri, tétra, octo calcium phosphate
Matériaux métalliques		Alliage de CoCr, de CoCrNi, et de CoCrMoNi Ti, alliage de cp-Ti et de TiNi (à mémoire de forme)
Matériaux polymères synthétiques	Poly( $\alpha$ -hydroxyacides)	Dérivés des acides lactiques (PLA) et/ou glycolique (PGA)
	Polytétrafluoroéthylène (PTFE)	

Tableau 1 : Exemples de biomatériaux

Des prothèses en alliage de titane par exemple (Figure 1), peuvent être revêtues d'une couche d'hydroxyapatite, ce composé étant proche de l'os par sa composition et sa structure cristalline. En plus d'être biocompatible, ces prothèses résistent à la corrosion. Les biomatériaux sont rendus plus performant *in vivo*, par leur constitution mais aussi par leur dessin, leur géométrie et leur forme. Une prothèse totale de hanche par exemple, est constituée d'un réceptacle en polyéthylène moulé, implanté dans la cavité usée de l'articulation, d'une sphère métallique adaptée à la cavité en polyéthylène et reliée à une tige en alliage de titane insérée dans le tissu supérieur du fémur (i.e. l'os de la cuisse). Les composants de l'implant peuvent être cimentés ou non, selon l'âge et l'état de santé du receveur. Une prothèse mal dessinée travaille anormalement et est usée de façon injustifiée.

A.



B.



C.



Figure 1. Prothèse totale de hanche

Les biomatériaux en titane oxydé sont sans risques toxiques et sont bien acceptés par le receveur. Néanmoins, ces prothèses ont des caractéristiques biomécaniques réduites à cause de son incapacité à s'intégrer aux tissus vivants. C'est pourquoi ils sont utilisés en orthodontie. Par contre, ans le cas de pertes osseuses importantes, l'implantation de blocs volumineux de titane oxydé pose le problème de leur réhabilitation osseuse. Des prothèses en aluminium et en vanadium ajoutés au titane (TA6V) sont utilisées quotidiennement comme implant osseux. Leurs caractéristiques biomécaniques sont optimales mais au détriment de

leur toxicité. A cause des contraintes mécaniques, de l'aluminium et du vanadium sont libérés *in vivo* ce qui rend ces prothèses toxiques.

## 1.2. Réactions du tissu hôte à un biomatériau

Dans le cas de pertes osseuses importantes, l'implantation de blocs volumineux pose le problème de la réhabilitation osseuse, objet de recherches actuelles (Figure 2). En effet, les réactions qui se déroulent à l'interface implant/os doivent aboutir à la cicatrisation du tissu hôte<sup>19,23</sup>. Elles sont influencées par différents facteurs.

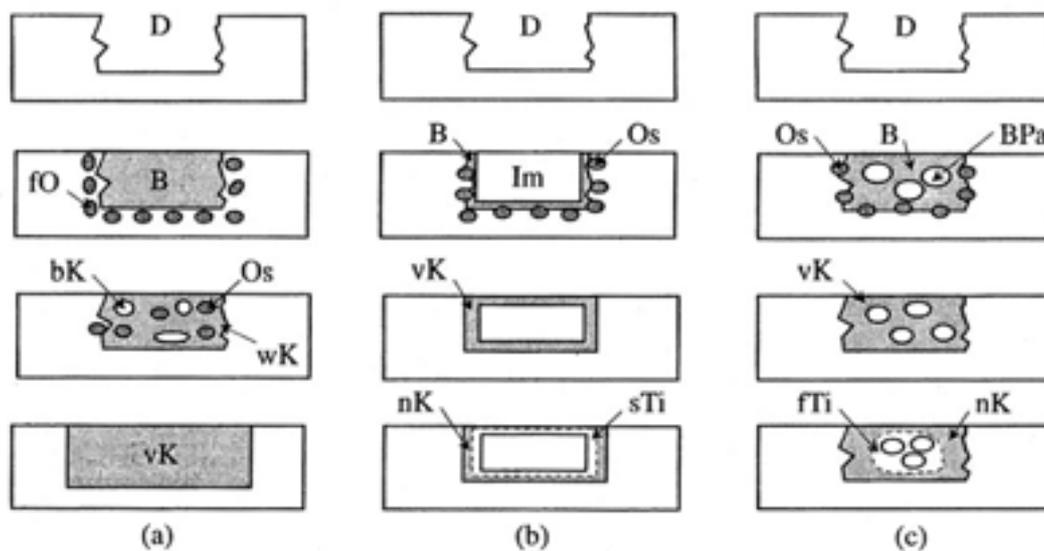


Figure 2. Représentation schématique des mécanismes de la régénération de l'os.

(a) régénération naturelle des tissus. (b) implant bio-inerte. (c) implant bio-actif.

*D*=défaut ; *B*=caillot de sang ; *fO*=formation d'ostéoblastes ; *bK*= régénération du tissu osseux ; *Os*=ostéoblaste ; *wK*=croissance de l'os ; *vK*= régénération complète de l'os ; *Im*=implant ; *nK*=os nouvellement formé ; *sTi*=capsule de tissu tendre ; *Bpa*=particule de biomatériau ; *fTi*=tissu fibreux.

La cicatrisation du site où a été implanté le biomatériau résulte de deux processus distincts : le tissu blessé est régénéré par des cellules du même type de tissu où il est remplacé par un tissu de connexion qui constitue une capsule fibreuse. Ces processus sont contrôlés par la capacité de prolifération des cellules du tissu ou de l'organe environnant la prothèse, par l'état de la structure du tissu lésé et par l'étendu de la fracture. Les cellules peuvent ensuite être modifiées : changer de type cellulaire, ou de phénotype, trop proliférer ou au contraire s'atrophier, par exemple.

L'ostéo-intégration peut être définie comme l'intégration de la prothèse au niveau osseux par une cicatrisation réunissant l'implant et l'os. Idéalement, à long terme, l'implant devrait soutenir les processus d'adhésion des cellules osseuses ainsi que la minéralisation, de manière à ce qu'il ne se forme pas de tissu tendre non minéralisé (i.e. capsule fibreuse). Une symbiose progressive devrait se mettre en place dans l'os. Pour parvenir à un tel comportement, il faut résoudre des problèmes de biophysique et de structuration de surface active. En effet, l'environnement biologique est agressif et les matériaux implantés peuvent subir des dégradations chimiques, électrochimiques ou cellulaires. Mais le matériau implanté peut aussi agir sur les tissus biologiques, de deux manières différentes :

- par une réaction de bioincompatibilité au matériau lui-même ainsi qu'à ses produits de dégradation (ions métalliques, débris d'usure)
- par la modification du tissu osseux environnant, qui a la propriété de modifier sa structure en permanence (remodelage) en fonction des contraintes mécaniques qui lui sont appliquées. A des endroits exposés à des maxima de contraintes, un renforcement de l'os est observé alors qu'en des zones moins exposées, une atrophie de l'os peut être observée. Un relâchement des tissus entourant l'implant peut être observé. Ce remodelage peut être à l'origine d'une évolution anormale de l'interface implant/os.

A cause de raisons mécaniques directes ou à cause d'une réaction inflammatoire due aux produits de dégradation de l'implant, le tissu osseux qui sert de support à l'implant est détruit. Pour minimiser ces risques, les recherches actuelles s'orientent vers matériaux qui permettraient une croissance d'un nouveau tissu osseux dans les porosités de sa surface ou qui seraient revêtues de composés ostéoconducteurs.

Prenons l'exemple d'une prothèse en titane. Dans le cas du TA6V, lors de l'analyse de prélèvements des tissus périprothétiques, une réaction inflammatoire peut s'accompagner d'une résorption des tissus osseux environnants et induire la formation d'un tissu fibreux d'interposition (ou fibrose), dont les propriétés mécaniques sont médiocres et inadaptées aux charges mécaniques à laquelle la prothèse est soumise. Dans le cas du titane oxydé, ce métal n'engendre pas d'infection dans les tissus osseux environnants. Il ne se forme pas non plus de capsule fibreuse macroscopique. Toutefois, un réseau de collagène proche de la surface, agencé de manière aléatoire et partiellement minéralisé apparaît entre l'implant et l'os. Mais ces zones ne donnent pas lieu à des processus cellulaires faisant intervenir les ostéoblastes. L'hypothèse avancée sur cette combinaison particulière du titane avec l'os est attribuée à des

interactions électrostatiques irréversibles entre l'implant et l'os dus certainement à la présence d'une couche d'oxyde à la surface du titane. Cela permet d'implanter couramment des prothèses de titane, et de plus sans ciment.

Les prothèses osseuses actuelles sont donc tolérées. Elles n'engendrent pas la formation d'un tissu osseux minéralisé. L'objectif actuel consiste donc à stimuler la reconstruction osseuse et à obtenir un os néoformé possédant des propriétés mécaniques adéquates au site d'implantation. Comment faire évoluer les prothèses osseuses, qui actuellement sont tolérées, vers des biomatériaux intégrés aux tissus osseux environnant du receveur puis résorbés dans un second temps pour laisser la place au nouveau tissu osseux formé ?

Seule une approche pluridisciplinaire prenant en compte simultanément les aspects physico-chimiques, mécaniques et biologiques de ces interactions peut permettre de développer des biomatériaux optimisés. La recherche porte donc sur la conception de matériaux de frottement à usure faible ou dont les débris minimisent la réaction inflammatoire et sur l'amélioration de l'ancrage osseux immédiat, afin d'obtenir des interfaces stable sans évolution des tissus vers la fibrose.

Les facteurs limitant ont pour origine les interactions entre les matériaux implantés et les tissus biologiques environnants. C'est pourquoi le chapitre suivant propose une brève présentation de l'adhésion cellulaire.

## 1.3. Adhésion d'une cellule à une surface

### a. Stratégies d'amélioration des substituts osseux

Les recherches actuelles sur les substituts osseux s'orientent vers l'amélioration de leur pouvoir ostéogène (ostéoconducteur et ostéoinducteur). Deux stratégies peuvent être envisagées.

La première consiste en une utilisation thérapeutique des gènes (gènes de protéines ostéo-inductrices comme ceux des « Bone Morphogenic protein » ou BMP<sup>4</sup>, ou gènes d'autres facteurs de croissance qui restent à définir). Ces gènes peuvent être injectés directement au receveur avec comme vecteur soit des virus porteurs de ces gènes soit des cellules transfectées (cellules stromales de moelle, par exemple). Les protéines ostéo-inductrices auraient ainsi une diffusion lente et stable au cours du temps, mais la prolifération de ces cellules génétiquement

modifiées et le contrôle de l'expression de ces protéines dans le tissu hôte sont difficiles à contrôler.

Une seconde stratégie s'inscrit dans le concept de l'ingénierie tissulaire<sup>26</sup>. Elle combine un matériau, des cellules et parfois des facteurs bioactifs, employés isolément ou en association<sup>27,28</sup>. Elle est fondée sur la capacité de cellules spécialisées à se multiplier et à conserver leur phénotype dans diverses circonstances. Des cellules (fraîches ou cultivées, autologues ou non, différenciées ou progénitrices) sontensemencées sur un biomatériau. Puis, l'ensemble est implanté dans le receveur. Une autre approche envisage d'implanter directement le biomatériau biofonctionnalisé ; l'idée étant dans ce cas de stimuler un recrutement cellulaire *in vivo*. Ces biomatériaux sont ostéoinducteurs : ils peuvent induire la formation d'un tissu osseux. L'idéal serait que ce biomatériau hybride assure de façon transitoire la fonction du tissu qu'il remplace, favorise la transformation vers ce tissu normal sans entraîner de majoration des risques de cancérisation liés à la prolifération des cellules et fasse place en définitive à un tissu physiologique. Ce traitement nécessite de maîtriser de nombreuses technologies tant au point de vue du biomatériau qu'à la culture cellulaire et qu'à la nécessaire intégration aux tissus vivants. La différenciation des cellules en cellules osseuses et le processus de minéralisation de l'os ne doivent pas être altérés afin de permettre la régénération complète du tissu osseux, qui devra enfin être intégré dans les tissus du receveur.

Obtenir cet os hybride en est encore au stade expérimental. De nombreux phénomènes ne sont pas maîtrisés et sont en cours d'étude. La recherche actuellement dans ce domaine en plein essor vise le contrôle de la réponse phénotypique des cellules osseuses afin de stimuler une régénération directe des tissus osseux.

Le travail de recherche présenté par la suite est centré sur l'étude et l'optimisation des processus de greffage de peptides et d'adhésion de cellules osseuses caractérisés par Microscopie de Force Atomique (MFA). Le cadre de cette étude se place dans l'amélioration des prothèses osseuses par un traitement chimique de la surface du matériau. Notre objectif est d'évaluer *in vitro* l'effet de la biofonctionnalisation d'une surface sur l'adhésion d'ostéoblastes. Nous abordons par la suite les différentes possibilités de fonctionnalisation de surfaces de matériaux.

## b. Généralités sur les méthodes de traitements de surface de matériaux

Toute modification de surface doit respecter un grand nombre d'exigences biologiques, mécaniques, physiques et chimiques. La surface doit être modifiée pour influencer l'adhésion des cellules à la surface. Elle constitue un matériau hybride. Par contre, la biofonctionnalité (activité du biomatériau, toxicité), la biocompatibilité, et la spécificité de reconnaissance de l'interface du matériau vis à vis des cellules devront être augmentées en comparaison avec un biomatériau non traité. Il faut aussi tenir compte de la résistance envers la corrosion et des propriétés tribologiques de la surface ainsi modifiée. L'énergie de surface, les charges présentes, la composition chimique de la surface sont changées. Parallèlement à ces méthodes physico-chimiques de modification, des transformations de la morphologie ou de la rugosité de la surface influencent la réponse biologique des implants.

De nombreuses techniques physiques ou chimiques existent pour modifier une surface<sup>29,30,31</sup>. Quelques unes sont reprises dans le Tableau 2. Cette liste n'est pas exhaustive et est donnée à titre indicatif pour illustrer la diversité des modifications disponibles.

Les traitements de la surface modifient des atomes ou des molécules existants en surface. Des sites sont introduits à l'interface pour immobiliser des biomolécules ou pour reconnaître des ligands ou encore empêcher des interactions non spécifiques ou l'adsorption de biomolécules. Dans le cadre de cette étude, le traitement envisagé doit favoriser l'adhésion d'ostéoblastes et ainsi stimuler la biointégration de la prothèse et par la suite la régénération directe des tissus. L'objectif final est donc de contrôler la réponse phénotypique des cellules osseuses.

---

### REVETEMENT NON COVALENT DE LA SURFACE

Depot de film Langmuir-Blodgett<sup>32,33</sup>

Couches auto-assemblés (par exemple, thiols/or)<sup>34,35</sup>

Modification biologique par adsorption de molécules biologiques<sup>36</sup>

### REVETEMENT COVALENT DE LA SURFACE

Greffage chimique<sup>37</sup>

Silanisation<sup>38</sup>

Modification biologique par greffage de molécules biologiques<sup>39,40</sup>

---

*Tableau 2. Techniques chimiques de modification de surface.*

Les cellules constitutives de nos tissus sont naturellement adhérentes à une matrice. L'attachement des cellules *in vivo* à leur environnement détermine leur forme, le maintien de la fonction propre des cellules et l'intégrité du tissu. La bioadhésion est basée sur des processus de reconnaissance moléculaire entre une protéine (l'intégrine) portée par les cellules et une séquence Arg-Gly-Asp<sup>41,42,43</sup> (ou RGD) portée par les protéines qui constituent la matrice. L'ancrage des cellules à une matrice est indispensable à l'expression de leur phénotype. Cela doit à l'évidence être respecté lorsqu'on envisage de remplacer un tissu, osseux par exemple, par un substitut artificiel. La séquence RGD, greffée sur une surface de silice, choisie comme surface témoin, pourrait mimer une surface biologique et jouer un rôle de ligands pour les intégrines présentes à la surface de la membrane cellulaire. Ces véritables points de « colle » pourraient se créer par l'interaction de sites spécifiques sur la surface du biomatériau avec un des nombreux systèmes de liaison des cellules à leur environnement : le récepteur intégrine<sup>44</sup>. L'attachement des cellules osseuses humaines à une surface greffée avant que cette surface ne soit implantée pourrait contribuer au succès du développement de nouvelles prothèses osseuses. Cette association de cellules à l'interface constituerait une ébauche de tissu autour de l'implant qui pourrait poursuivre sa croissance *in vivo*. Ainsi, l'adhérence entre l'os en cours de synthèse et l'implant osseux, après sa mise en place *in vivo*, par une pré-cellularisation de cet implant, serait renforcée par l'adhésion des ostéoblastes à la surface de la prothèse avant même son implantation. L'implant serait alors intégré, et non toléré. L'étude des propriétés adhésives des cellules est donc importante pour exercer et mieux contrôler le comportement des cellules sur un biomatériau.

L'intérêt d'étudier l'adhésion cellulaire dans le cadre des biomatériaux apparaît clairement dans le contexte de l'ostéo-intégration. Mais d'autres nombreux domaines de la biologie abordent ce phénomène et son mécanisme<sup>45,46,47,48,49</sup>. A cause de sa complexité, ils bénéficient de multiples approches de plus en plus souvent pluridisciplinaires. Ce sont les différents concepts développés actuellement qui sont brièvement résumés par la suite. L'adhésion cellulaire à un niveau moléculaire, puis cellulaire et enfin au niveau du fonctionnement de la cellule elle-même est ainsi détaillée.



## 2. Adhésion cellulaire

*In vivo*, les cellules s'attachent à leur environnement : à d'autres cellules ou à une matrice extracellulaire<sup>50,51</sup>. La matrice extracellulaire (MEC) correspond à un réseau de protéines et de carbohydrates insolubles. Elle est sécrétée par les cellules elles même et elle remplit l'espace intercellulaire.

Le processus d'adhésion cellulaire intervient dans de multiples processus physiologiques et pathologiques. Il participe aux développements embryonnaires, ainsi qu'à divers mécanismes vitaux pour les cellules chez l'adulte, tels que (i) la capacité pour les cellules de se diviser et de se différencier, (ii) la coagulation du sang, (iii) la cicatrisation, (iv) la réparation tissulaire<sup>52,53</sup> ...

Certaines pathologies comme l'ostéoporose, la formation de métastases cancéreuses résultent d'un dysfonctionnement des propriétés adhésives des cellules.

### 2.1. Adhésion cellulaire à l'échelle de la cellule

L'adhésion d'une cellule à une surface se déroule en plusieurs phases successives (Figure 3)<sup>54,55,56</sup> :

- Une étape d'approche de la cellule sur une surface, à une distance compatible avec la formation de liaisons. Ce processus peut être gêné par des interactions répulsives résultant de l'interaction avec les régions les plus externes des membranes cellulaires.
- La formation de la première liaison intercellulaire qui constitue une étape critique de l'adhésion.
- La consolidation de l'adhésion cellulaire qui conduit à une adaptation de la forme de la membrane, à une concentration des intégrines dans la région de contact avec l'élimination

d'éventuels éléments répulsifs et à un renforcement mécanique de la région adhésive dû à une organisation du cytosquelette membranaire.

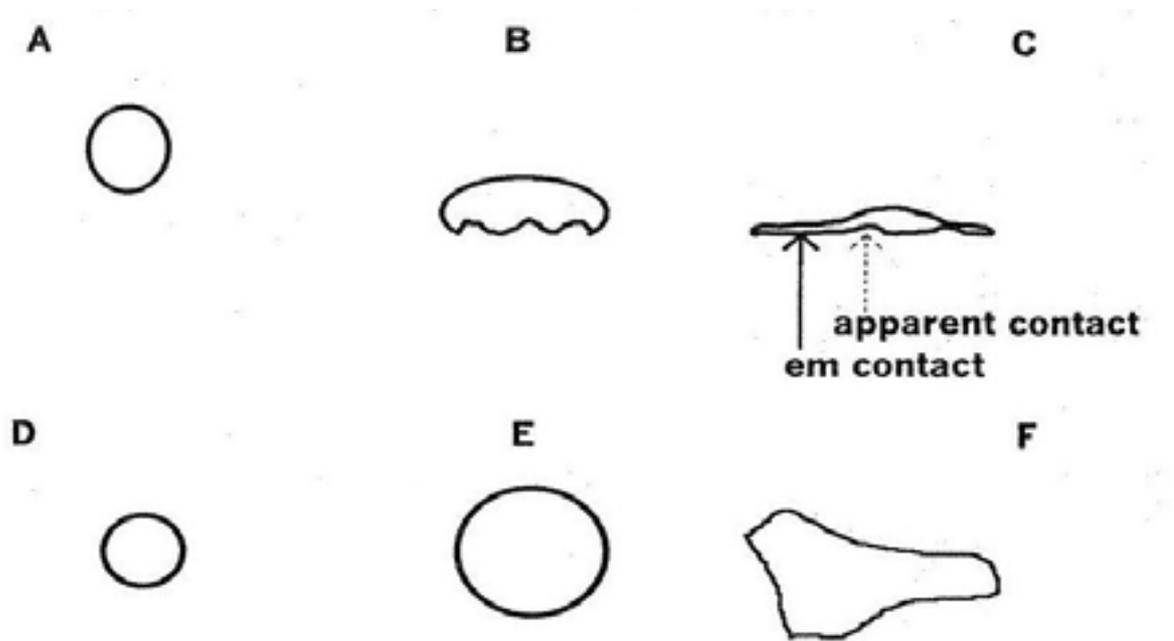


Figure 3. Les trois étapes de l'adhésion d'une cellule à une surface, observée en coupe transversale (A, B, C) ou vue en microscopie optique (D, E, F).

Une cellule en suspension dans un milieu de culture a une forme sphérique (A, D). Elle se dépose sur une surface puis s'adsorbe. Rapidement, elle s'étale sur la surface (B, E), de façon comparable à une goutte de liquide qui s'étale sur une surface. Le contour de la cellule reste circulaire (E). Un peu plus tard, la cellule subit des déformations et des extensions morphologiques (F), avec souvent l'émission de lamellipodes. Au niveau moléculaire, la cellule établit des liaisons spécifiques par l'intermédiaire des contacts focaux, véritables points de colle entre la cellule et la surface (C) ; ce qui entraîne la mise en place à l'intérieur de la cellule d'un cytosquelette, qui est le squelette interne et dynamique de la cellule.

Dans ce cas, la cellule est fortement adhérente<sup>57</sup>.

Trois espèces de site adhésif entre les cellules et la surface peuvent être décrits<sup>58</sup> :

- Les contacts entre la cellule et la Matrice Extracellulaire (MEC), qui se situent à une distance supérieure à 100 nm et qui connectent le milieu inférieur de la cellule à la surface.
- Les contacts étroits compris entre 30 nm et 50 nm, qui se trouvent autour des contacts focaux.

- Les contacts focaux qui séparent la cellule de la surface de 10 nm à 20 nm et qui sont souvent observés à des zones frontières des cellules. Ils représentent une très forte adhésion de la cellule à la surface. Ces zones de contact très localisées de la cellule sur la surface, que l'on peut visualiser en microscopie confocale, sont constituées d'un assemblage d'intégrines (« clusters ») regroupées en amas et reliées aux protéines du cytosquelette. La fibronectine est souvent impliquée dans ces liaisons (Figure 4).

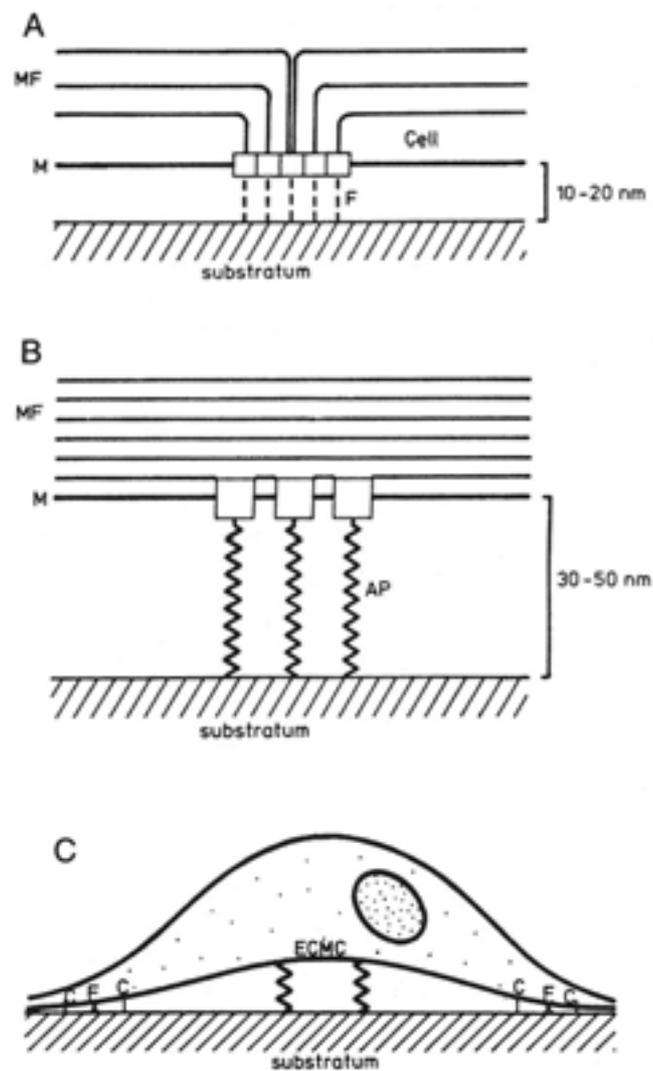


Figure 4. Sites adhésifs cellule/surface.

A. Contacts focaux. B. Contacts étroits. C. Contacts en différents sites

MF : filaments du cytosquelette, M : membrane plasmique, F : fibronectine, AP : protéine adhésive, ECMC : site de contact avec la matrice extracellulaire, C : contacts étroits, F : contacts focaux

Pour que l'adhésion cellulaire soit forte, il faut que :

- les contacts focaux existent ; puisque l'association de nombreuses liaisons faibles (des intégrines aux ligands) forme une liaison forte.
- la partie cytoplasmique des intégrines constituant les contacts focaux se lie au cytosquelette. Les principaux constituants du cytosquelette sont les micro-filaments d'actine, et les microtubules. Ils organisent le volume intracellulaire : il donne à la cellule sa forme, la possibilité de se mouvoir, et la capacité à la cellule à organiser et à transporter d'un point à un autre de la cellule des organites intracellulaires.

Dans un environnement physiologique, l'adsorption de protéines contenues dans le milieu précède l'adhésion cellulaire. Les protéines pré-adsorbées, qui se combinent aux protéines produites par la cellule, et selon les propriétés physico-chimiques de la surface déterminent la force et le type d'adhésion.

## 2.2. Adhésion cellulaire à un niveau moléculaire

De nombreux travaux, réalisés depuis une vingtaine d'années, ont prouvé que la MEC a une influence sur la physiologie de la cellule<sup>51,52,53</sup>. Ses composants régulent de façon reproductible et spécifique des événements intracellulaires, comme des hormones ou des cytokines pourraient le faire. La MEC est constituée d'une combinaison de collagènes, protéoglycanes, élastine, acide hyaluronique et de différentes glycoprotéines comme la fibronectine, et la lamine. Toutes les protéines de la MEC ont été identifiées comme pouvant interagir potentiellement avec les cellules et contrôler leur comportement qui est la résultante de cette interaction. Le premier résultat observable de l'interaction des cellules avec la MEC est l'adhésion cellulaire.

Parmi les différentes protéines de la matrice extracellulaire, la fibronectine a été largement étudiée<sup>59,60</sup>. Elle est soit sous forme soluble dans le plasma, soit associée aux cellules. Cette longue molécule flexible est une protéine dimérique dont les deux sous-unités de 225 kDa chacune sont reliées par des ponts disulfures près de leurs extrémités C-terminale. Chaque chaîne est composée de 3 domaines notés type I, II, et III (Figure 5). Le premier rôle biologique de la fibronectine est de lier les cellules à la MEC. Ses propriétés adhésives peuvent être facilement démontrées *in vitro*. Il suffit de déposer une solution de cellules sur une surface revêtue avec des protéines de la MEC (contenues dans le sérum de veau fœtal) ou

avec un type de protéines de la matrice purifiée, la fibronectine par exemple. Les cellules vont adhérer et s'étaler à la surface.

Mais la fibronectine est une protéine multifonctionnelle qui lie aussi entre eux les autres constituants de la MEC comme la fibrine, le collagène et l'héparine.

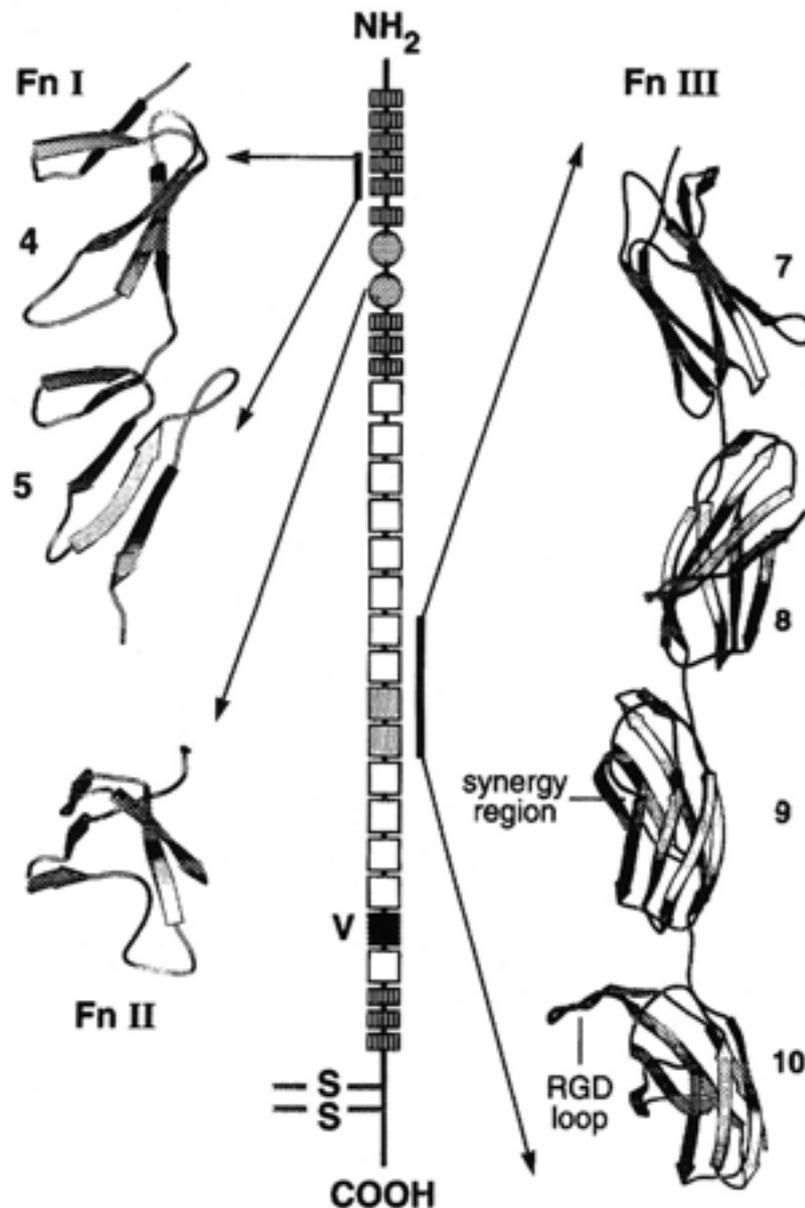


Figure 5. Structure de la fibronectine. Le domaine I, noté Fn I, est représenté par des rectangles barrés, Fn II par des disques gris, Fn III par des carrés blancs. A gauche de la figure, la structure du quatrième et du cinquième domaine de type I est montrée. La partie droite met en évidence un segment de fibronectine formé par les domaines 7 à 10 du domaine III. Le site de liaison reconnu par l'intégrine correspond au tripeptide RD et à la région notée « synergy » dans le domaine Fn III. (D'après Chotia C. et Jones E. Y.<sup>61</sup>.)

De plus, les liaisons des cellules aux MEC peuvent provoquer un changement de forme des cellules, parfois, elles migrent, parfois elles prolifèrent et se différencient ou encore modifient leur activité.

Pour comprendre comment la MEC déclenche de tels phénomènes dans les cellules, il a fallu attendre qu'une protéine membranaire d'adhésion appelée intégrine soit isolée. Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires responsables de l'attachement et de l'étalement d'une cellule sur la MEC. Elles participent aussi à l'adhésion intercellulaire<sup>44,62,63</sup>.

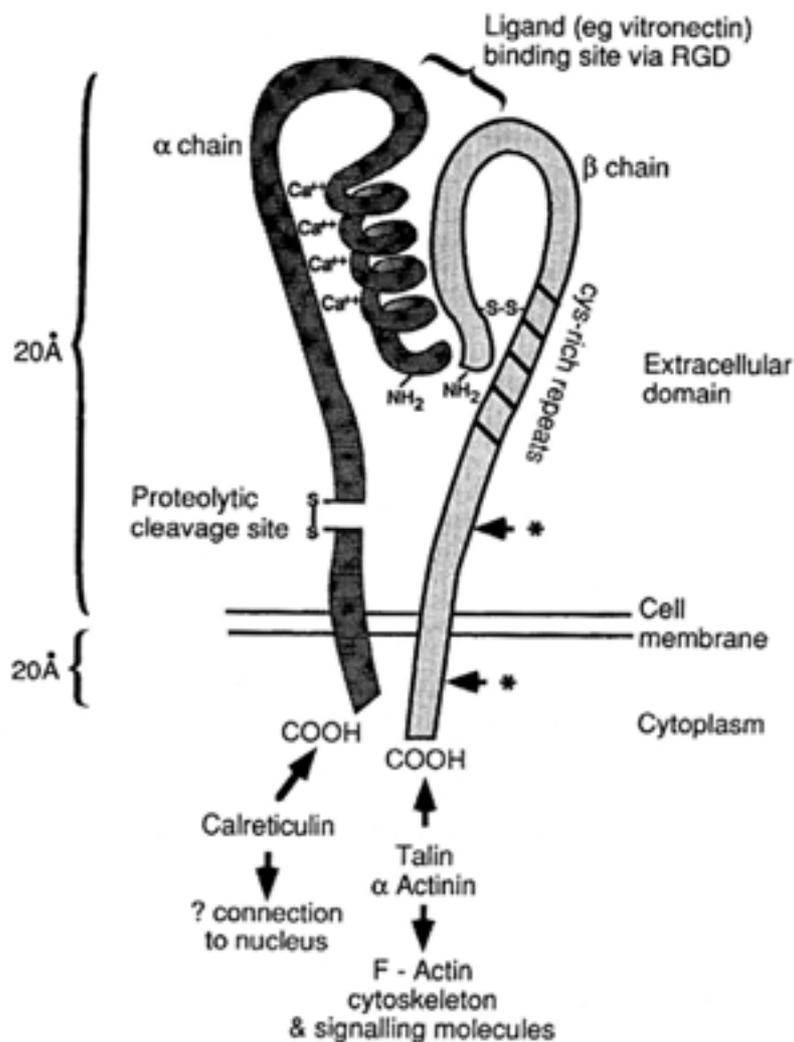


Figure 6. Structure du récepteur de la vitronectine  $\alpha_v\beta_3$  comme modèle d'intégrine<sup>64</sup>.

Elles sont des hétérodimères composés de deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  liées de façon non covalente (Figure 6). Chaque sous-unité possède un domaine extra cellulaire, un domaine trans-membranaire et un court domaine cytoplasmique de 20 à 60 acides aminés. La chaîne  $\alpha$  comporte dans sa partie NH<sub>2</sub> terminale des séquences répétées qui sont responsables de la

fixation d'ions calcium nécessaire à leur fonction. La chaîne  $\beta$  plus courte est responsable de la fixation avec le ligand de la MEC ou un autre récepteur membranaire.

Le mode de fonctionnement de l'intégrine n'est pas connu ; seuls quelques modèles très spéculatifs ont été proposés<sup>65</sup>. Un exemple est donné Figure 7.

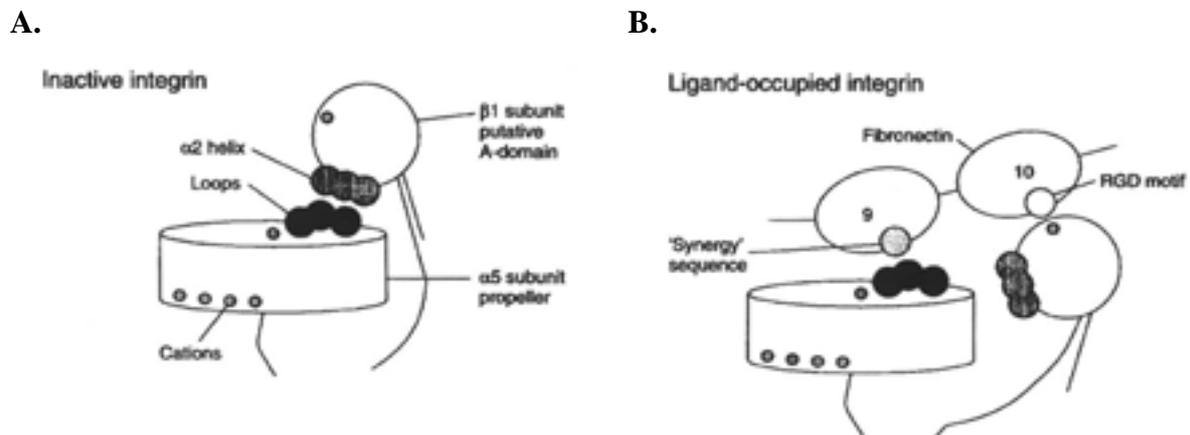


Figure 7. Hypothèse de structure et de fonctionnement d'une intégrine. Deux états sont envisagés avec des conformations des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  différentes selon l'inactivité ou l'activité de l'intégrine i.e. sa liaison à un ligand, ici la fibronectine<sup>65</sup>. Dans un état inactif, l'intégrine (A), l'intégrine est représentée par un cylindre plat (la sous-unité  $\alpha$ ) interagissant avec une sphère (la sous-unité  $\beta$ ). Dans un état actif, ses sous-unités changent de conformation, ce qui libère les sites d'interaction avec un ligand de la MEC, ici, la fibronectine.

Cette famille de récepteurs adhésifs comprend 17 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous unités  $\beta$  qui s'associent pour former plus de 20 combinaisons.

Chaque combinaison  $\alpha/\beta$  détermine la spécificité à son ligand. Par exemple, l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  ne reconnaît qu'un seul ligand : la fibronectine, tandis que d'autres reconnaissent plusieurs ligands, comme l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  qui est le récepteur de l'ostéopontine et de la vitronectine.

Le site de liaison des intégrines aux protéines de la MEC a tout d'abord été identifié comme une région composée d'une séquence de trois acides aminés : l'arginine, la glycine et l'acide aspartique dit RGD. Des peptides contenant la séquence RGD et immobilisés sur une surface promouvaient l'attachement cellulaire de manière similaire à la fibronectine ; tandis qu'en solution, le même peptide inhibe l'attachement des cellules à une surface où de la fibronectine, les peptides eux-même ou d'autres protéines contenant le tri peptide ont été adsorbés. De plus, cette fonction de stimulation de l'adhésion cellulaire est inhibée par un

changement dans la nature du peptide comme la mutation de la glycine par de l'alanine ou de l'acide aspartique par une glutamine (c'est à dire la substitution d'un hydrogène par un groupement méthyle).

Par la suite, les interactions intégrine/ligand sont apparues plus complexes. D'autres séquences ont été isolées comme la séquence DGEA dans le collagène de type I ou la séquence GPRP dans la fibronectine, ou encore la séquence YISRG dans la laminine.

## 2.3. Adhésion cellulaire au niveau du fonctionnement de la cellule

Ainsi, la MEC commande l'activité des cellules : par la liaison des intégrines à la surface, il se forme une vraie colle cellulaire qui entraînera la prolifération et la différenciation de la cellule ou d'un agent de migration. L'activité cellulaire est ainsi régulée<sup>66</sup>.

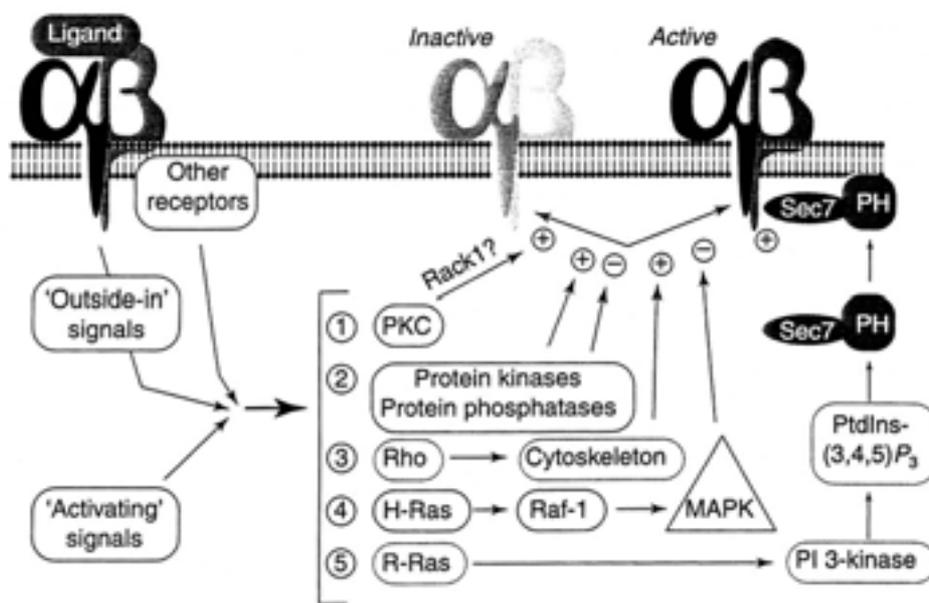


Figure 8. Schéma des différentes voies de transduction du signal liées à l'activation des intégrines. La liaison entre ces voies et l'interaction moléculaire des intégrines aux ligands n'est pas claire<sup>67</sup>

En effet, cette liaison peut activer diverses voies de transduction du signal (Figure 8).

Les intégrines peuvent induire des modifications de pH ou de la concentration du calcium intracellulaire, l'hydrolyse de phosphatidylinositol (PI), l'augmentation des taux de protéines G (Ras et Rho) liée au GTP, ainsi que leur translocation à la face interne de la

membrane plasmique, une réorganisation du cytosquelette comme la polymérisation de fibres d'actine, ainsi que la phosphorylation de nombreuses protéines pour conduire à la transcription de certains gènes.

Enfin, les intégrines participent à la mécano-transduction du signal i.e. à la transformation d'un signal mécanique en signal biologique. Par leur liaison à la fois à la MEC et au cytosquelette, elles transmettent les modifications du support (comme l'étirement ou la compression) à l'intérieur de la cellule.

Cette brève présentation de la compréhension actuelle de l'adhésion cellulaire illustre la complexité et la diversité des phénomènes engendrés au niveau moléculaire ou cellulaire, et montre l'importance de son rôle dans le fonctionnement cellulaire (Figure 9).

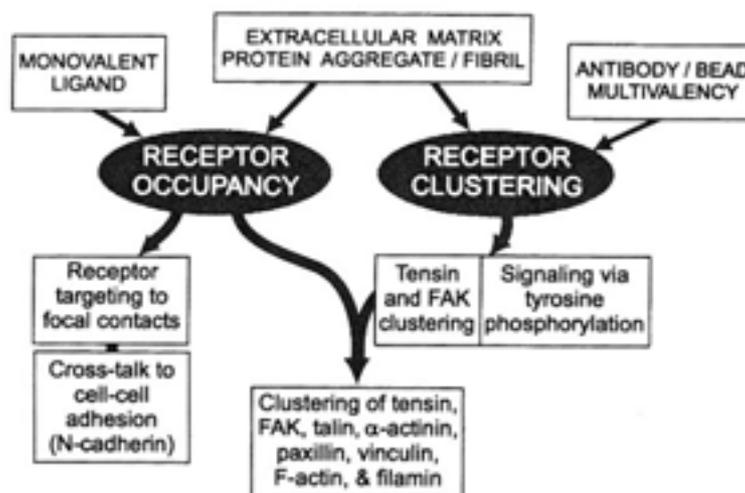
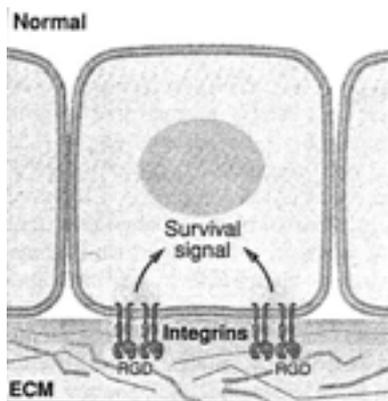


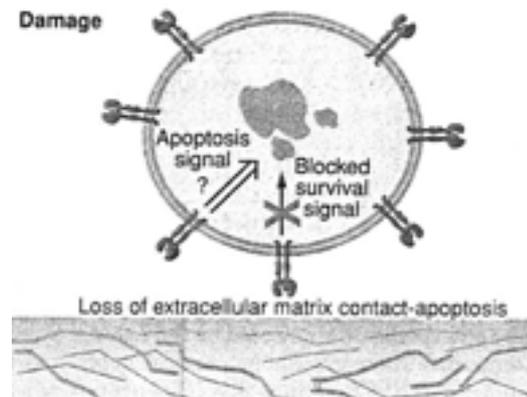
Figure 9. Résumé des réponses dues aux interactions des intégrines au niveau moléculaire<sup>68</sup>.

L'étude de l'adhésion cellulaire qu'elle soit fondamentale ou appliquée dans le domaine de la santé comme dans celui des biomatériaux ainsi que sa régulation demeure un enjeu considérable, notamment pour le développement de nouveaux traitements thérapeutiques. La compréhension des interactions spécifiques entre les intégrines et leurs ligands (Figure 10), des forces qui permettent ou s'opposent à l'organisation d'assemblage macromoléculaire comme le cytosquelette et les protéines associées<sup>69</sup> et la régulation dans le temps de ces phénomènes ne cesse de progresser, grâce à des approches méthodologiques multiples.

A.



B.



C.

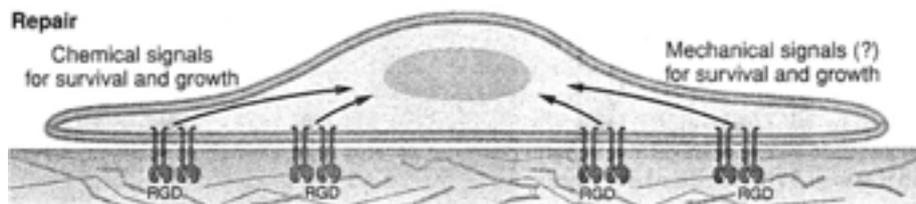


Figure 10. Morphologie de cellules suivant la modulation de leur activité<sup>70</sup>.

C'est dans cette perspective que nous situons notre travail. Il a pour objectif d'évaluer dans quelle mesure l'adhésion d'ostéoblastes est favorisée par la bio-fonctionnalisation d'une surface par la MFA, qui est susceptible d'apporter des informations complémentaires sur le comportement de cellules adhérentes ou non.

### 3. Objectif de cette étude : Evaluer dans quelle mesure l'adhésion d'ostéoblastes est favorisée par la bio-fonctionnalisation d'une surface.

La majorité des études concernant l'adhésion cellulaire porte sur les intégrines ou les voies de transduction du signal. De nombreuses études structurales d'intégrines et de protéines de la MEC, ainsi que des études biochimiques ont permis d'identifier et de localiser précisément les protéines et leurs sites d'interaction, ainsi que le rôle prépondérant des intégrines. Or, l'adhésion cellulaire est fonction du nombre de liaisons intégrine-ligand et de la formation d'agrégats de ces complexes formés. Il en résulte la mise en place d'un important réseau cytosquelettique qui crée des différences d'organisation du cytosol intracellulaire et des modulations des propriétés d'adhérence de la cellule.

Dans le cadre d'une étude sur les biomatériaux, il est apparu important de mettre au point une approche biophysique destinée à visualiser précisément l'organisation cellulaire d'une cellule adhérente et à mesurer simultanément à cette observation et de façon comparative le comportement de ces cellules au regard de cellules moins adhérentes. La cellule forme un système complexe et hétérogène du point de vue mécanique. La Microscopie de Force Atomique a été utilisée en milieu liquide et en mode contact pour ces mesures. Cette technique est une des méthodes les plus performantes pour obtenir une image topographique avec une bonne résolution d'une cellule, vivante et en milieu liquide. Aucun traitement préalable de l'échantillon n'est nécessaire (les cellules ne sont pas fixées). De plus, il a été montré que les forces d'interactions entre la sonde de la MFA et l'échantillon peuvent être mesurées. Une image mécanique simple serait de décrire la cellule comme une sorte de gel

renforcé par des fibres. Ainsi, les propriétés élastiques de la cellule peuvent être déduites par cette méthode, purement mécanique. Toutefois, dans ce travail, nous proposons une autre approche où, à partir de simples images d'une cellule, enregistrées en mode contact et à des forces différentes appliquées par la sonde, et d'un modèle simple, il est possible d'évaluer les tendances sur l'évolution d'un module élastique en fonction de la structure locale de la cellule. Leur comparaison conduit à une caractérisation indirecte de l'adhésion cellulaire. Enfin, l'évolution du comportement de cellules vivantes est suivie par cette technique. Ainsi, le détachement d'une cellule peut être étudié.

La bio-fonctionnalisation d'une surface par des protéines adhésives ou des peptides adhésifs contenant le peptide RGD (qui constitue la séquence minimum reconnue par les intégrines) devrait provoquer une accumulation d'intégrines et déclencher l'adhésion cellulaire. C'est pourquoi deux stratégies de biofonctionnalisation de surfaces ont été développées dans ce travail, en fonction de son utilisation ultérieure envisagée :

(i) La prothèse est traitée en surface et pré-cellularisée avant son implantation *in vivo*. Dans cette approche, le traitement de surface doit être le plus stable possible. Nous nous sommes donc attachés à greffer des monocouches de peptides RGDC ou DGRAFVLC dépourvus d'agrégats en surface stables et homogènes. Ce greffage a été caractérisé précisément par différentes techniques (mouillabilité, IR, XPS, tribologie par MFA à différentes températures).

L'adhésion d'ostéoblastes sur une surface de silice biofonctionnalisée par des peptides RGDC a été déterminée par différentes approches dont celle décrite ci-dessus par MFA. Elle est favorisée dans ce cas, quant à l'occupation des intégrines interagissant avec les peptides greffés à la surface. Par contre, elle n'entraîne pas la formation d'agrégats de complexe intégrines-ligands qui sont responsables du développement d'un cytosquelette intra-cellulaire, et d'une forte adhérence de la cellule. L'influence de la longueur et de l'organisation du peptides à la surface a aussi été évaluée avec DGRAFVLC

(ii) La prothèse est traitée en surface et implantée *in vivo*. Cette biofonctionnalisation doit favoriser un recrutement et une adhésion cellulaire forte directement après son implantation. Dans cette approche, différentes surfaces ont été placées dans un milieu de culture complétement en SVF. Ce sérum contient des protéines adhésives qui s'adsorbent sur les surfaces. Trois surfaces ont été envisagées, il s'agit de la silice et de la silice silanisée. Le Thermanox<sup>®</sup>, qui est une surface couramment utilisée en culture cellulaire a été choisie comme surface témoin. Suivant la surface considérée, l'adsorption des protéines peut

entraîner une adhésion cellulaire forte. C'est du moins ce qui a été évalué par MFA sur une surface de silice silanisée par de l'APTES biofonctionnalisée par du SVF. L'adhésion des ostéoblastes la plus forte a été observée sur ces surfaces. Cette situation nous a aussi permis de montrer que la MFA est une technique qui donne accès à de nombreuses informations sur l'adhésion cellulaire, l'étude de la perte d'adhérence des cellules et de la modulation des propriétés mécaniques des ostéoblastes suivant la biofonctionnalisation de surface envisagée.



## Chapitre II.

# Evaluation de l'adhésion de cellules par Microscopie de Force Atomique (MFA) en mode contact et en milieu liquide



Qu'est ce que l'adhésion cellulaire ? Une cellule adhère à une surface s'il n'est pas possible de la déplacer en exerçant une force pendant un certain temps. Cependant, l'adhésion cellulaire peut comporter des aspects et des mécanismes très variés, qu'il n'est pas toujours facile de décrire. En effet, elle correspond à l'interaction entre une cellule et une surface dont la résultante aboutit à l'activation de trois systèmes, que nous avons présentés dans le premier chapitre sur les généralités :

- Le complexe adhésif
- Le complexe des voies de transduction du signal
- Le complexe du cytosquelette

Notre problématique est d'évaluer dans quelle mesure l'adhésion cellulaire est favorisée par la bio-fonctionnalisation d'une surface et une étude globale du comportement et de l'évolution de cellules vivantes déposées sur différentes surfaces est envisagée. Elle doit tenir compte des caractéristiques propres de l'échantillon étudié : la cellule est un « objet mou » avec une dynamique propre qui évolue sans cesse dans le temps pour s'adapter aux différentes contraintes, rapides ou lentes, auxquelles elles sont soumises. La MFA est une technique qui permet de maintenir les cellules dans un milieu liquide (leur milieu de culture) et qui peut appréhender les propriétés de la cellule vivante.

Une brève description des moyens actuels d'étude de l'adhésion cellulaire nous a amené à choisir la MFA comme approche expérimentale. En mode contact, la sonde de la MFA est constamment au contact de l'échantillon durant le balayage de la surface par la pointe. Pour évaluer ce qui est visualisé et pour effectuer des mesures précises sur l'échantillon, il est nécessaire de contrôler précisément les interactions et les forces exercées entre la pointe et la surface. Le principe de la MFA en mode contact et en milieu liquide, le montage technique et une expérience avec un échantillon biologique seront décrits successivement. Nous présenterons des résultats obtenus par cette technique en exposant les difficultés à la fois expérimentales et techniques rencontrées aux cours des expériences et les précautions à prendre pour réaliser une étude sur les cellules ostéoprogénitrices de moelle osseuse humaine (ou ostéoblastes) par MFA. Des images de cellules vivantes, le suivi de leur évolution et les propriétés mécaniques de ces cellules montreront les possibilités d'étude par cette microscopie. Ce travail préliminaire permettra d'obtenir et d'interpréter dans un troisième chapitre, des images de cellules et de structures cellulaires. Des données précises sur les propriétés mécaniques (définies à partir d'une approche qui sera détaillée dans le Chapitre IV. 1.3) de ces cellules, plus ou moins adhérentes selon le traitement de surface envisagé et décrit en seconde partie de ce mémoire, seront également obtenues.



# 1. Techniques d'étude de l'adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire est le processus d'interaction entre une cellule et une surface. Après plusieurs étapes, elle aboutit aux interactions intégrines – ligands, avec une accumulation d'intégrines qui entraîne une réorganisation du volume intracellulaire et une modification du fonctionnement cellulaire (Figure 11).

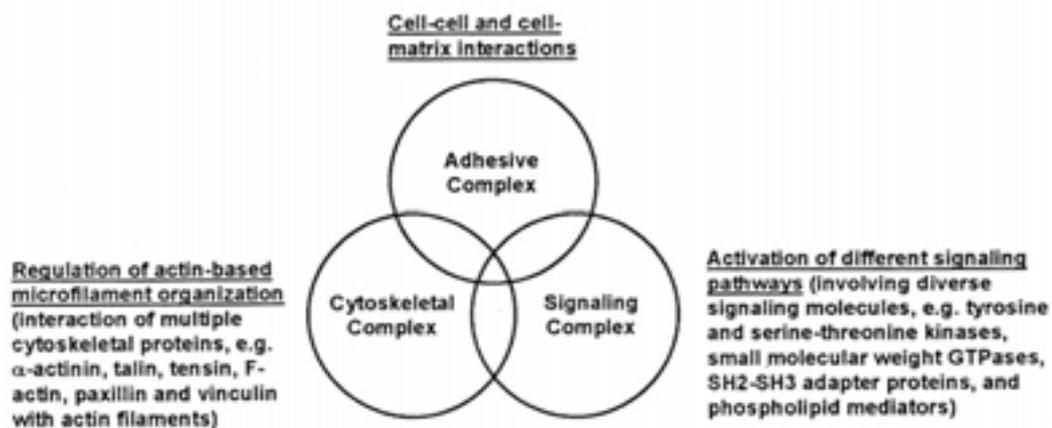


Figure 11. Représentation schématique des différents complexes fonctionnels liés à l'adhésion d'une cellule avec une surface<sup>71</sup>.

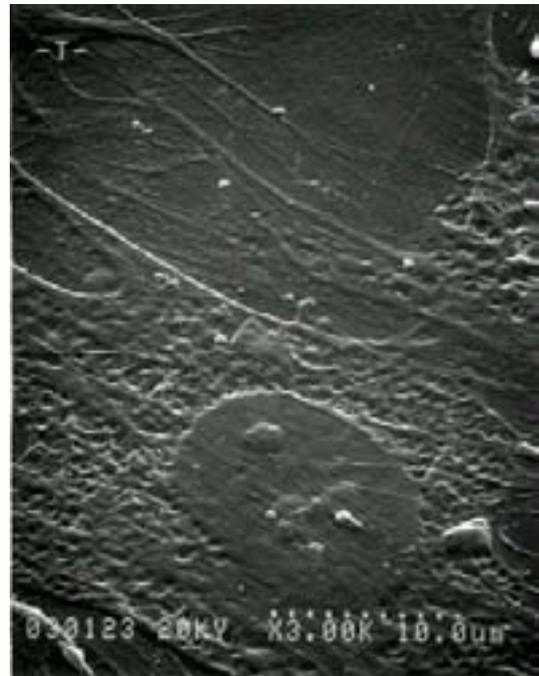
L'adhésion cellulaire peut être spécifique ou non, suivant la nature des constituants biologiques mis en jeu dans ces interactions cellules-surface. Ce phénomène est conditionné par la diffusion ; le temps de réaction est donc une variable importante. Mais les facteurs externes du milieu environnant, les interactions électrostatiques, la physico-chimie de la surface (hydrophobie/hydrophilie, rugosité ...) influent sur l'adhésion cellulaire. D'un point de vue énergétique, l'adhésion est l'énergie nécessaire pour séparer deux surfaces (cellule/solide ou cellule/cellule).

A partir de ces énoncés de l'adhésion cellulaire, sa mesure peut être effectuée par différentes techniques<sup>72</sup>.

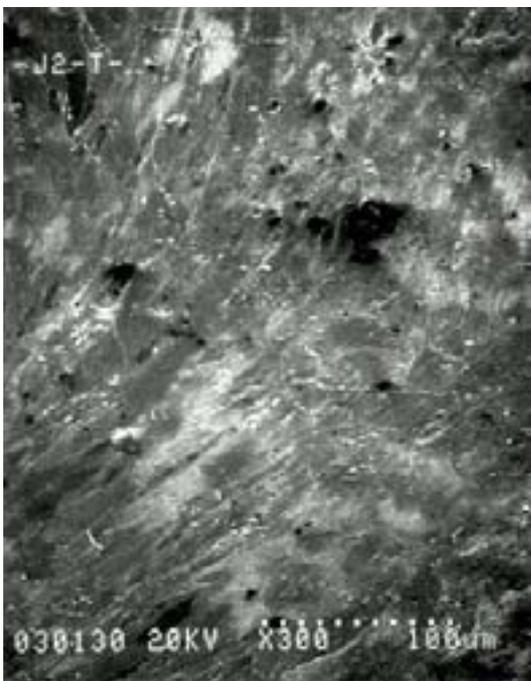
A.



B.



C.



D.

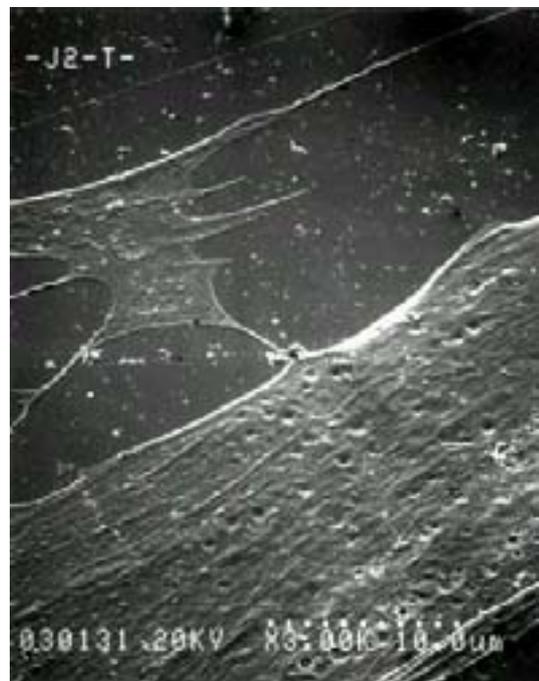


Figure 12. Images de MEB d'ostéoblastes cultivés pendant un jour sur une surface de Thermanox<sup>®</sup> (A, B) ou pendant deux jours sur une surface de Thermanox<sup>®</sup> en présence de Sérum de Veau Fœtal (C,D).

L'observation des cellules étalées ou adhérentes peut être mise en évidence par microscopie électronique par balayage (MEB), comme le montre la Figure 12. Après un jour de culture, les ostéoblastes apparaissent sur la surface de Thermanox<sup>®</sup> ; leur contour et leur noyau sont bien définis, la surface de Thermanox<sup>®</sup> apparaît aussi (Figure 12-A et B). Après deux jours de culture, les cellules sont à confluence (Figure 12-C et D).

Un autre procédé mis au point par Pakalns *et al.*<sup>33</sup> utilise la microscopie optique et permet de compter le nombre de cellules en surface en fonction de leur étalement estimé à partir d'un facteur de forme. Ce facteur est proportionnel au rapport de l'aire des cellules par leur périmètre élevé au carré. Plus sa valeur est proche de 1, moins les cellules sont étalées, ce qui est un des premiers critères concernant l'adhésion des cellules. Cependant, c'est une conséquence non obligatoire de l'adhésion cellulaire.

La recherche de composés moléculaires exprimés par les cellules lorsqu'elles sont adhérentes peut aussi être un moyen de caractériser l'adhésion. Elle nécessite l'utilisation et le développement de méthodes d'observation et de préparation des surfaces cellularisées. Une approche originale consiste à quantifier, sur la même cellule, les surfaces en contact étroit avec le support de culture par microscopie de réflexion (IRM) et les surfaces de contacts focaux dépendants des intégrines par l'immunomarquage de protéines localisées avec les intégrines. L'analyse conjointe de ces deux types d'images d'adhésion focale permet de quantifier les paramètres morphologiques et topographiques des contacts focaux<sup>73</sup>.

L'emploi de ces techniques spécifiques de microscopie offrant des images de haute résolution présente aussi des inconvénients importants. Elles font intervenir un traitement des cellules, avec une étape de fixation des cellules qui peut entraîner des difficultés d'interprétation des images. Elles ne permettent en aucun cas de suivre une activité cellulaire en continu dans le temps.

Des méthodes faisant appel à des techniques biochimiques<sup>74,75</sup> où une protéine spécifique est dosée par spectrophotométrie, procurent des informations intéressantes mais d'ordre purement quantitatif (nombre de cellules/surface). Elles ne discriminent pas les cellules réellement adsorbées en surface des cellules adhérentes ; même si les échantillons sont rincés après leur colonisation par les cellules : on suppose que les cellules qui ne sont pas éliminées par ce moyen sont bien fixées à la surface. Le problème consiste donc à définir la « force » à appliquer pour rincer l'échantillon. Ainsi, les résultats peuvent être dispersés. Mais ils fournissent des renseignements très utiles s'ils sont utilisés pour des expériences comparatives. C'est une méthode statistique qui indique un comportement d'adhésion des cellules déposées sur différentes surfaces.

Une microbalance à quartz, qui transforme une variation de masse en une variation de fréquence, en milieu liquide, présente une grande sensibilité pour étudier *in situ* et en temps réel, un processus d'adhésion cellulaire<sup>76</sup>. Mais les mêmes difficultés rencontrées lors des tests d'attachement i.e. l'état exact d'adhérence des cellules apparaissent encore avec cette technique.

Grâce à l'utilisation d'écoulements hydrodynamiques laminaires<sup>77,78</sup>, l'adhérence des cellules et leur force d'adhésion peuvent être mesurées à partir de la force de cisaillement appliquée par le flux contrôlé de liquide. D'une manière générale, on emploie une surface fixe colonisée par des cellules et des forces de cisaillement sont exercées et transmises aux échantillons. Ces méthodes représentent une alternative intéressante du fait de l'absence de traitement de l'échantillon. L'adhérence et le mouvement des cellules sont analysés. La surface de dépôt des cellules ou des protéines peut également être recouverte de protéines particulières. En présence d'un écoulement laminaire, les cellules sont soumises à une force hydrodynamique et leur comportement est suivi par vidéo-microscopie. Cette technique permet de déterminer la fréquence de formation de liaisons entre des protéines liées à la surface et des molécules cellulaires d'adhésion.

Des techniques de micromanipulation des cellules permettent d'appliquer à une cellule des sollicitations mécaniques contrôlées. La technique des micropipettes consiste à provoquer une déformation d'une cellule avec une micropipette dans laquelle une dépression contrôlée est maintenue. L'analyse de cette déformation permet d'accéder à certains paramètres élastiques de la cellule comme l'élasticité et la viscosité de la membrane plasmique ou du corps cellulaire<sup>79, 80, 81</sup>.

Une autre technique un peu similaire mais qui permet d'exercer des forces appliquées de l'ordre de la dizaine de nanonewtons, consiste à étirer une cellule vivante entre deux plateaux de verre traités pour favoriser leur adhésion. Dans ce cas, la cellule subit une déformation globale.

Récemment, le développement d'une nouvelle méthode par E. Evans appelée « Biomembrane Force Probe »<sup>82,83,84</sup>, a permis une mesure très précise des forces de détachement de cellules. Une vésicule déformable (comme un globule rouge ou un liposome qui joue le rôle d'un ressort très souple) est collée biochimiquement à une bille de latex recouverte de protéines d'adhésion ou à une autre cellule. Après contact entre la vésicule déformable et la bille au moyen de micropipettes, la bille est rétractée sous contrôle microscopique. Le globule rouge se déforme s'il y a adhésion, jusqu'à la rupture. La

déformation du globule rouge est évaluée et comme son module élastique est connu, la force exercée i.e. la force de déadhesion peut être déduite.

La MFA (dont le principe et les modes de fonctionnement sont décrits en annexe) constitue une autre voie d'analyse de l'adhésion cellulaire. Son développement pour l'étude de cellules vivantes date de 1994<sup>85,86,87</sup>. Elle offre un accès direct à l'observation des cellules vivantes à haute résolution, *in situ*. Aucun traitement des échantillons n'est nécessaire. Elle fonctionne en milieu liquide et permet d'étudier des cellules ou des molécules biologiques dans leur environnement physiologique. L'étude de processus cellulaires dynamiques est possible en temps réel. En plus de fournir ces images et de suivre en temps réel l'évolution de la cellule, ce microscope est un « appareil de force » qui détecte les propriétés mécaniques des cellules.

Il est aussi possible de tenter de mesurer la force d'adhésion de cellules avec un MFA en se plaçant dans une certaine configuration d'analyse. A notre connaissance, il existe une tentative d'exploiter la MFA dans le but d'effectuer une mesure directe de l'adhésion cellulaire. Sagvolden *et al.*<sup>88</sup> ont proposé ce type de mesure avec un microscope de force modifié. Le principe de base est illustré sur les Figure 13 et Figure 14. Le levier MFA est utilisé comme un piston muni d'un ressort et la cellule est poussée latéralement. La mesure de la force est obtenue en enregistrant la flexion du levier en fonction du déplacement latéral. L'évolution de la compression de ce ressort mesure la force qu'il est nécessaire d'appliquer pour décoller la cellule (Figure 14). Il est cependant nécessaire d'ajouter, à partir de la démonstration de E. Evans sur les interactions moléculaires, que le décollement des cellules dépendra aussi de l'orientation et de la durée d'application de la force.

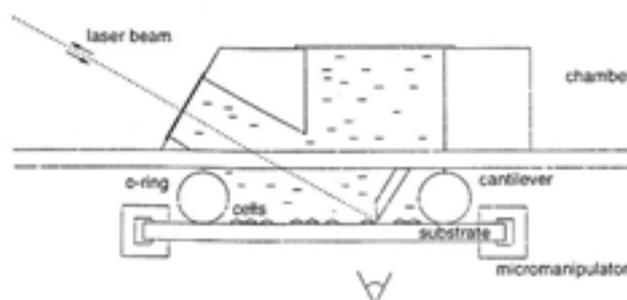


Figure 13. Schéma du MFA, mis au point par Sagvolden *et al.*<sup>88</sup>

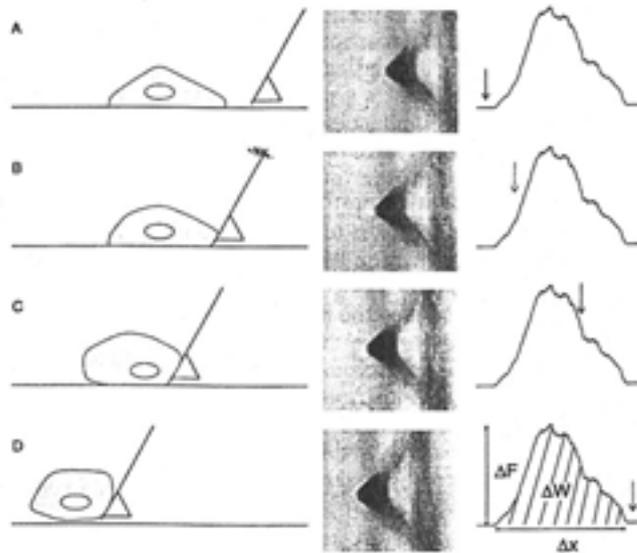


Figure 14. Expérience de mesure de l'adhésion cellulaire par MFA<sup>88</sup>.

A droite, schéma du déplacement des cellules, au centre, les cellules sont observées par microscopie optique, et à gauche, la force appliquée et montrée en fonction du déplacement. De (A) à (D), aucune force n'est appliquée par la sonde du microscope, puis elle est progressivement augmentée jusqu'au déplacement des cellules.

Ainsi qu'il est discuté dans cette publication, cette mesure pourrait fournir une information précise sur la force de décollement de la cellule si l'on était à même de connaître exactement quelle est la contrainte appliquée à l'interface entre la cellule et la surface. Comme la cellule ne se comporte pas comme un bloc rigide, mais, bien au contraire, se déforme fortement, il devient très difficile de pouvoir déduire la force appliquée à l'interface cellule-surface à partir de la force latérale appliquée par le levier. Néanmoins ces mesures ont permis de donner des indications sur la qualité de la fixation des cellules en fonction de la surface, de la température ou du temps de dépôt. Comme nous le verrons par la suite dans le cas de nos expériences, lorsque nous balayons la cellule avec la pointe, nous avons, bien évidemment, le même type de problèmes pour tenter d'évaluer de façon quelque peu quantitative l'adhésion de la cellule.

Bien que l'évaluation de la force d'adhésion des cellules soit délicate, les changements d'élasticité d'une cellule sont mesurables par MFA. Parmi les multiples travaux d'étude des cellules par MFA<sup>89,90,91,92,93</sup>, celui réalisé par Domke *et al.*<sup>94</sup> qui utilise des cellules ostéoblastiques vivantes de lignées (SaOS2) peut être détaillé. Ils ont visualisé la surface et le cytosquelette sous membranaire cellulaire par microscopie de force atomique en mode contact. Les changements d'élasticité dans une cellule sont estimés à partir du mode force. Des courbes de force ont été enregistrées sur toute la surface de la cellule, et l'image obtenue

montre des différences d'élasticité entre 30 ou même jusqu'à 60 points différents de la cellule. A partir des courbes de force, l'indentation de la cellule par la pointe est mesurée. L'application de la théorie de Hertz<sup>95</sup> permet ensuite de calculer le module élastique aux différents points de la cellule observée. Des variations de modules élastiques de 2,1 kPa à 8,8 kPa ont été constatées et elles ont été attribuées à des différences d'organisation intracellulaire sous-jacente qui se traduit par différentes réponses de la cellule.

Il est possible ensuite de corréler la distribution spatiale des modules élastiques des cellules et la nature des filaments du cytosquelette, par injection de drogues pour le cytosquelette en MFA<sup>96</sup> ou par fixation des cellules et par marquage fluorescent des filaments du cytosquelette en combinant MFA et microscopie de fluorescence<sup>97</sup>.

Ces données sont suffisamment encourageantes pour que l'évaluation de l'adhésion d'ostéoblastes suivant la bio-fonctionnalisation d'une surface soit envisagée à partir de cette technique. Dans ce but, l'objectif est dans un premier temps de mieux comprendre le fonctionnement du MFA en mode contact et en milieu liquide, puis de mettre au point une expérience de MFA appliquée aux cellules d'intérêt : les ostéoblastes. Les difficultés expérimentales et techniques fréquemment rencontrées seront exposées. Enfin, ce qui précède conduit à élaborer des stratégies méthodologiques précises. C'est à partir de ces données techniques que nous aborderons la caractérisation de l'adhésion cellulaire sur différentes surfaces traitées dans un troisième chapitre.



## 2. MFA en mode contact et en milieu liquide appliquée à l'étude d'ostéoblastes

### 2.1. Principe de la MFA en mode contact et en milieu liquide

#### a. Description des forces entre une nanopointe et une surface à l'air

Les forces qui s'exercent entre une nanopointe et une surface sont regroupées en deux catégories :

- Les forces attractives (les forces de Van der Waals et en général les forces liées à la distribution de charges) qui sont responsables de l'adhésion.
- Les forces de répulsion stérique liées au contact entre la pointe du microscope et la surface de l'échantillon. Suivant les propriétés du système étudié (élasticité et viscoélasticité), la pointe s'enfoncera plus ou moins en fonction de la charge extérieure appliquée et de la force d'adhésion.

Cette présentation de la MFA se situe spécifiquement dans le cadre de l'étude de nos cellules en milieu liquide. Aussi, comme ces matériaux sont particulièrement mous, nous mettrons l'accent sur le contrôle des forces qui régissent l'interaction entre la pointe et la membrane. De plus, une approximation évidente est de considérer la pointe comme infiniment rigide, seule la cellule est susceptible de se modifier sous l'action des forces en présence.

Dans un premier temps, nous présentons la contribution des forces attractives et leur évaluation, puis nous discuterons brièvement du contact élastique d'une sphère rigide avec une surface plane.

Après cette présentation, à l'aide de courbes de force en MFA, nous indiquerons comment exploiter, au moins qualitativement, ces quelques notions introduites.

Dans le cas qui nous concerne, la description de l'influence des interactions attractives d'une nanopointe en contact avec une surface en présence de l'eau comme troisième milieu, nous restreignons notre discussion aux interactions à courte portée. Ce sont pour l'essentiel ces forces qui gouverneront l'état d'équilibre du système pointe/surface élastique à l'échelle du nanomètre. D'une part, les forces électrostatiques éventuelles liées à des distributions de charges bien séparées spatialement, conduisent à des forces qui varieront lentement par rapport à l'échelle locale du contact, d'autre part dues à la constante diélectrique élevée de l'eau (78), ces forces seront fortement écrantées. Dans tous les cas, comme nous le montrerons lors d'expériences préliminaires sur des surfaces en fonction de différentes conditions, liées à la présence d'eau ou non, en fonction du tampon etc..., ces approximations peuvent être aisément vérifiées à l'aide de mesures par courbes de force.

L'appellation « forces de Van der Waals » englobe trois formes distinctes d'interaction entre les molécules. Ces forces se caractérisent par une dépendance spatiale en  $1/r^6$ , où  $r$  est la distance entre les molécules considérées. De plus, dans le cas de milieux continus, ces forces s'additionnent simplement permettant, pour des géométries simples comme une pointe hémisphérique et une surface plane, de calculer aisément la force d'interaction. Ces forces résultent des interactions suivantes :

- L'interaction entre dipôles permanents d'orientation aléatoire (forces de Keesom)
- L'interaction entre dipôles permanents orientés de façon aléatoire et un dipôle induit (forces de Debye) :
- Forces de dispersion (forces de London) : elles constituent la seule forme d'interaction entre des molécules non polaires ; et dans le cas de molécules polaires, elle se superposent aux forces de Keesom et de Debye. Elles sont liées à la polarisabilité électronique des atomes et résultent de la création d'un moment dipolaire instantané induit dans le temps, dans une molécule non polaire qui crée un moment induit dans une autre molécule non polaire qui se trouve à proximité, et réciproquement.

Dans le vide le potentiel d'interaction de van der Waals s'écrit de la façon suivante<sup>98</sup> :

$$W_{vdW}(r) = -\frac{1}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} (C_{Keesom} + C_{Debye} + C_{disp})$$

avec  $C_{Keesom} = p^2 p^2 / k_B T$  ;  $C_{Debye} = p^2 \alpha_0$  ;  $C_{disp} = (3/4) \alpha_0^2 h\nu$ .

Les rapports entre ces différentes constantes nous donnent l'importance relative des contributions de van der Waals. Pour un moment dipolaire  $p = 1$  Debye, une polarisabilité  $\alpha_0 = 4\pi\epsilon_0 (0.1 \times 10^{-9})^3$  et un potentiel d'ionisation  $h\nu = 2,2 \cdot 10^{-18}$  J, on obtient avec  $k_B T = 4.14 \times 10^{-21}$  J (température ambiante):

$$C_{disp}/C_{Keesom} = (9/4) k_B T \alpha_0^2 h\nu / p^4 \sim 2 \text{ et } C_{disp}/C_{Debye} = (3/4) \alpha_0 h\nu / p^2 \sim 16.$$

Excepté pour les molécules d'eau, où le moment dipolaire est important (1,8 Debye) et la polarisabilité électronique relativement faible, la contribution du terme de dispersion est généralement dominante.

Le Tableau 3 présente les contributions à l'interaction de Van der Waals pour différentes molécules dans le vide et à une température de 293 K.

Molécules identiques	$C_{Debye} = \frac{2p^2 \alpha_0}{(4\pi\epsilon_0)^2}$	$C_{Keesom} = \frac{p^4}{3(4\pi\epsilon_0)^2 k_B T}$	$C_{London} = \frac{3\alpha_0^2 h\nu}{4(4\pi\epsilon_0)^2}$	Contribution (%) du terme de dispersion
<i>Ne - Ne</i>	0	0	4	100
<i>CH<sub>4</sub> - CH<sub>4</sub></i>	0	0	102	100
<i>HCl - HCl</i>	6	11	106	86
<i>CH<sub>3</sub>Cl - CH<sub>3</sub>Cl</i>	32	101	282	68
<i>NH<sub>3</sub> - NH<sub>3</sub></i>	10	38	63	57
<i>H<sub>2</sub>O - H<sub>2</sub>O</i>	10	96	33	24
Molécules différentes	$\frac{p_1^2 \alpha_2 + p_2^2 \alpha_1}{(4\pi\epsilon_0)^2}$	$\frac{(p_1 p_2)^2}{3(4\pi\epsilon_0)^2 k_B T}$	$\frac{3}{2} \frac{\alpha_1 \alpha_2 h\nu}{(4\pi\epsilon_0)^2}$	
<i>Ne - CH<sub>4</sub></i>	0	0	19	100
<i>H<sub>2</sub>O - Ne</i>	1	0	11	92
<i>H<sub>2</sub>O - CH<sub>4</sub></i>	9	0	58	87

Tableau 3. Contributions des termes de Debye, Keesom et London ( $10^{-79}$  J.m<sup>6</sup>) à l'interaction de Van der Waals<sup>98</sup>

A partir des interactions atome-atome décrites ci-dessus, il est possible de déduire la force d'interaction entre la pointe du MFA et une surface. Dans le cadre d'interactions de Van der Waals dispersives non retardées et additives, la théorie de Hamaker considère que les corps interagissent comme des assemblées d'atomes et somme les potentiels d'interaction par paires d'atomes sur leur volume en regard. Ce modèle a été proposé initialement pour déterminer l'interaction entre deux sphères macroscopiques à partir du potentiel de dispersion de London.

Si la pointe est assimilée à une sphère de rayon  $R$  située à une distance  $D$  d'une surface plane, le potentiel d'interaction de Van der Waals entre deux corps 1 et 2 de densités respectives  $\rho_1$  et  $\rho_2$  peut s'écrire :

$$W_S - p = -\pi^2 \frac{(C_{Disp} \rho_1 \rho_2 R)}{6D}$$

A titre indicatif le potentiel d'interaction de Van der Waals entre deux surfaces plan – plan est donné par.

$$V_{pp}(D) = -\frac{H}{12\pi D^2}$$

$H$  est la constante de Hamaker non retardée de l'interface 1 – 2. Elle est définie comme :

$$H = \pi^2 C_{Disp} \rho_1 \rho_2$$

A partir des constantes de Hamaker et avec une « distance de contact »  $D = d_c = 0.165$  nm, le potentiel d'interaction plan-plan permet le calcul de la tension de surface de systèmes organiques tels les alcanes et donne un bon accord avec les résultats expérimentaux<sup>98</sup>. Lorsque l'on considère des systèmes aromatiques, comme le benzène, l'accord est moins bon du à la contribution des électrons pi. Dans le cas de l'eau, ce calcul sous estime nettement la valeur de la tension de surface à cause d'un moment dipolaire élevé. La constante de Hamaker variant peu en fonction des milieux considérés (Tableau 4), un argument dimensionnel donne  $H = \pi^2 C_{disp} \rho \rho \approx \pi^2 a^6 h v_1 / v^2$ , où  $a$  est de l'ordre du rayon de l'orbitale de la couche électronique externe et  $v$  est le volume occupé par l'atome. On voit ainsi que la constante de Hamaker ne montrera pas de grandes variations en fonction du type d'atome. La constante de Hamaker varie entre  $5 \cdot 10^{-20}$  J et  $15 \cdot 10^{-20}$  J.

Milieu	$C_{vdw}$ ( $10^{-79} J.m^6$ )	$\rho$ ( $10^{28} m^{-3}$ )	$H$ ( $10^{-20} J$ ) <i>Hamaker</i>
Hydrocarbure	50	3,3	5
$CCl_4$	1500	0,6	5
$H_2O$	140	3,3	15

Tableau 4. Constantes de Hamaker de quelques milieux<sup>98</sup>.

### *i. Les forces d'adhésion*

Dans le cas d'une géométrie sphère-plan, la force d'adhésion est donnée par :

$$F(D) = 2\pi V_{vdW}^{pp}(D)R = 2\pi R \left( -\frac{H}{12\pi D^2} \right)$$

Pour évaluer cette force dans le cas de la MFA en mode contact, nous prendrons comme distance de contact  $D = d_c = 0,165 \text{ nm}$ .

En considérant que la sphère et la surface sont indéformables, la force adhésive est donnée par :

$$F_{adhésive} = -2\pi WR = -\frac{HR}{6d_c^2}$$

Notons que pour une surface déformable, K. Johnson, K. Kendal et Roberts ont montré par une étude thermodynamique<sup>99</sup> du contact entre une sphère et une surface que la force de décollement est donnée par :

$$F_{adhésive} = -\frac{3}{2}\pi WR$$

Il est à noter que dans des conditions atmosphériques ambiantes, les surfaces des échantillons sont recouvertes d'une pellicule d'eau, qui est susceptible de rajouter aux forces d'adhésion déjà décrites une contribution due à des forces de capillarité. Les processus d'adhésion par capillarité sont liés à l'apparition d'un ménisque à l'interface entre la pointe et la surface. La capillarité peut également être liée à la structure de l'échantillon. C'est le cas par exemple des matériaux viscoélastiques tel que le polyéthylène glycol (PEG) adsorbé sur une surface. La pointe reste piégée dans le PEG, comme cela a été constaté au cours d'expériences réalisées au laboratoire (Voir annexe).

A partir des expressions précédentes, on obtient immédiatement un ordre de grandeur des forces en l'absence d'une charge appliquée. Avec  $R = 40 \text{ nm}$ ,  $H = 5 \cdot 10^{-20} \text{ J}$ ,  $d_c = 0.165 \text{ nm}$ , on obtient une force d'adhésion  $F_{adh} \approx 10 \text{ nN}$ . En anticipant sur le paragraphe c), nous pouvons évaluer l'enfoncement de la pointe correspondant à l'état d'équilibre du contact entre la pointe indéformable et une surface élastique de faible module. La force élastique qui équilibre la force d'adhésion est donnée par  $F_{élast} \approx G\phi\delta$ , où  $\phi$  est le diamètre de l'aire de contact entre la pointe et la surface et  $\delta$  l'enfoncement. Pour une pointe conique, cette expression conduit à un enfoncement donné par (voir paragraphe c) :

$$\delta \approx \sqrt{\frac{F}{G}} = \sqrt{\frac{10^{-8}}{10^4}} = 10^{-6} m$$

où l'évaluation de l'enfoncement a été calculé pour un module élastique  $G = 10$  kPa. On voit ainsi, que pour des matériaux mous, il sera impossible de réaliser une expérience à l'air (ou dans le vide) qui ne puisse éviter un enfoncement très important.

## b. Réduction des forces d'interaction entre une nanopointe et une surface en milieu liquide

Lorsqu'un milieu liquide est ajouté au système pointe-surface, un nouveau bilan de forces s'établit. Les forces de Van der Waals et les forces d'adhésion peuvent être diminuées voire annulées. Les forces verticales exercées par la sonde du MFA peuvent ainsi être réduites, en milieu liquide, à la force externe normale appliquée par la flexion du levier et définie par l'expérimentateur. En effet, l'ajout d'un troisième milieu change la constante de Hamaker.

### i. Calcul de la constante de Hamaker $H$

Par souci de simplification, nous prendrons deux corps de constitution identique, notés 1, séparés par un second milieu noté 2. Dans un milieu continu et homogène, la polarisabilité électronique se réécrit en fonction de l'indice de réfraction du milieu, ce qui conduit à l'expression de la constante  $C_{disp}$  :

$$C_{Disp} \approx \frac{\sqrt{3}h\nu_e}{4} \frac{(n_1^2 - n_2^2)^2}{(n_1^2 + 2n_2^2)^{3/2}} a^6$$

où  $n_1$  et  $n_2$  sont les indices de réfraction des milieux 1 et 2.

A titre de comparaison, nous prendrons deux surfaces de silice en regard en milieu liquide. Avec  $n_{Si} = 1,46$ ,  $n_{H_2O} = 1,33$  et  $n = 1$  dans le vide, le rapport des forces d'interaction entre ces deux surfaces dans le vide et dans l'eau est donné par :

$$\frac{C_{Disp}^{vide}}{C_{Disp}^{eau}} = \frac{(1,46^2 - 1)^2 (1,46^2 + 2 \times 1,33^2)^{3/2}}{(1,46^2 + 2)^{3/2} (1,46^2 - 1,33^2)^2} \approx 15$$

Ainsi, dans ce cas de figure, on s'attend à une réduction de la force d'adhésion de plus d'un ordre de grandeur. Par rapport à notre calcul précédent, si nous transposons ce résultat pour estimer l'enfoncement à charge nulle, cela signifie qu'au lieu d'avoir un enfoncement de l'ordre du micromètre, nous aurons une indentation de l'ordre de 250 nanomètres.

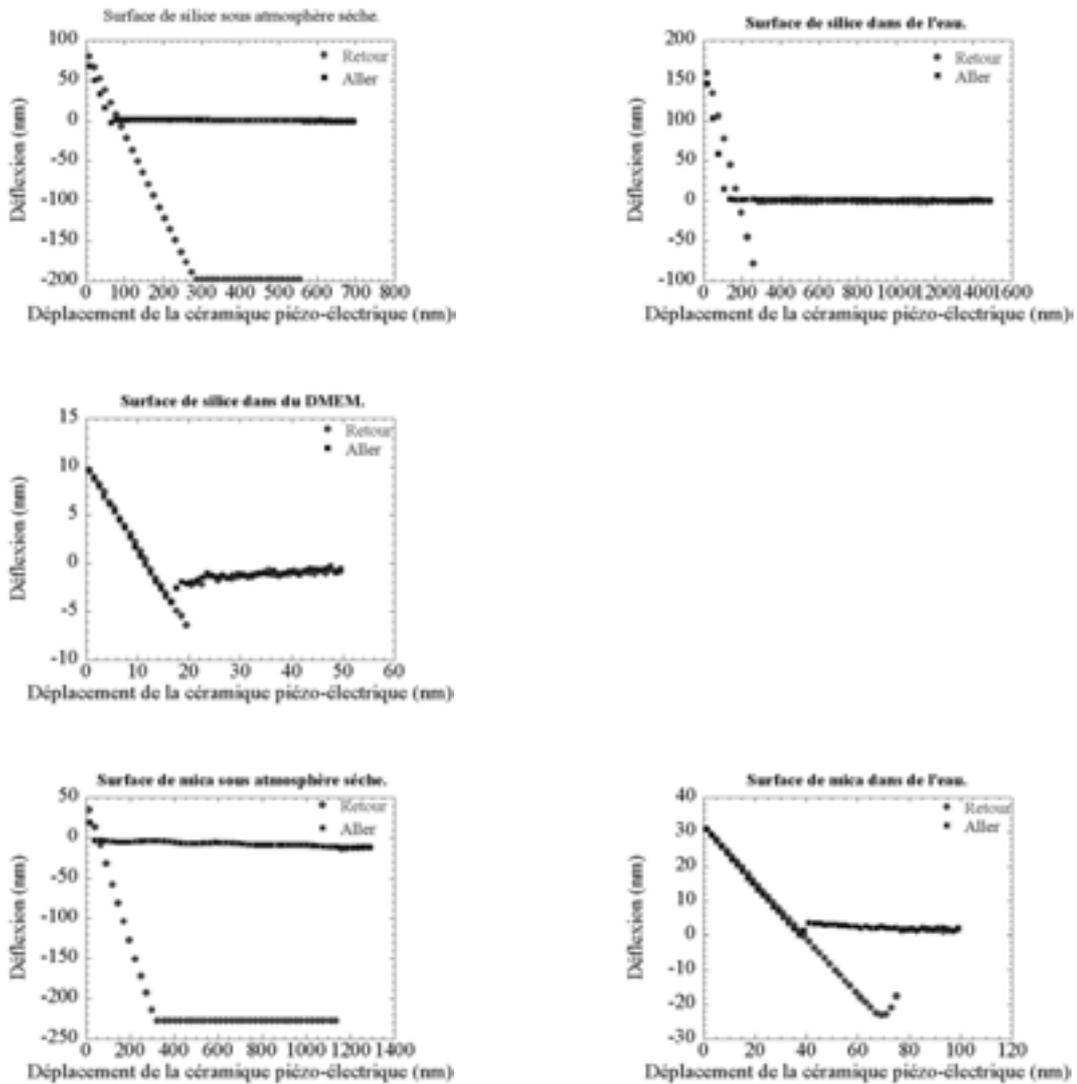


Figure 15. Courbes de forces enregistrées sur des surfaces de silice et de mica dans différents milieux.

Dans le cas où le milieu liquide est le milieu de culture des cellules (i.e. du DMEM), la composition même de ce milieu est complexe et elle ne permet pas de calculer les constantes de Hamaker et les forces adhésives correspondantes. Seule l'expérience est susceptible de montrer que les forces adhésives sont complètement écrantées dans le milieu de culture, quelle que soit la surface considérée. Dans l'air on observe très nettement le cycle d'hystérésis entre l'approche et le retour, cycle dû à une force d'adhésion non nulle. Lorsque avec la

même pointe on réalise une expérience identique dans l'eau, le cycle d'hystérésis n'est plus mesurable (Figure 15). De même, toujours en milieu liquide, si nous changeons la surface (mica au lieu de silice) ou le tampon, voire en présence de protéines, nous constatons toujours que l'interaction attractive est suffisamment faible pour ne pas générer de cycle d'hystérésis.

Ces résultats indiquent que, dans nos conditions expérimentales, les forces exercées sur une cellule dans un milieu de culture sont réduites aux forces hydrodynamiques et à la force exercée par la flexion du levier elle-même définie par l'expérimentateur.

## *ii. Enfoncement de la pointe du MFA et réponse élastique de la surface de l'échantillon*

### **Théorie de Hertz<sup>95</sup>**

Elle décrit la géométrie d'un contact élastique entre deux sphères de rayons quelconques ou une sphère et une surface plane (rayon de courbure infini). Les hypothèses sont les suivantes :

- les solides en regard sont soumis à de petites contraintes, dans les limites de leur réponse élastique linéaire,
- les surfaces sont lisses,
- la force s'applique perpendiculairement au plan de contact des objets. Il n'y a ni adhésion ni frottement ou force tangentielle au plan défini par le contact.

Pour ce qui nous concerne, nous prendrons le cas d'une sphère indéformable en contact avec une surface plane élastique (Figure 16). Cela implique que dans les expressions qui suivent, les modules élastiques caractérisent les propriétés de la surface, le module de la pointe étant considéré comme infini. De même, les facteurs de forme, rayon de courbure, angle au sommet pour un cône, se réfèrent uniquement à la géométrie de la pointe.

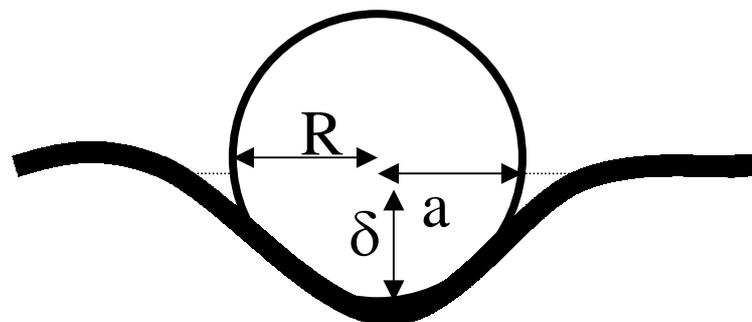


Figure 16. Schéma de la sonde du MFA et de la réponse élastique d'une surface.

Considérons une force normale  $P$  exercée par la sphère sur une surface plane. Le rayon de contact  $a_{Hertz}$  et la déformation élastique  $\delta_{Hertz}$  sont donnés par les relations :

$$a_{Hertz} = \sqrt[3]{\frac{3PR}{4E}} \quad \text{et} \quad \delta_{Hertz} = \frac{a_{Hertz}^2}{R} = \sqrt[3]{\frac{9P^2}{16RE^2}}$$

La déformation élastique  $\delta_{Hertz}$  nous donne l'enfoncement de la pointe dans la surface. Cet enfoncement varie de façon non linéaire avec une puissance 2/3 en fonction de la charge.

### **Raideurs de contact**

Le système pointe et levier de la MFA peut être assimilé à un élément mécanique simple tel que un ressort de constante de raideur  $k_c$  terminé par une sphère. Ainsi le contact entre l'ensemble pointe-levier et la surface est souvent modélisé comme une combinaison de ressorts en série. Dès lors, il est plus approprié de présenter les propriétés de la surface en terme de raideur, le produit d'un module élastique par une longueur, plutôt qu'en terme de module élastique. Cela constitue de fait le problème central des sondes locales, à savoir être à même d'évaluer l'extension spatiale de la perturbation de la pointe MFA afin d'être plus quantitatif dans l'analyse de la réponse mécanique de l'objet analysé. Une telle évaluation nécessite en premier lieu des hypothèses sur la forme et la taille de la pointe. Pour les enfoncements faibles, nous considérons que la pointe est décrite de façon appropriée par une forme sphérique. Dans ce cas le modèle de Hertz démontre que pour un plan de contact présentant une aire de contact  $A$ , égale à  $\pi a_H^2$  ( $a_H$  étant le rayon de contact), la raideur normale de contact  $k_e$  est égale à :

$$k_e = 2Ea$$

Notons que nous aurions une relation similaire pour la force élastique tangente à la surface de contact, dans ce cas c'est le module de cisaillement du milieu semi-infini qui interviendrait. Le résultat donné par la théorie de Hertz qui établit une relation entre la surface de contact, son diamètre, le module élastique et la raideur de contact est en fait un résultat général dès lors que la géométrie de la pointe est régulière et la surface est continue et homogène.

### c. Evaluation de la force externe appliquée par la sonde du MFA en mode contact et en milieu liquide

Les études quantitatives de l'élasticité des cellules par MFA sont toutes basées sur le modèle de Hertz. La raison principale est due au fait qu'en milieu liquide, l'adhésion est négligeable comme nous l'avons montré précédemment. Une seconde raison, moins évidente a priori, est que l'on néglige une éventuelle plasticité ou viscoplasticité de la cellule. Nous discuterons cet aspect lors de la présentation de nos résultats.

Dans le cadre de ces études, l'échantillon est supposé être plat, homogène et élastique. Ces hypothèses peuvent apparaître surprenantes pour une cellule, puisque celle-ci est plus ou moins arrondie et présente des hétérogénéités y compris quand on la considère simplement comme un milieu élastique. Cependant, pour ce qui est de la géométrie du contact, l'approximation d'une surface plane sera souvent une approximation acceptable. En effet la plupart des cellules s'étalent sur des dizaines de microns, voire la centaine, pour des hauteurs maximales de l'ordre de quelques microns. Dès lors le rayon de courbure de la membrane cellulaire est plus grand de plusieurs ordres de grandeur que celui de la pointe ce qui autorise à considérer la surface de la cellule comme localement plane.

Par contre, la réponse mécanique locale de la cellule est difficile à définir. A ce stade de notre présentation, nous utiliserons la raideur locale  $k_e$  donnée par la théorie de Hertz en l'exprimant en fonction du diamètre de l'aire de contact  $\phi$  de la sonde du MFA sur la membrane:

$$k_e = G\phi$$

Comme nous le verrons dans le 1 de le chapitre IV, le problème essentiel est la définition du module élastique local  $G$ . Suivant la profondeur d'indentation de la pointe, la géométrie, et par voie de conséquence le diamètre de l'aire de contact  $\phi$ , est susceptible de suivre des lois d'évolution différentes en fonction de l'indentation. Comme nous l'avons indiqué précédemment, aux faibles indentations, la forme d'une sphère de rayon  $R$  se situant autour de 50 nm est souvent utilisée. Pour des valeurs de l'indentation plus importantes, de la centaine de nanomètre au micron, la pointe est pyramidale avec un angle d'ouverture  $\theta$  de la pointe de 35°. A cause de l'élasticité d'une cellule que l'on peut considérer comme un gel renforcé ou réticulé par des fibres, ces profondeurs d'indentation sont tout à fait envisageables. Pour ces valeurs d'indentation, nous prendrons la géométrie du cône.

Pour un cône, la relation entre la profondeur d'indentation  $\delta$  et le diamètre de l'aire de contact  $\phi$  est donnée par la formule de Sneddon:

$$\phi = \frac{8}{\pi} \delta \tan(\theta)$$

En combinant l'expression donnant la raideur de contact avec l'expression du diamètre en fonction de l'indentation, on obtient la relation suivante entre l'indentation et la force externe appliquée :

$$\delta^2 = \frac{P}{\frac{8}{\pi} \tan(\theta) G}$$

A la différence de la prédiction donnée par la théorie de Hertz, on voit que pour un cône, la profondeur d'indentation varie comme la racine carré de la force appliquée.

En terme de mesure mécanique par MFA, nous utiliserons le modèle mécanique constitué de deux ressorts en série. L'un des ressorts décrit les propriétés du levier, l'autre la réponse élastique locale du matériau. L'équilibre entre la force résultant de la flexion du levier et la réponse élastique du matériau donne :

$$k_c \delta_c = k_e \delta$$

Dans le cas d'une mesure par courbe de force, le déplacement est imposé par le mouvement vertical du support piézoélectrique de l'échantillon. Ce déplacement est la somme de la compression du levier et de la profondeur d'indentation de la sonde.

$$\Delta = \delta_c + \delta$$

En combinant ces deux équations on obtient la pente de la courbe de force qui nous donne le taux de variation de la flexion du levier en fonction du déplacement vertical de la surface :

$$P = \frac{1}{1 + \frac{k_c}{k_e}}$$

Comme on le voit, la valeur de cette pente ainsi que sa loi d'évolution donne accès à la raideur locale de la surface. Pour une surface indéformable, le rapport  $k_c/k_e$  tend vers zéro et

la pente sera égale à 1. C'est ainsi que l'on calibre la flexion du levier en nanomètre. Pour une surface dont le module élastique tend vers zéro (comportement liquide), la pente tend également vers zéro.

Lors d'une courbe de force, l'évolution de la flexion du levier en fonction du déplacement vertical  $\Delta$ , nous permet dans un premier temps de tester les différentes hypothèses sur la forme géométrique de la pointe, puis dans un second temps d'évaluer le module élastique de la membrane cellulaire. Un exemple d'une telle procédure est montré sur la Figure 17 et la Figure 18. La Figure 17 montre que le meilleur ajustement est obtenu à partir d'une forme de pointe conique. Dans ces conditions, les valeurs de module ne sont données qu'à titre indicatif (Figure 18) puisque la valeur de la raideur du levier n'est pas exactement connue.

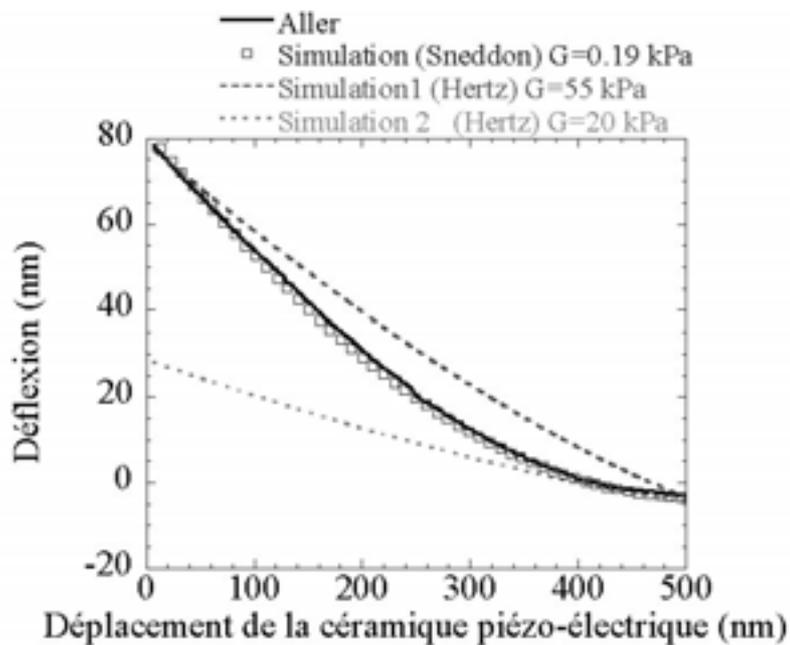


Figure 17. Courbes de force enregistrées sur un ostéoblaste. L'ajustement a été réalisé en utilisant une forme de pointe conique (Sneddon) et sphérique (Hertz)

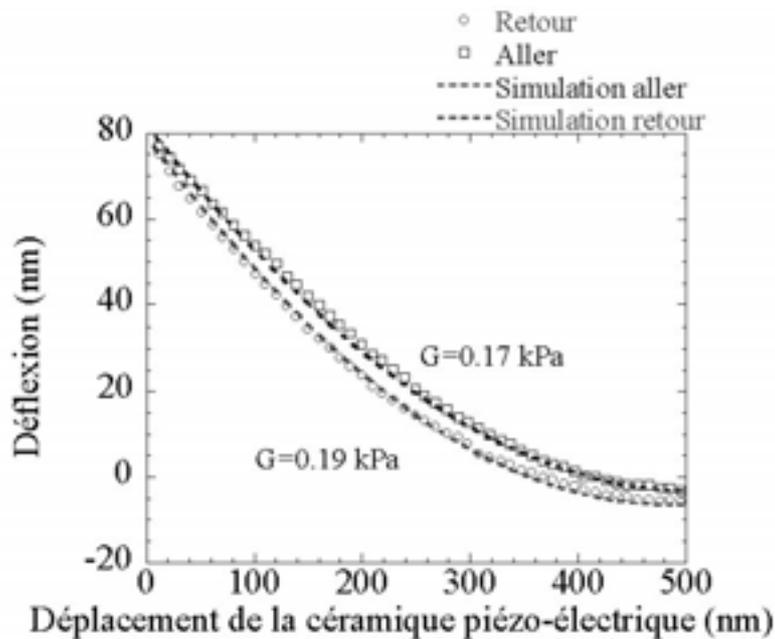


Figure 18. Courbes de force enregistrées sur une surface d'ostéoblaste. La sonde indente la surface et la déflexion de la sonde n'est pas proportionnelle au déplacement de la céramique piézo-électrique. A partir de ces courbes de force, le module élastique ( $G$ ) de l'échantillon est calculé selon la formule de Sneddon et le modèle de Hertz appliqués à une indentation élastique.

#### d. Evaluation des forces hydrodynamiques lors du balayage en cellule liquide.

Nous rappelons d'abord la configuration du montage expérimental. La cellule liquide est fixée sur la partie supérieure de la tête du microscope et l'étanchéité est assurée par un joint entre la cellule et le support de l'échantillon. La partie rigide de la cellule et le levier sont donc fixés et ont une vitesse nulle. Le support a une vitesse imposée par la dimension latérale du balayage et la fréquence de balayage. Dans le cas de nos expériences, les vitesses de déplacement de la surface sont de l'ordre de  $100 \mu\text{m/s}$ . Nous avons donc comme conditions aux limites une vitesse du liquide de  $100 \mu\text{m/s}$  sur la surface et une vitesse nulle sur le levier. Ainsi, en réalisant une image, un gradient de vitesse est créé dans le fluide qui induit un cisaillement sur la cellule. Le but de ce paragraphe est d'évaluer la force maximale s'appliquant sur l'ensemble de la cellule. Pour ce faire nous calculerons la force exercée sur le levier résultant du déplacement de fluide confiné entre le levier et la surface.

Pour cette évaluation, nous prendrons une description simplifiée du système pointe levier. La hauteur de la pointe est  $h = 4 \mu\text{m}$ , et le levier sera représenté par une plaque de

largeur  $30 \mu\text{m}$  et longueur  $200 \mu\text{m}$ . Le levier n'est pas parallèle à la surface, mais fait un angle d'inclinaison de  $12^\circ$ .

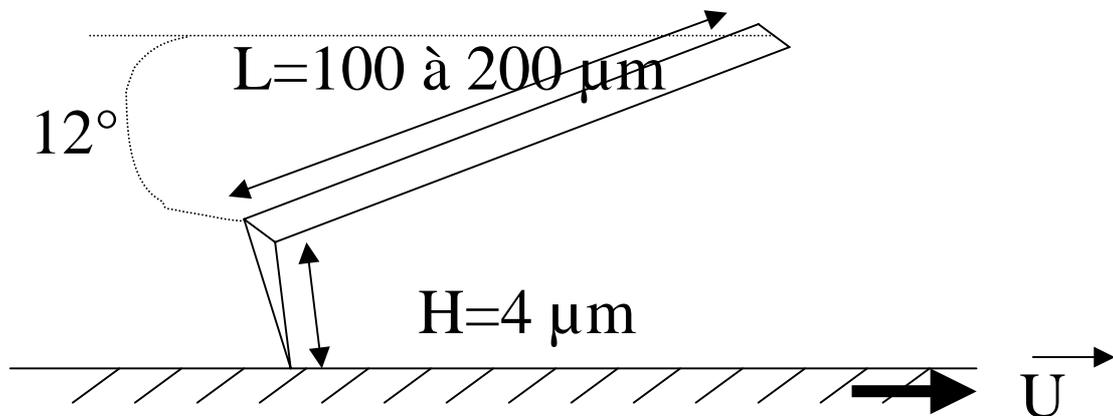


Figure 19. Schéma simplifié du système pointe-levier-surface.

Le problème analogue est de considérer une plaque à une certaine hauteur de la surface se déplaçant dans le liquide au repos. Les transferts de quantité de mouvement dans le fluide peuvent s'effectuer soit par la viscosité (diffusion des vitesses) du milieu, soit par transfert de matière (convection). Dans notre cas, le nombre de Reynolds qui établit l'importance relative de ces deux processus est donné par  $Re = \rho UL/\eta$ , avec  $U$  la vitesse de la surface,  $\rho$  la densité de l'eau et  $\eta = 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$  sa viscosité. On trouve  $Re = 10^{-2}$  ce qui nous amène à négliger le terme d'inertie. Malgré le fait que l'on ait une plaque de largeur finie et petite, nous négligerons la possibilité pour le liquide de s'échapper, en d'autres termes on suppose le débit nul entre le levier et la surface. Cela conduit à calculer des valeurs de force maximale pour le gradient de pression imposé sur le levier<sup>100</sup>.

La pointe ayant une hauteur de  $4 \mu\text{m}$ , avec un angle d'inclinaison de  $\theta = 12^\circ$ , la hauteur minimale du levier se situe à  $4 \mu\text{m}$ , sa hauteur maximale à  $h_{\text{max}} = \theta L = 40 \mu\text{m}$ . Si le levier est parallèle à la surface une évaluation immédiate de la force est obtenue en considérant le gradient de vitesse donné par  $U/h_{\text{max}} = 10^{-4}/4 \cdot 10^{-5} = 2,5 \text{ s}^{-1}$ . Avec  $S = bL$ , la surface de la plaque on obtient :

$$F_{\text{Hyd}} \approx \eta \frac{U}{h_{\text{max}}} bL = 2,5 \times 10^{-3} \times 30 \times 200 \times 10^{-12} = 1,5 \times 10^{-11} \text{ N}$$

Cette force est totalement négligeable au regard de la force de décollement moyenne d'une cellule qui se situe autour de la centaine de nN.

En prenant en compte l'inclinaison du levier et en calculant la distribution de pression correspondante le long du levier avec un débit nul on obtient une expression de la force donnée par<sup>100</sup> :

$$F_{Hyd} \approx 6\eta \frac{Ub}{\theta^2} \ln \frac{L}{h} = 6 \times 10^{-3} \times 25 \times 10^{-4} \times 3 \times 10^{-5} \times 4 = 1,8 \times 10^{-9} N$$

Bien que nettement supérieure à l'estimation précédente, cette valeur suggère que les forces hydrodynamiques devraient avoir un effet négligeable sur la tenue des cellules. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que même si nous relevons quelque peu la cellule lorsque l'on décide d'analyser une autre zone, le déplacement latéral de l'ordre de quelques millimètres peut conduire à des vitesses nettement supérieures à celles que nous avons considérées. Dans ce cas des forces de l'ordre de la dizaine de nN peuvent être générées et perturber les cellules faiblement adhérentes.

## 2.2. Expérience par MFA en mode contact et en milieu liquide appliquée à l'étude d'ostéoblastes

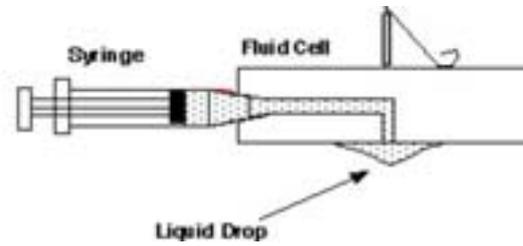
### a. Montage expérimental

Il ne diffère pas de celui d'expériences réalisées à l'air. Seule une cellule liquide est ajoutée à cet appareillage. C'est le support de la sonde du MFA lorsqu'il est utilisé avec une solution liquide (Figure 20).

A.



B.



C.



Figure 20. (A) Cellule liquide du MFA de type Nanoscope. La sonde est approchée à l'aide d'une pince, dans une encoche prévue sur la cellule liquide et elle est maintenue fixe.  
(B) Représentation en coupe de la cellule liquide et d'une partie du système de circulation de liquide.  
(C) Cellule liquide mise en place sur la tête du microscope.

## b. Méthodologie

### i. Surfaces de dépôt des ostéoblastes

Dans la première étape de caractérisation de l'adhésion d'ostéoblastes par MFA, les surfaces choisies sont des surfaces témoins, qui sont couramment utilisées en culture cellulaire pour leurs propriétés adhésives pour les cellules. Ce sont des surfaces de plastiques

(Thermanox<sup>®</sup>). Des surfaces de silice sont biofonctionnalisées puis utilisées pour évaluer l'adhésion des ostéoblastes sur ces surfaces. Il est à noter que, lorsque le milieu de culture est complétement en SVF, ces protéines du sérum s'adsorbent sur la surface (Figure 21)<sup>101</sup>. Sur la Figure 21. D., l'adsorption des protéines du SVF est nettement distinguable sur l'image : elle apparaît comme des agrégats sphériques très réguliers, qui sont absents quand le milieu de culture n'est pas suppléementé en SVF (Figure 21. C.).

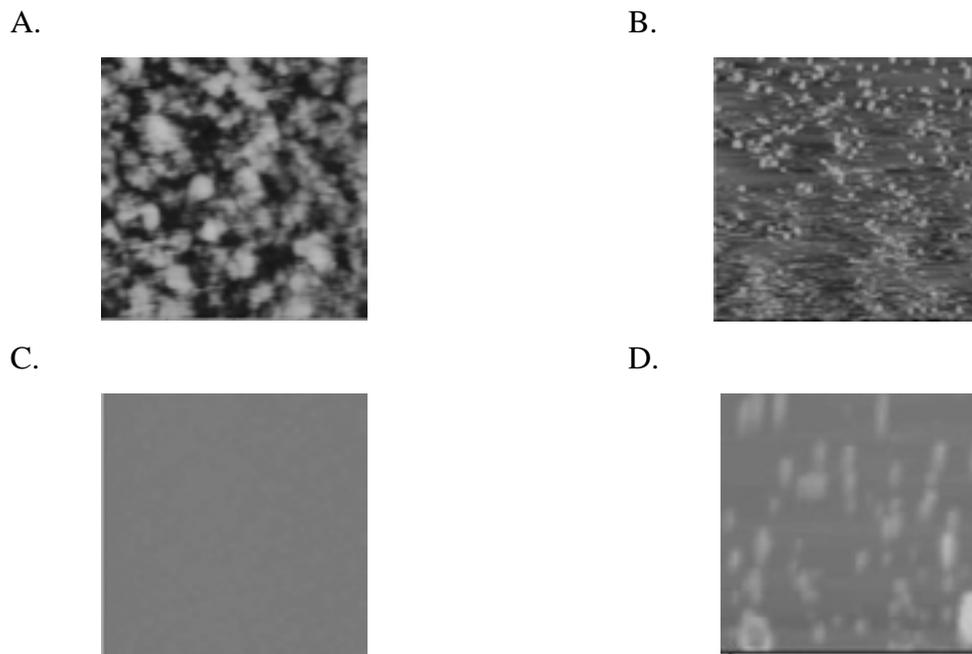


Figure 21. Images de surfaces de Thermanox<sup>®</sup> (A, B) et de silice (C, D) obtenues à l'air (A, C) ou dans le milieu de culture complétement en SVF (B, D).

(A) :  $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m} \times 5\ \text{nm}$ , vitesse =  $4\ \mu\text{m/s}$  et (B) :  $7\ \mu\text{m} \times 7\ \mu\text{m} \times 150\ \text{nm}$ , vitesse =  $14\ \mu\text{m/s}$ .

(C) :  $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m} \times 800\ \text{nm}$ , vitesse =  $4\ \mu\text{m/s}$  (D) :  $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m} \times 800\ \text{nm}$ , vitesse =  $220\ \mu\text{m/s}$ .

## ii. Préparation de l'échantillon

Les cellules étudiées sont des cellules ostéoprogénitrices humaines, observées au stade ostéoblastiques. Elles proviennent de cultures cellulaires réalisées au Laboratoire de Biomateriaux et Réparation Tissulaire. Elles ont été déposées sur différentes surfaces. Le temps de culture doit être déterminé : il est fonction des conditions de culture (avec ou sans SVF) et de la surface de dépôt. Pour 20 000 ostéoblastes cultivées sur des surfaces de Thermanox<sup>®</sup> sans SVF ajouté au milieu, le temps d'observation a été estimé, à partir d'images

de MEB (Figure 12) à 24 H après incubation à 37°C, sous une atmosphère humide et en présence de CO<sub>2</sub>. Ces images de MEB montre la présence et l'étalement des ostéoblastes sur les surfaces, condition indispensable pour des observations par MFA. La quantité de cellules déposées a aussi dû être déterminée par des observations préliminaires par MFA. Elle devait autoriser une observation rapide des cellules par MFA, sans qu'elles soient à confluence. En effet, notre problématique est centrée sur l'étude des interactions intégrines – ligands fixés sur une surface. Afin d'exclure la mise en place par la cellule d'autres systèmes d'interaction, notamment cellule-cellule, la confluence des cellules a toujours été évitée. Cependant, le nombre de cellules à la surface doit être suffisant pour une étude par MFA.

Ce microscope, utilisé en mode contact, permet d'observer des cellules vivantes dans leur environnement aqueux. Dans ce milieu liquide, les forces attractives dues à la tension de surface sont éliminées. Cela permet d'observer la surface d'un échantillon avec une force minimum appliquée par la sonde du MFA. Par contre, si les cellules sont faiblement adsorbées, le passage de la sonde les détache de la surface et elles retournent dans le milieu de culture environnant. De ce fait, les cellules doivent être adhérentes et non adsorbées pour être observées par MFA.

La sonde de la MFA est toujours en contact avec les cellules. Pourtant, les cellules ne sont pas endommagées par la sonde, contrairement à ce qui pourrait être supposé. D'une part, au cours d'une observation des surfaces, la force appliquée est toujours minimale : c'est la force nécessaire pour visualiser les cellules présentes en surface. Cette force nécessite d'être estimée précisément (page 74 à 77). Elle correspond à la force définie par le point de fonctionnement du microscope. Rappelons que la force d'adhésion dans le milieu de culture (DMEM, avec ou sans SVF) est nulle. Et que d'autre part, quand l'adhésion des cellules est évaluée en appliquant une force externe par la sonde du MFA, les observations ont montré que cette force appliquée n'était pas invasive pour la cellule. Lorsqu'une cellule est fermement attachée à une surface, sa structure reste inchangée. Des études ont aussi montré l'absence d'endommagement des cellules par MFA<sup>102,103,104,105,106,107</sup>.

### *iii. Description d'une expérience par MFA*

La façon de procéder est sensiblement la même que celle décrite en mode contact et à l'air (voir Annexe). Il faut :

- positionner l'échantillon, qui demeure toujours en milieu liquide, sur la tête du microscope, après l'avoir solidement fixé avec du scotch double face sur une pastille magnétique.

- placer la sonde du MFA sur la cellule liquide, puis la remplir de liquide.

Une précaution particulière doit être portée au remplissage de la cellule liquide par une solution tampon ou un milieu de culture cellulaire. En effet, le remplissage est réalisé au moyen d'une seringue (Figure 20. B.) et l'injection de bulles dans le liquide doit être évitée afin de permettre ensuite le réglage du microscope et l'observation des échantillons sur une durée suffisante.

- fixer la cellule liquide sur la tête du microscope (Figure 20. C.).
- régler le faisceau laser à l'extrémité de la sonde, positionner le miroir et centrer les photodiodes, comme décrit dans l'annexe.
- engager la sonde sur l'échantillon

Au début de l'expérience, nous réalisons l'engagement sur une zone de 10 nm de côté avec une fréquence de balayage de 1 Hz, cela afin d'éviter l'endommagement éventuel d'une cellule se trouvant sous la pointe. La zone de contact entre la pointe de la MFA et la cellule est minimisée. Une courbe de force est toujours réalisée en début d'expérience. Elle est obtenue avec de vitesses de balayage en Z de 2  $\mu\text{m/s}$ .

Une autre façon de procéder utilise le mode image. La force externe appliquée est progressivement réduite jusqu'à ce que la pointe ne soit plus en contact avec la surface puis elle est augmentée, par la rétraction et l'extension de la céramique piézo-électrique : la force externe minimale à appliquer est définie de la sorte.

Les images sont enregistrées avec des angles de balayage à 90° de l'axe de symétrie du levier, des vitesses maximales de 260  $\mu\text{m/s}$ , sur des zones en XY de 130  $\mu\text{m}$  et en Z de 5,5  $\mu\text{m}$ . En conséquence, une hauteur de cellules supérieure à 5,5  $\mu\text{m}$  ne peut être mesurée par MFA.

#### *iv. Limitations d'une analyse par MFA de cellules*

Nous énoncerons en premier lieu les contraintes expérimentales liées à l'instrumentation et à la nature même des échantillons analysés pour la réalisation de cette thèse.

Tout d'abord, les déplacements en Z de la céramique piézo-électrique pour un appareil de type Nanoscope III sont au maximum de 5.5  $\mu\text{m}$ . Lorsque la hauteur d'une cellule est supérieure à ce déplacement maximal, la céramique piézo-électrique ne permet plus de compenser les variations de hauteur et ainsi de contrôler la distance entre le levier et la cellule. Cela implique que la poutre de la sonde de plus de 100  $\mu\text{m}$  de long et la pointe de plus de 4  $\mu\text{m}$  de haut reste à une hauteur constante et pénètre de façon incontrôlée dans la cellule,

l'arrachant lors de son passage. La hauteur ne sera pas estimée par le MFA et la cellule sera emportée par la sonde sur tout son volume situé au delà de 5.5  $\mu\text{m}$  en Z. L'image de n'importe quelle cellule de hauteur supérieure à 5.5  $\mu\text{m}$  apparaît saturée.

Au cours d'une expérience de MFA avec un appareil de type Nanoscope, le liquide situé dans la cellule liquide s'évapore au cours du temps. Cela conduit à la présence d'air entre le haut de la cellule liquide et le liquide, modifiant très nettement le chemin optique du faisceau laser du MFA à cause des variations d'indice des milieux et entraînant une variation de la force appliquée au cours du temps. C'est plus particulièrement gênant quand la céramique piézo-électrique est rétractée. Le signal des photodiodes peut varier. Cette variation du niveau de liquide, qui entraîne une différence de trajet optique du faisceau laser qui est décelé au niveau des photodiodes est facilement corrigée en rajoutant du milieu de culture dans la cellule liquide du microscope. Le remplissage de la cellule liquide doit être vérifié tout au long d'une expérience et du liquide doit être rajouté régulièrement. Dans le cas contraire, la force appliquée varie au cours d'une expérience.

Il est à noter que la force appliquée peut varier à cause d'une dérive mécanique de la céramique piézo-électrique elle-même provoquée par de grands déplacements. Elle est calculée à partir de la variation de déplacement de cette céramique piézo-électrique entre chaque image.

En ce qui concerne les échantillons, leur observation doit se faire rapidement. En effet, la durée de l'expérience est limitée à la durée de vie des cellules. Lors d'une expérience par MFA, les cellules ne sont plus incubées à 37°C, sous une atmosphère humide et en présence de CO<sub>2</sub> : leur durée de vie est de l'ordre de 4 à 5 H.

Il faut ajouter que l'ensemble de cette étude a été réalisé à une température de 30°C. La limitation en durée de ces expériences devrait également être liée à ce paramètre.

Pour les expériences de MFA présentées dans cette étude, des données sur un grand nombre de cellules ne sont pas disponibles. En effet, avec le type d'appareil dont nous disposons pour ce travail, seule une petite aire de surface (maximum 130  $\mu\text{m}$  x 130  $\mu\text{m}$  pour les directions X, Y) peut être observée. De plus, la durée d'une expérience de MFA appliquée aux ostéoblastes est limitée à 5 heures ; ce qui correspond, en fait, à la durée de vie de ces cellules placées dans les conditions d'analyse par MFA. Etant donné les dimensions des ostéoblastes, et bien que plusieurs zones différentes d'une surface donnée aient été observées, le nombre de cellules observées reste toujours faible, surtout comparé à d'autres méthodes d'analyse. Ce qui est présenté dans ce manuscrit a été reproduit plusieurs fois.

L'observation d'échantillons en milieu liquide par MFA trouve de nombreuses applications dans le domaine de la biologie, mais elle nécessite de prendre quelques précautions. Les échantillons biologiques sont généralement très fragiles, et nécessitent d'être conservés dans leur milieu biologique naturel, en milieu liquide. Ce milieu liquide minimise les forces d'adhésion entre la sonde du MFA et la surface de l'échantillon. Ces interactions varient avec : la raideur et la forme de la sonde du MFA, et la nature des interactions pointe-échantillon. La constitution de la pointe, celle de la surface de l'échantillon et la présence d'un troisième milieu influent sur les observations du MFA. Ce principe a été détaillé dans un premier chapitre. Le montage expérimental, la conduite d'une expérience de MFA et l'estimation de la force appliquée à l'échantillon ont été successivement considérés. L'étude de l'adhésion d'ostéoblastes peut maintenant être abordée.



Chapitre III.

Biofonctionnalisation de  
surfaces de silice par  
modification biochimique



Les surfaces jouent un rôle prédominant sur l'adhésion cellulaire. En effet, leurs propriétés physiques, chimiques et biochimiques contrôlent les processus d'adsorption de protéines, d'interaction cellule-surface et de développement de tissu cellulaire à l'interface implant-tissu humain environnant.

Quelle que soit l'approche envisagée, l'objectif est de rendre le matériau bioactif par la biofonctionnalisation de sa surface afin de favoriser la biointégration de la prothèse. Le matériau est rendu bioactif par :

- (i) l'adsorption de protéines adhésives sur une surface de silice ou sur une surface de silice silanisée.

La surface ainsi traitée est implantée. Elle devrait entraîner un recrutement et une adhésion cellulaire forte directement *in vivo*.

- (ii) le greffage de monocouches de peptides adhésifs de type RGD. Deux peptides de longueurs différentes ont été utilisés : RGDC et DGRAFVLC. Dans cette seconde approche, la stratégie est tout à fait différente puisqu'il s'agit de pré-cellulariser la prothèse après ce traitement chimique de surface et avant son implantation *in vivo*.

Dans ce troisième chapitre, nous proposons le développement de telles surfaces et l'étude physico-chimique des matériaux ainsi élaborés (XPS, mouillabilité, IR, tribologie à différentes températures par MFA).

Bien que le titane soit utilisé cliniquement comme matériau implantable, à cause de ses propriétés de biocompatibilité, la surface de silice a été choisie comme surface modèle pour permettre la caractérisation topographique et tribologique du greffage par MFA. Cependant, le greffage proposé est directement applicable à tout matériau disposant de sites hydroxyles en surface, comme le titane.

Il sera aussi présenté quelques caractérisations (rugosité et mouillabilité) d'une surface de Thermanox<sup>®</sup> (plastique étiré), couramment utilisé en culture cellulaire et choisi comme surface témoin dans cette étude.



# 1. Les matériaux biologiquement fonctionnels

La réponse d'une cellule qui interagit avec une surface est fonction, d'une part, du milieu où est immergé le biomatériau et, d'autre part, de la structure et de la composition de la surface du matériau. Toute stratégie de modification de surface devra démontrer que le traitement de surface est uniforme, reproductible, stable dans le temps et contrôlé.

## 1.1. Adsorption de protéines adhésives

Les propriétés physico-chimiques de la surface du matériau sont gouvernées par la composition du milieu environnant. Les protéines présentes dans le milieu environnant ou sécrétées par les cellules peuvent s'adsorber à l'interface solide-liquide. L'adsorption de protéines peut être exploitée pour modifier la surface d'un matériau<sup>108</sup>. Les fluides biologiques ou le milieu de culture complétement par du SVF ont une composition complexe et riche. Lors du premier contact entre le milieu environnant et la surface, de l'eau, des ions et des solutés de faible poids moléculaire s'adsorbent rapidement à la surface. L'adsorption de protéines ensuite est la résultante de l'ensemble de ces interactions solide-liquide. Les principes qui déterminent l'adsorption de protéines à un biomatériau incluent l'adsorption de monocouches de composés de faibles poids moléculaires, les propriétés de surface des protéines, la concentration des protéines dans le milieu environnant, leur coefficient de diffusion et les réactions de compétition qui s'établissent entre différentes protéines, l'effet de la nature de la surface du biomatériau pour la sélectivité d'adsorption des protéines. Plus généralement, les protéines ont tendance à se déposer très rapidement sur une surface. Les propriétés individuelles des surfaces<sup>109,110</sup>, et les propriétés spécifiques des protéines déterminent ensuite l'organisation de la couche de protéines adsorbées et la nature de cette couche définit à son tour la réponse des cellules sur ces surfaces<sup>111</sup>.

## 1.2. Greffage de peptides adhésifs

Au cours de ces dernières années, les travaux de Verrier *et al.*<sup>112</sup> ont conduit à des résultats encourageants sur l'influence d'un revêtement de peptides RGD sur les processus d'adhésion cellulaire de cellules ostéoprogénitrices. S. Verrier s'est particulièrement intéressée à l'effet de la séquence et de la structure (linéaire ou cyclique) de peptides contenant les acides aminés RGD sur l'adhésion cellulaire. Des surfaces ont été revêtues de protéines de la matrice extracellulaire et des essais d'adhésion cellulaire et d'inhibition avec des peptides (linéaires ou cycliques) contenant la séquence RGD ont montré des différences d'adhésion cellulaire suivant la nature des protéines de la matrice extracellulaire déposée sur la surface. En fonction de la séquence d'acides aminés et de la structure des peptides, jusqu'à 100 % d'inhibition de l'adhésion cellulaire ont été observés sur la vitronectine. Cependant, ce revêtement de surface correspond à une adsorption de protéines ou de peptides sur la surface. Bien que ce traitement ait permis aussi à S. Verrier *et al.* d'étudier l'expression de différents types d'intégrines à la surface des cellules ostéoprogénitrices, il ne constitue pas une approche suffisamment reproductible pour fournir des surfaces envisageables pour une application dans le domaine des biomatériaux. En effet, la réalisation de biomatériaux osseux nécessite d'avoir des surfaces adhésives promouvant la biointégration de la prothèse osseuse. De plus, la quantité de protéines adsorbées en surface reste inconnue. A long terme, des protéines ou des peptides adsorbés en surface et exposés à des solutions pourraient se désorber, se dénaturer et/ou s'échanger avec les protéines du milieu. C'est pour toutes ces raisons qu'un protocole de greffage robuste conduisant à des surfaces de peptides greffés de façon covalente était nécessaire.

Le greffage covalent de silanes préalablement au greffage de peptides a été introduit par Nanci *et al.*<sup>113</sup> et Porté *et al.*<sup>114</sup>. Ils ont montré que le greffage d'un peptide RGDC sur une surface silanisée par de l'APTES peut promouvoir l'attachement des cellules endothéliales humaines. L'attachement des HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) a été attribué aux peptides synthétiques greffés en surface, comme le montrent les résultats des tests d'inhibition compétitive présentés dans cet article. Cependant, l'observation par MFA de ces surfaces silanisées (préparées selon le protocole détaillé dans cette publication) a mis en évidence de très nombreux agrégats en surface (Figure 22).

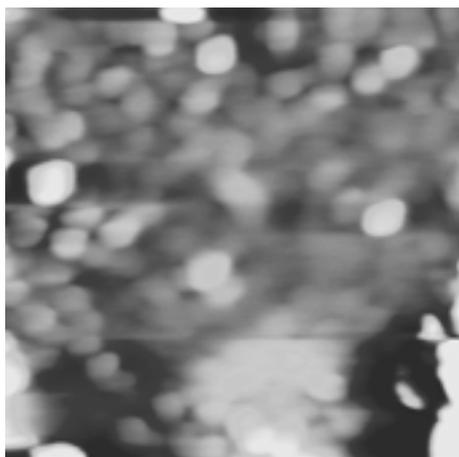


Figure 22. Image de surface enregistrée à l'air de silice silanisée par de l'APTES selon le protocole décrit dans l'article dont la référence est 114. Image:  $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m} \times 10\ \text{nm}$ , vitesse =  $4\ \mu\text{m/s}$ .

Une fois encore, une désorption dans le temps de ces silanes agrégés en surface peut être raisonnablement envisagée. Or dans le cas de biomatériaux, la composition moléculaire des surfaces doit être stable dans le temps. Afin de limiter la désorption de molécules au cours du temps et de contrôler l'état de la surface, nous nous sommes attachés à éliminer les agrégats présents à la surface par l'optimisation de ce protocole. De plus, il est difficile d'estimer à partir de cette étude si l'attachement des HUVEC est dû aux peptides greffés de façon covalente à la surface ou aux peptides greffés aux agrégats de silanes en surface. En effet, Maheshwari *et al.*<sup>115</sup> ont montré récemment que l'adhésion cellulaire est favorisée par la présence d'inhomogénéités de greffage de peptides RGD sur des domaines compris entre 10 et 50 nm.

### 1.3. Choix et description de protocoles de bioactivation des surfaces.

Ces nouvelles données expliquent le travail qui va être présenté par la suite. Deux stratégies ont été adoptées pour rendre le matériau bioactif :

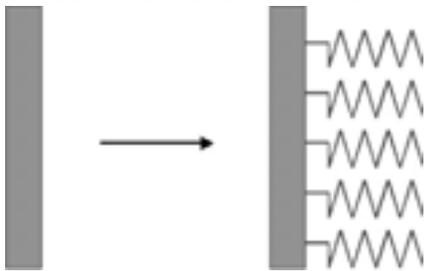
- l'adsorption de protéines adhésives sur une surface. De façon systématique, sur toutes les surfaces dont nous disposons (Thermanox<sup>®</sup>, silice, silice silanisée), une solution de milieu de culture complétée en SVF a été déposée sur chaque surface. Après 24h, les protéines du sérum se sont adsorbées sur la surface considérée. La Figure 21 met en

parallèle une surface de silice brute ou la même surface présentant des protéines du SVF adsorbées en superficie. L'effet de l'adsorption des protéines sur l'adhésion cellulaire sera abordé dans la dernière partie de cette étude.

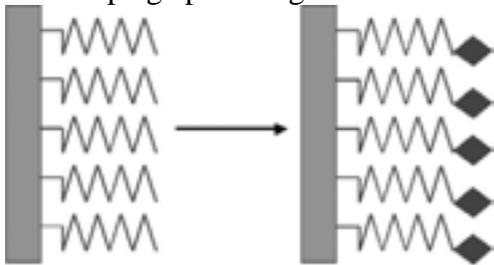
- le greffage de peptides adhésifs de type RGD. Un grand nombre de méthodes sont disponibles pour lier de façon covalente des biomolécules à un support solide<sup>116,117</sup>.

Le procédé adopté dans le cadre de cette étude est décrit Figure 23 : la surface de silice est tout d'abord modifiée par des molécules de silanes pour fournir des groupements réactifs (e.g.  $-NH_2$ ) à sa surface.

1. Pré-activation de la surface de silice par une réaction de silanisation



2. Couplage par un agent intermédiaire ou espaceur



3. Greffage de biomolécules

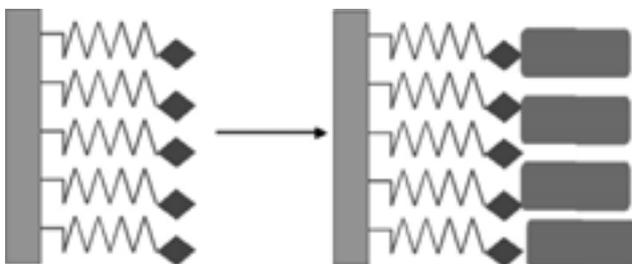


Figure 23. Représentation schématique de la méthode adoptée de greffage de biomolécules.

Les biomolécules sont attachées à la surface par l'intermédiaire d'un groupement chimique, appelé agent de couplage biofonctionnel<sup>118</sup>. Cet espaceur présente une structure et une conformation telles, par comparaison à d'autres espaceurs, qu'il offre davantage de degrés de liberté stérique à la surface de la silice pour la fixation spécifique de biomolécules, ce qui entraîne une liaison quasi-systématique avec le peptide contenant le motif RGD et l'acide aminé cystéine. Ceci est particulièrement vrai pour le greffage de petites biomolécules ; ce qui est le cas dans cette étude où les biomolécules sont des peptides terminés par les acides aminés RGD.

Nous nous sommes attachés à établir et à caractériser un protocole de greffage permettant d'obtenir des monocouches greffées en surface dépourvues d'agrégats (i.e. surfaces planes) et homogènes. L'origine de ces agrégats peut toujours provenir de l'adsorption de molécules à la surface mais aussi de la qualité du greffage des silanes. Améliorer le greffage des silanes est donc un pré-requis pour étudier l'effet d'un peptide sur l'adhésion cellulaire.

Nous proposons dans le cadre de cette étude la comparaison de deux protocoles de greffage de molécules de silanes en terme de rugosité et d'homogénéité de l'état de la surface. L'objectif était d'obtenir une monocouche d'APTES sur une surface de silice. Après une brève description de la procédure expérimentale et de l'effet sur la formation des agrégats d'APTES, l'homogénéité du greffage a été évaluée par des expériences de tribologie avec la MFA.

Nous décrivons ensuite le protocole de greffage des peptides et sa caractérisation physico-chimique. Le plus important concerne évidemment la présence et la distribution des groupements RGD à la surface de la silice pour réaliser des surfaces adhésives aux cellules ostéoprogénitrices.



## 2. Modification de surface par silanisation

La réaction de silanisation a été développée par Plueddemann E. P.<sup>119</sup>. Son application est largement utilisée comme par exemple pour la séparation de composés en chromatographie, pour rendre une surface hydrophobe ou pour fixer sur une surface des molécules ayant des propriétés spécifiques. Elle consiste à greffer de façon covalente un organosilane<sup>120</sup> (de formule générale  $R_nSiX_{(4-n)}$  où R est un radical organique et X un groupement facilement hydrolysable : -OH, -Cl, -OMe, -OEt ...) sur une surface minérale, la silice dans notre étude.

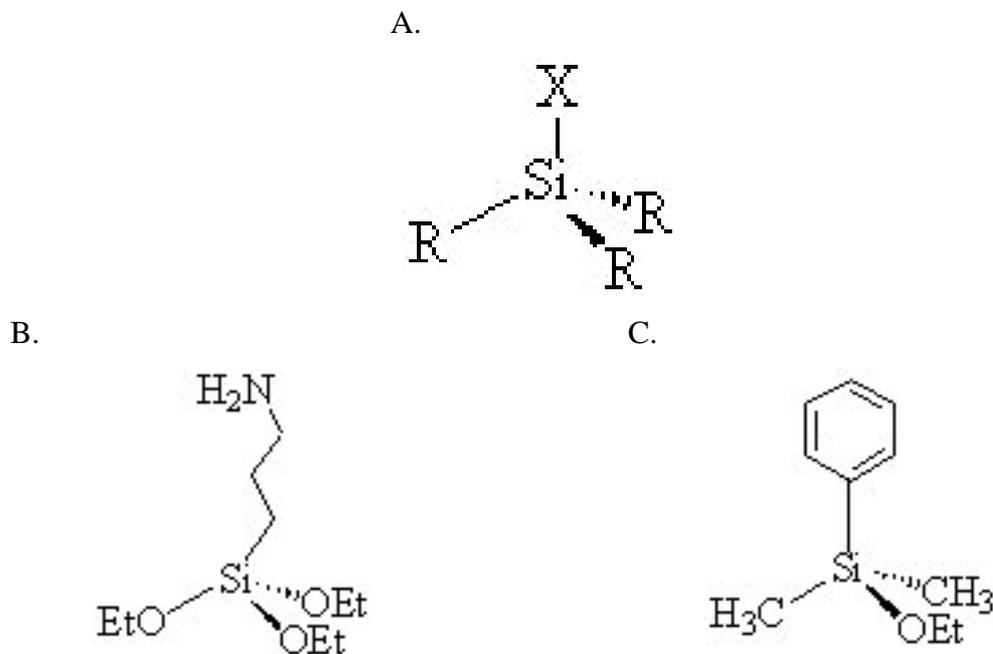


Figure 24. Structures des molécules de silanes greffées.

A. Organosilane. R est un radical organique et X est un groupement facilement hydroxylable.

B. 3-AminoPropyl TriEthoxy Silane (APTES)

C. Phenyl DiMéthyl Ethoxy Silane(PDMES).

Les silanes greffés (Figure 24. B. et C.) sont du 3-AminoPropyl TriEthoxy Silane<sup>121</sup> (APTES) ou du Phenyl DiMéthyl Ethoxy Silane(PDMES). Le PDMES est un composé monofonctionnel, qui ne peut conduire qu'au greffage d'une monocouche de ces silanes. Il a été utilisé uniquement pour comparer son hydrophobie et l'homogénéité de son greffage avec celui réalisé avec des molécules d'APTES. Il présente un groupement phenyl terminal, qui n'est pas réactif pour greffer un peptide ; à la différence de l'APTES qui présente une amine terminale.

Dans cette étude, deux protocoles de silanisation ont été utilisés. Dans un cas, le solvant où se déroule la réaction de silanisation est un solvant acide-aqueux (acétone/eau pH 3,5) et dans l'autre cas, un solvant anhydre (hexane anhydre). Ces deux protocoles ont été mis au point respectivement par S. Gauthier *et al.*<sup>122</sup> et par M. C. Porté-Durrieu *et al.*<sup>114</sup>

Bien que ce greffage donne lieu à de nombreuses applications, la réaction de silanisation reste une réaction difficile à maîtriser à cause du nombre important de paramètres à contrôler précisément<sup>123,124,125,126,127</sup>.

La présence (même à l'état de traces) de molécules d'eau joue un rôle crucial dans le mécanisme de réaction des organosilanes avec une surface d'oxyde<sup>128</sup>. Mais la nature et le nombre de fonctions hydrolysables jouent aussi un rôle important, de même que le pH, la concentration des silanes, la température et la nature du solvant.

Afin d'obtenir des surfaces planes et homogènes, nous nous sommes attachés à appliquer ces protocoles en re-définissant les concentrations des silanes, les températures de dégazage et de rinçage des surfaces greffées uniquement pour le second protocole, puis dans ces conditions, à suivre par différentes caractérisations physico-chimiques (mesures d'angle de contact, spectroscopie de photoélectrons X (XPS), spectroscopie infra-rouge, MFA) le greffage de ces molécules<sup>129</sup>.

## 2.1. Procédures expérimentales de greffage

Le protocole de greffage peut être divisé en trois étapes : un pré-traitement thermique de la surface de silicium, la silanisation de ces surfaces et leur « séchage ».

Dans le but d'obtenir des surfaces planes silanisées par de l'APTES, les protocoles de greffage et plus particulièrement le rôle spécifique des molécules d'eau en surface du silicium et dans la réaction de silanisation vont être détaillés. Ces protocoles ont été établis grâce à un suivi de la topographie des surfaces greffées par MFA (Figure 25).

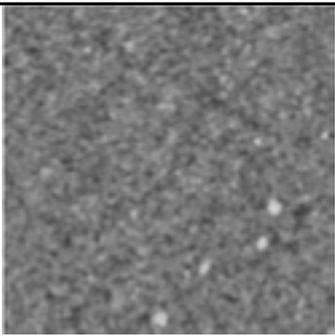
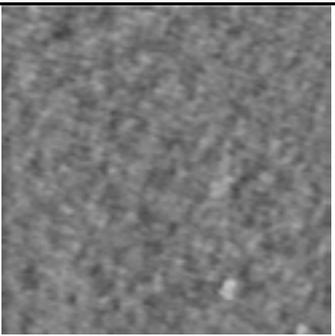
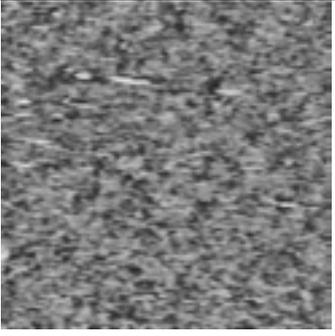
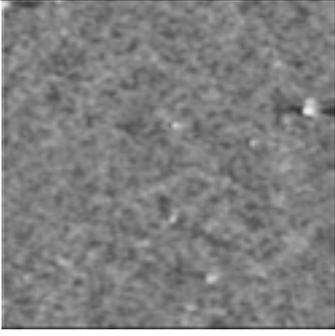
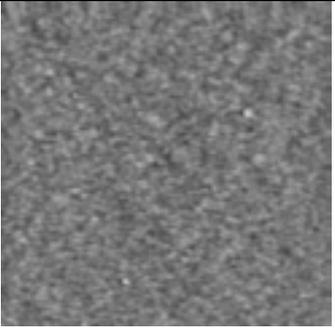
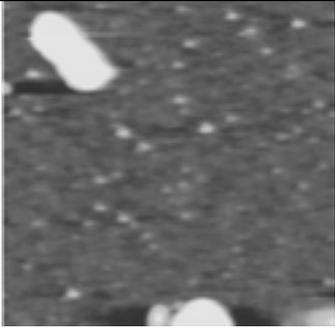
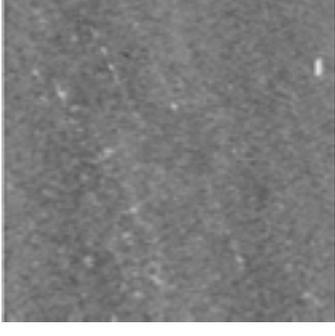
	Réaction dans un milieu aqueux	Réaction dans un milieu anhydre
Silice	 <b>A.</b> $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m} \times 3\text{ nm}$ à $2\mu\text{m/s}$	 <b>B.</b> $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m} \times 5\text{ nm}$ à $2\mu\text{m/s}$
Silice + PDMES	 <b>C.</b> $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m} \times 12\text{ nm}$ à $4\mu\text{m/s}$	 <b>D.</b> $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m} \times 3\text{ nm}$ à $4\mu\text{m/s}$
Silice + APTES	 <b>E.</b> $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m} \times 5\text{ nm}$ à $2\mu\text{m/s}$	 <b>F.</b> $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m} \times 5\text{ nm}$ à $6\mu\text{m/s}$   <b>G.</b> $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m} \times 5\text{ nm}$ à $4\mu\text{m/s}$

Figure 25. Images obtenues en mode contact. La différence entre les surfaces F et G réside dans leur mode de rinçage et de séchage, et dans les échelles d'enregistrement ( $XxYxZ$  et vitesse de balayage).

## a. Traitement thermique de la surface de silicium

La première étape consiste à traiter thermiquement la surface de silicium afin de contrôler le degré d'hydratation et d'hydroxylation des surfaces.

Il est bien établi que l'homogénéité du greffage dépend de la quantité d'eau présente à la surface de la silice<sup>130,131,132,133,134</sup>. Cette quantité d'eau varie suivant le type de silice étudiée, les traitements thermiques et le niveau d'hydroxylation de la surface. Scott et Traiman<sup>135</sup> ont mis en évidence au moins trois états des couches d'eau adsorbées à la surface d'un gel de silice conditionné à 23 °C dans une atmosphère à 50 % d'humidité. Les surfaces de silice sont recouvertes avec des couches d'eau à l'état liquide qui disparaissent autour de 80 °C et d'une ou deux couches d'eau à l'état solide fortement adsorbées à la surface. La Figure 26 schématise l'organisation probable de l'eau, à la surface de la silice, selon le modèle de Scott et Traiman<sup>135</sup>.

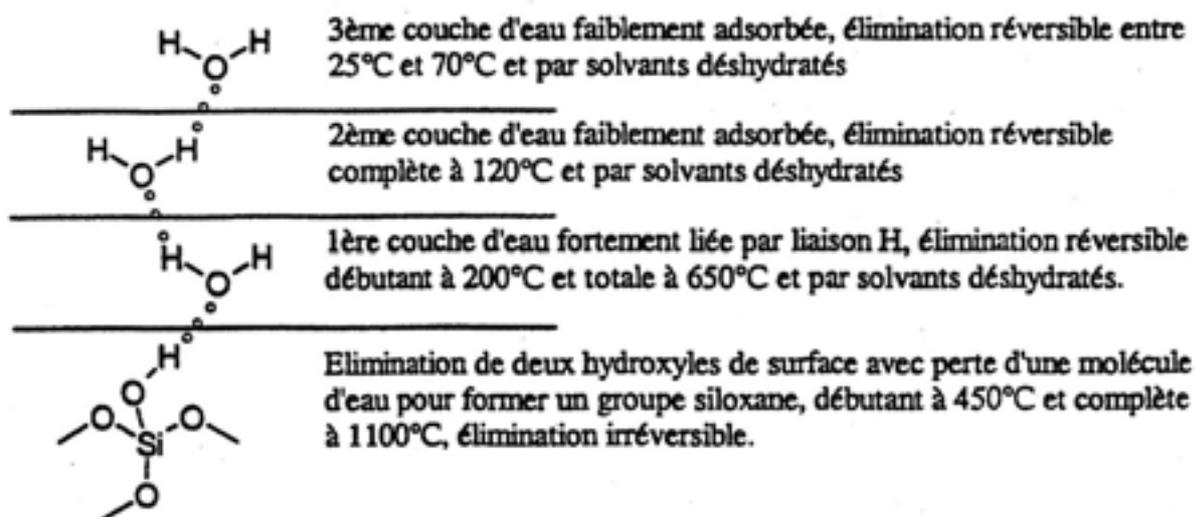


Figure 26. Représentation schématique des trois monocouches d'eau physisorbées sur la silice<sup>135</sup>.

Dans cette étude, le greffage des silanes selon le protocole de silanisation 1 est réalisé sur une surface de silice comportant plusieurs couches d'eau dans des conditions ambiantes (Figure 27. B.). Pour le second protocole de silanisation, il est attendu que les molécules de silanes se greffent directement sur une surface dépourvue de molécules d'eau en surface (Figure 27. C.). En effet, dans le but d'éviter la présence d'eau physisorbée sur la silice, les surfaces, une fois nettoyées, sont dégazées à 150 °C sous vide à  $10^{-5}$  Torr, pendant 20 h<sup>136</sup>.

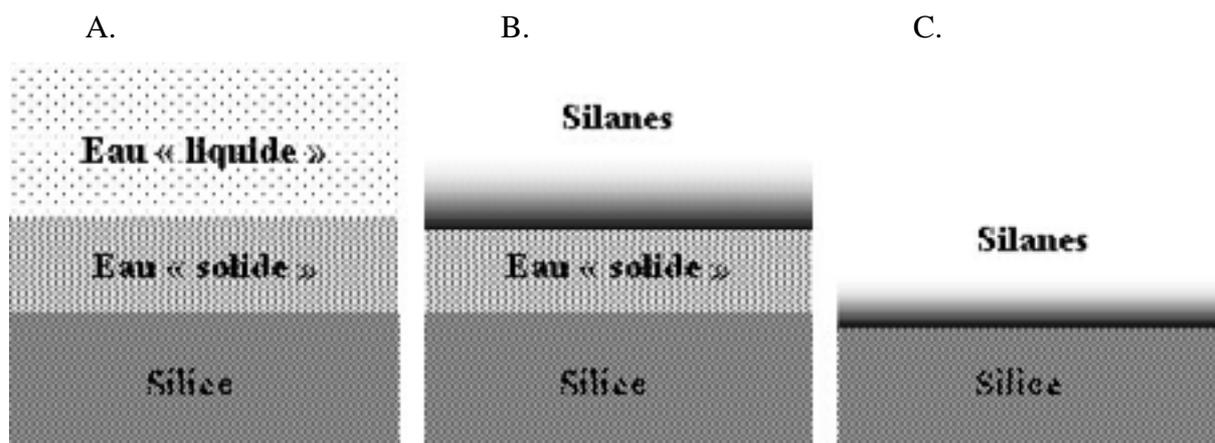


Figure 27. Caractéristiques attendues des couches d'eau à la surface de silice suivant le protocole de silanisation utilisé.

A. Etat initial de la surface de silice.

B. Silanisation suivant le protocole 1.

C. Silanisation suivant le protocole 2.

Il est à noter que les temps précisés, quel que soit le protocole de greffage, sont strictement respectés afin d'assurer une bonne reproductibilité entre les différentes préparations.

## b. Silanisation

La surface de silice ainsi pré-traitée thermiquement est immergée dans la solution de silanes ; à la concentration et dans le solvant approprié au protocole, ainsi que dans des conditions ambiantes ou sous une atmosphère d'argon contrôlée.

La quantité de silanes déposée à la surface est fonction de la concentration de silanes en solution. Une concentration de silanes de  $1,2 \cdot 10^{-3}$  M a été définie à partir d'essais de préparation de surfaces avec différentes concentrations, et cette concentration a été utilisée, quel que soit le protocole de silanisation appliqué.

### *i. Réaction dans un solvant aqueux : Protocole de silanisation 1*

Dans un solvant aqueux, les silanes s'adsorbent sur la surface hydratée de la silice (Figure 28), ce qui entraîne l'hydrolyse des groupements facilement hydrolysables X, portés par l'atome de silicium. Puis, dans le cas de silanes trifonctionnels comme l'APTES, les

molécules subissent une condensation entre eux et/ou à la surface de silice par la création de ponts hydrogènes entre hydroxyles. La condensation des silanols provoque la formation d'un réseau de molécules lié à la surface de façon covalente. Les molécules greffées sont polymérisées horizontalement et verticalement. Donc, un réseau tri-dimensionnel de polymères de silanes est formé sur la surface de silicium. La réaction de polymérisation est difficile à contrôler et des couches d'épaisseur variable sont obtenues.

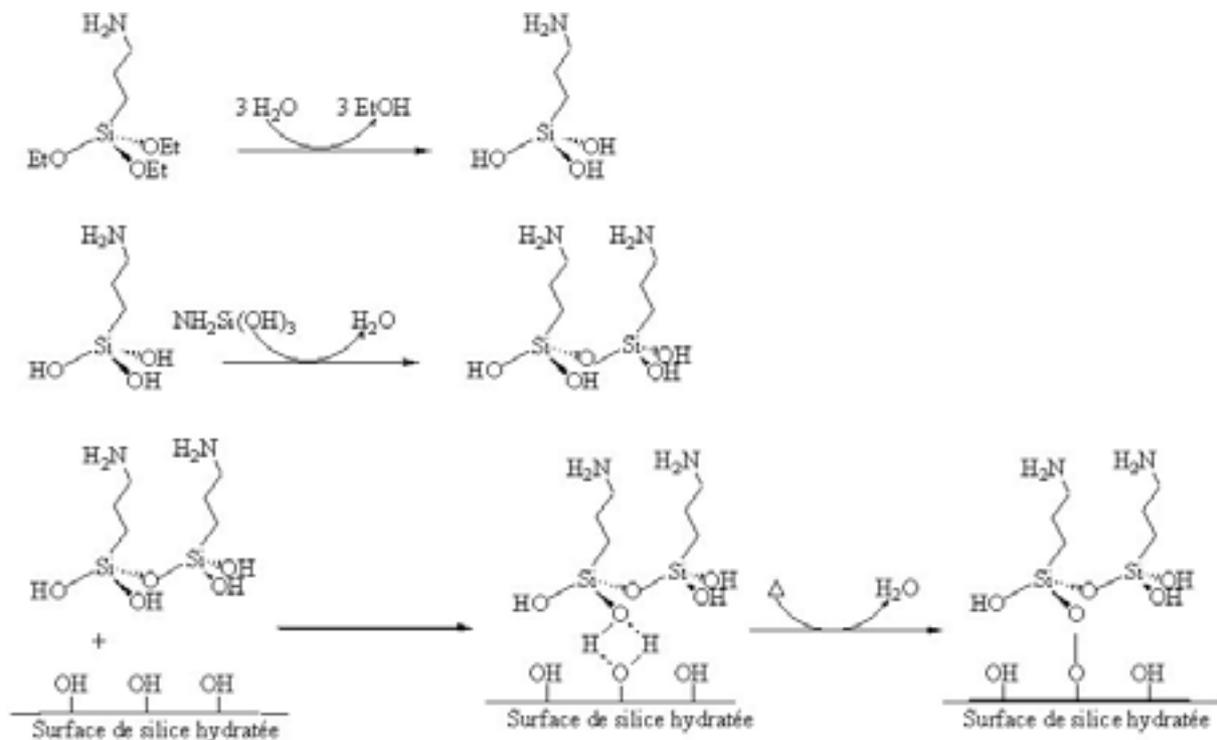


Figure 28. Equations de la réaction d'hydrolyse d'APTES, et de la réaction de condensation entre molécules d'APTES ou avec la surface de silice hydratée.

Son contrôle peut être amélioré par l'addition d'une quantité variable de solvant organique comme l'acétone.

De plus, l'hydrolyse des alcoxysilanes peut être catalysée par l'addition d'acide. En solution, l'addition d'acide accélère l'hydrolyse et décélère la réaction de polymérisation.

L'orientation de la chaîne d'aminopropyle (l'amine peut être soit près de la surface soit pointer loin de la surface de silicium) est déterminée par la présence d'eau dans la réaction. Kallury<sup>137</sup> a démontré que l'addition d'une base dans la réaction réduit la quantité de groupement amine en interaction avec la surface.

Il est à noter que, dans le cas de silanes monofonctionnels comme le PDMES, la réaction de condensation des silanes est limitée et elle ne peut pas entraîner la polymérisation des molécules entre elles.

Quelles que soient les molécules de silanes utilisées (APTES ou PDMES), le greffage forme une surface plane et continue, comme le montrent les Figure 25. C. et E.

### ii. Réaction dans un solvant anhydre : Protocole de silanisation2.

La modification d'une surface par des alkoxyxilanes peut être réalisée dans des conditions anhydres: le solvant utilisé est un solvant organique anhydre et la surface de silicium est deshydratée. L'hydrolyse provoquée par les molécules d'eau présentes à la surface de la silice ou par l'eau rajoutée au milieu de silanisation comme dans le protocole de silanisation 1 est empêchée. Deux mécanismes de réaction de silanisation ont été proposés.

Dans le premier mécanisme, la liaison chimique entre les silanes en solution et la surface se produit par une condensation directe des groupements alkoxy portés par le silane et les silanols de la surface (Figure 29).

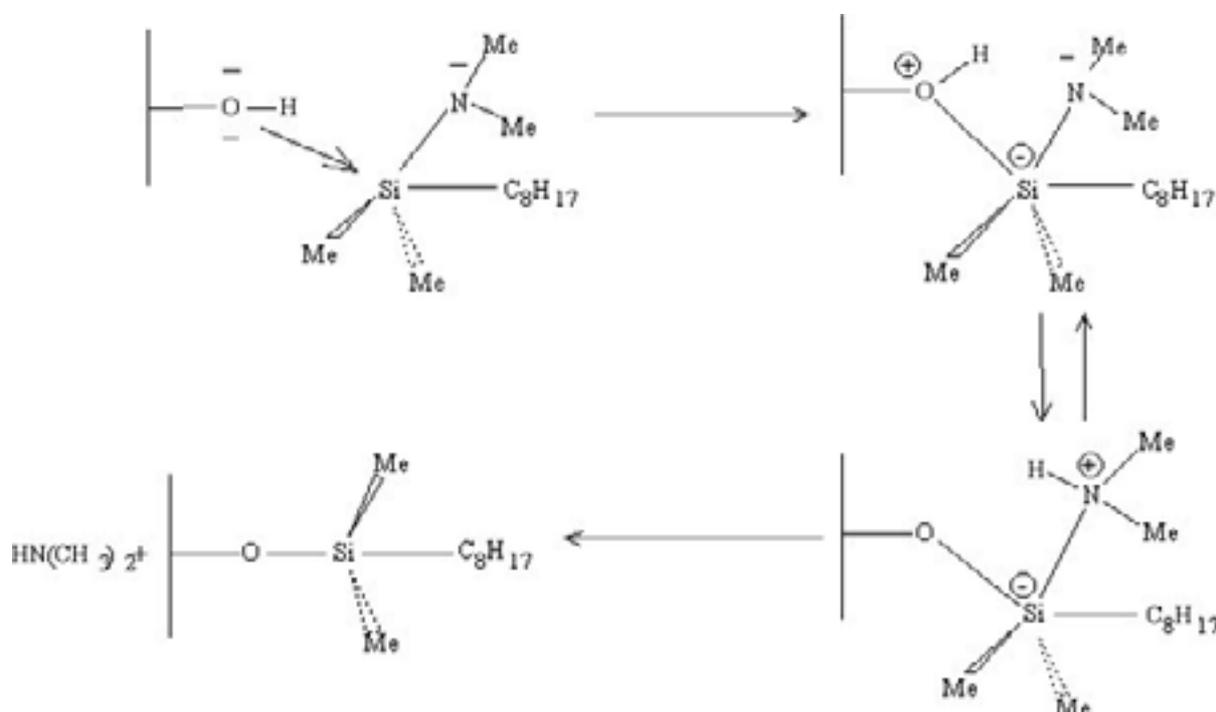


Figure 29. Mécanisme proposé par une attaque nucléophile du groupement silanol faisant intervenir le silicium de l'organosilane dans un état de transition pentavalent, ce qui entraîne la migration du proton du groupe hydroxyle sur l'atome d'azote<sup>138</sup>.

Il faut rajouter que, dans le cas des aminosilanes comme l'APTES, la fonction amine contenue dans la chaîne organique peut être un catalyseur (Figure 30). La réaction subit une auto-catalyse. La condensation est directe, même si les conditions sont complètement anhydres et si la silice n'a pas d'eau adsorbée à sa surface. C'est le principe de réaction proposé dans le second mécanisme.

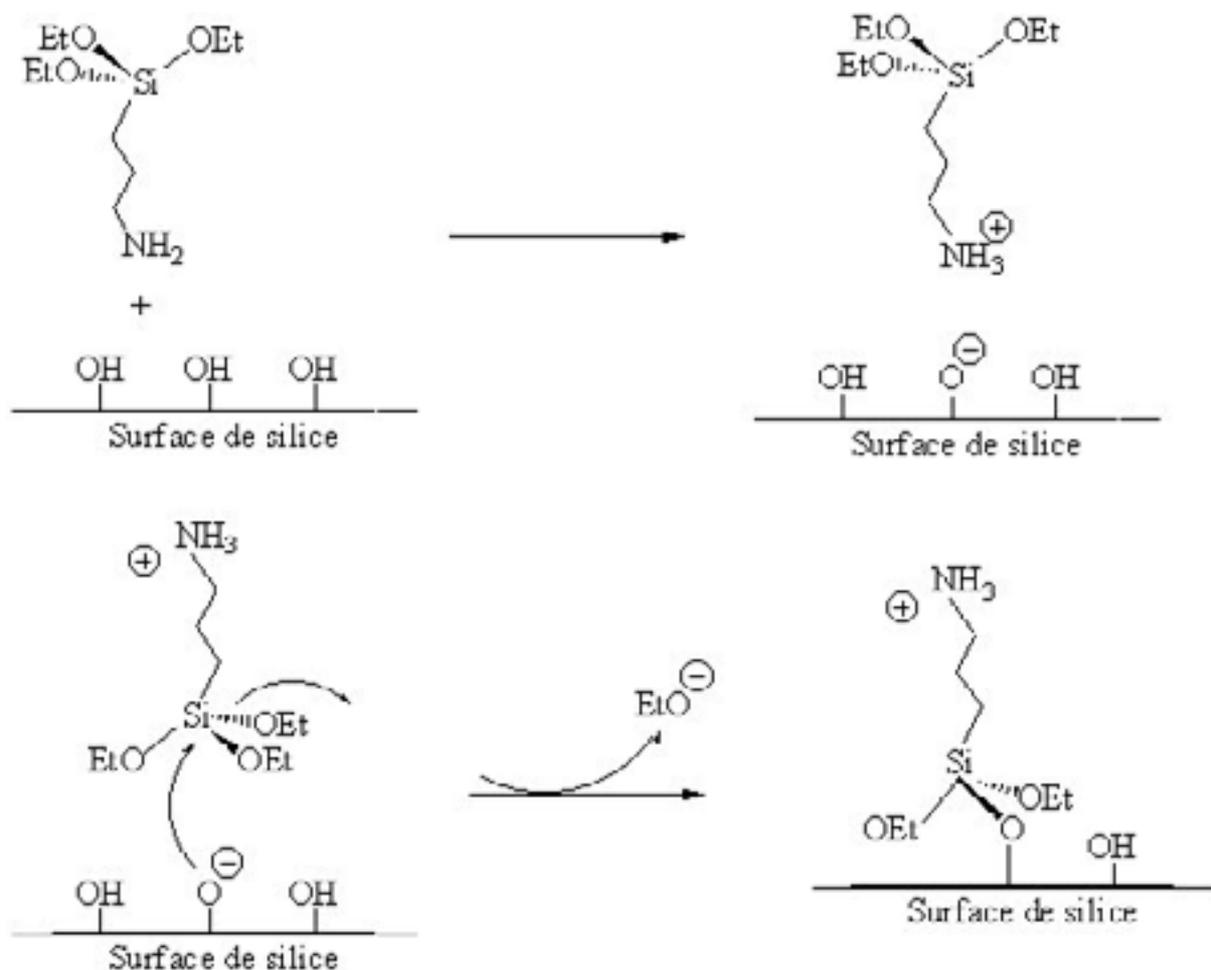


Figure 30. Equations de la réaction de condensation entre molécules d'APTES et la surface de silice dans un solvant anhydre<sup>144</sup>.

Dans le cas du greffage de PDMES, les surfaces greffées sont planes et continues (Figure 25. D.). En effet, un silane monofonctionnel ne peut former qu'une monocouche s'il se greffe à une surface. Ce n'est pas le cas pour le greffage de l'APTES. Un excès d'agrégats d'APTES est observé sur la surface (Figure 25. F.). Il peut être dû à des chaînes non correctement greffées et enchevêtrées. Ces agrégats ont été éliminés grâce à un séchage particulier des surfaces, mis au point au cours de la troisième étape de ce protocole.

### c. Les surfaces sont rincées puis séchées.

Quelle que soit la préparation utilisée, les surfaces greffées sont rincées dans leur solvant de silanisation et séchées selon les protocoles détaillés en annexe.

Dans le cas du greffage d'APTES en condition anhydre, il faut rincer excessivement les surfaces et les sécher manuellement avec un papier. Les surfaces, après avoir été placées sous agitation dans de l'hexane anhydre, vont être incubées dans du méthanol pendant 24 h. Cette incubation est réalisée dans un montage soxhlet<sup>139</sup>, dans des conditions ambiantes. Ensuite, préalablement au dégazage des surfaces à 100 °C sous vide à  $10^{-5}$  Torr, les surfaces sont séchées avec du papier de type « Kimwipes ». Cette étape est indispensable pour complètement éliminer les agrégats présents en surface et pour mieux contrôler la reproductibilité de ce greffage d'APTES en solution anhydre. Les surfaces finalement obtenues sont planes comme le montrent la Figure 25. G. et le Tableau 5 qui indique les rugosités des différentes surfaces.

		Angle de contact moyen (°)	Ecart-type moyen (°)	Rugosité (nm/ $\mu\text{m}^2$ )
Solution acide aqueuse	Silice	16	3	0.3
	PDMES	39	3	0.6
	APTES	26	2	0.4
Solution anhydre	Silice	55	4	0.3
	PDMES	62	8	0.4
	APTES	74	3	0.3

Tableau 5. Mesures d'angle de contact et de rugosité sur différents échantillons.

## 2.2. Caractérisation physico-chimique du greffage

Des surfaces planes ont été obtenues quelles que soient les molécules greffées et quel que soit le protocole de préparation des surfaces. Afin de contrôler les états de surface obtenus, une caractérisation physico-chimique par mouillabilité, XPS et MFA a été réalisée.

## a. Mouillabilité

Les mesures d'angle de contact avec de l'eau évoluent suivant les modifications des surfaces dues aux traitements successifs (Tableau 5).

Le résultat de ces mesures montre qu'après le nettoyage selon le protocole de silanisation 1, la surface de silice est hydrophile, tandis que pour le nettoyage selon le protocole de silanisation 2, la surface de silice est hydrophobe. L'augmentation significative de l'angle de contact (de 16° à 55°) peut être attribuée à l'étape de nettoyage puis de dégazage de la surface de silice et à l'élimination de l'eau physisorbée sur la surface.

La valeur de l'angle de contact est de 26° pour l'APTES greffé sur une silice hydrophile et de 74° pour une surface moins hydrophile. D'après ces résultats, il apparaît clairement une modification du caractère hydrophile du matériau avec le greffage. Les surfaces où l'APTES a été greffé sont toujours plus hydrophobes que les surfaces de silice de référence.

Comparé aux mesures réalisées sur les surfaces où le PDMES a été greffé (39° et 62° respectivement), l'augmentation des valeurs d'angle de contact par rapport à la surface de silice de référence dépend de la structure chimique des molécules greffées elles-mêmes.

Bien que les surfaces greffées d'APTES présentent des groupements amines terminaux, l'hydrophobie de ces surfaces (quel que soit le protocole de greffage) est très proche de celle où le PDMES a été greffé. Les groupements amine de l'APTES pourraient être orientés vers la surface de silice et les parties exposées de ces molécules en surface seraient donc les groupements CH<sub>2</sub> i.e. hydrophobes.

## b. XPS

Le greffage de multicouches d'APTES par le protocole de silanisation 1 a déjà été clairement établi<sup>140,141</sup>. Il n'est pas repris dans cette étude. Il est dû à la polymérisation des molécules d'APTES entre elles à cause de la présence d'eau dans le milieu de silanisation.

Par contre il a fallu démontrer par XPS que le protocole de greffage selon le protocole de silanisation effectué en milieu anhydre conduit au greffage d'APTES.

Les résultats quantitatifs relatifs à l'analyse XPS de la surface greffée d'APTES sont présentés dans le Tableau 6. Les valeurs ont été déterminées et calculées à partir de l'aire totale respective des pics C1s, O1s, Si2p et N1s. Il est à noter la quantité de carbone sur toutes les surfaces de l'ordre de 18%, qui est due à une pollution carbonée normale des surfaces<sup>142</sup>. D'après ce premier résultat, il semble que le procédé de nettoyage utilisé amène à une surface exempte de toute pollution carbonée. Après greffage de l'APTES, ce tableau indique, par

comparaison des échantillons de silicium et de celui où il est attendu le greffage d'APTES, la présence d'azote en surface à une hauteur de 1.3%. Il est également à noter l'augmentation du pourcentage de carbone (25%) et une augmentation de silicium (dû aux molécules d'APTES. Le rapport du pourcentage de silice oxydée sur celui d'azote obtenu expérimentalement (0.54) correspond approximativement à celui attendu théoriquement (1) compte tenu de la possibilité de perte du groupement amine de l'APTES comme proposé par Nanci *et al.*<sup>113</sup>.

Echantillon	C	O	Si	N	
			Substrat	Oxydé	
SiO <sub>2</sub> brut	18,7	29,1	43,0	8,5	0
APTES	25,2	28,6	35,7	9,2	1,3

Tableau 6. Composition atomique (en pourcentage) obtenue par XPS, SF Scofield pour différentes surfaces greffées.

Ces résultats sont attribués aux APTES greffés à la surface et permettent de conclure au greffage de l'APTES selon un protocole de silanisation en milieu anhydre.

### c. MFA

#### i. Topographie de la surface

Le greffage de multicouche d'APTES par le protocole de silanisation 1 a déjà été clairement établi par MFA en mode « tapping »<sup>141</sup>.

Dans le cas du second protocole de silanisation, les résultats d'XPS ont montré le greffage des molécules d'APTES. L'épaisseur de la couche d'APTES greffée à la surface de la silice a ensuite été mise en évidence par MFA. Une force externe a été exercée par la sonde du MFA sur la surface silanisée à la température de 100°C jusqu'à sa dégradation.

L'échantillon d'APTES greffé sur de la silice a été préalablement chauffé à 100°C pendant plusieurs jours. Ensuite, la surface est frottée par des balayages successifs de la pointe du MFA pendant 2h sur une zone de 100 nm x 100 nm. Une force externe est appliquée par la pointe sur la surface. Cette même zone est enfin observée sur une aire de 1 µm x 1 µm puis de 3 µm x 3 µm, avec une force extérieure appliquée plus faible (Figure 31. A.). Au centre de l'image, un « trou » de forme carré de 100 nm de côté apparaît. Le

frottement de la surface par la pointe a dégradé le greffage d'APTES. Dans ces conditions, et grâce aux résultats d'XPS qui permettent d'affirmer que la surface observée est une surface de silice silanisée par l'APTES, le « trou » carré de 100 nm x 100 nm correspond à la surface de silice. La profondeur de ce trou est de 0.5-0.6 nm (Figure 31. B.). C'est la hauteur attendue pour une monocouche d'APTES greffée sur de la silice<sup>143,144</sup>.

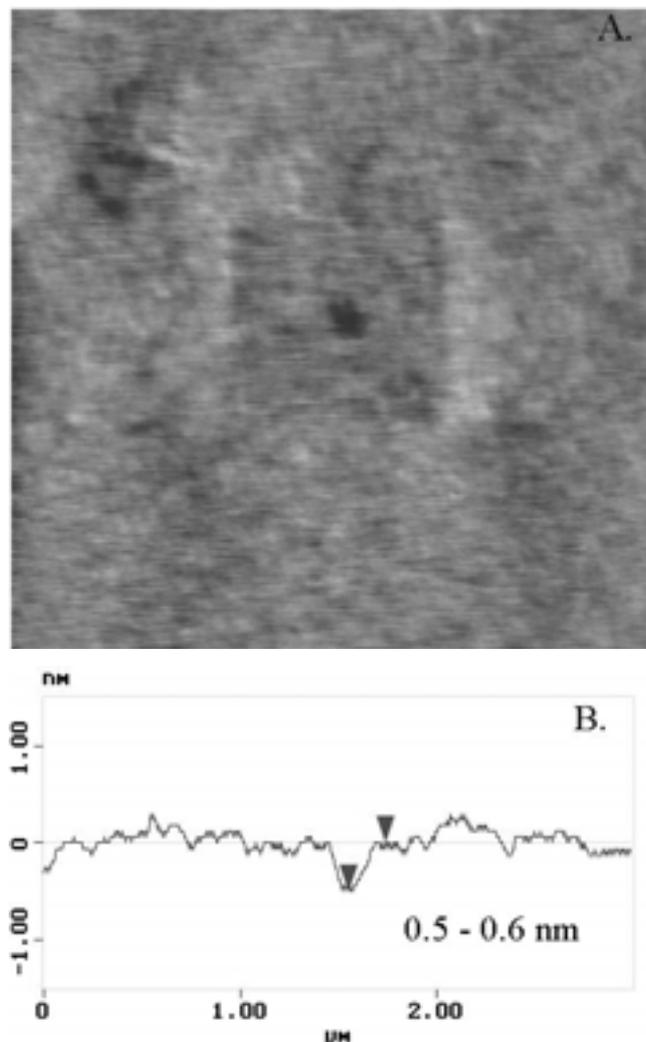


Figure 31. APTES greffé sur une surface de silice dans un milieu anhydre.

A. Image:  $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m} \times 2\text{nm}$ . Cette image a été obtenue après chauffage progressif de l'échantillon jusqu'à  $100\ ^\circ\text{C}$  pendant plusieurs jours. La surface de l'échantillon était plane et homogène. Une zone réduite à une taille de  $100\text{nm} \times 100\text{nm}$  a tout d'abord été observée pendant 2h avec une force externe appliquée élevée. Un trou a été créé, suggérant que les molécules d'APTES greffées ont été enlevées.

B. La profondeur mesurée du trou est de  $0.5 - 0.6\ \text{nm}$ . La section correspond à la ligne noire sur l'image. Cette observation confirme qu'une monocouche d'APTES a été greffée à la surface de la silice.

Cette expérience nous permet de conclure que le greffage de l'APTES dans des conditions anhydres s'est bien effectué sur une surface de silice hydrophobe et qu'il conduit à un greffage homogène et non rugueux d'APTES, d'une épaisseur qui peut être assimilée à celle d'une monocouche.

## *ii. Tribologie à différentes températures*

### **Généralités sur le frottement**

Depuis le début de la MFA, il est bien connu que ce microscope est un appareil de force qui produit des images contenant une information mécanique (Chapitre 1) et qui, en mode contact à l'air, peut être considéré comme un nanofrotteur. En effet, le système pointe-levier du MFA est en contact avec une surface, et la pointe présente la particularité d'un glisseur normal, mais avec une taille de pointe et une détection de forces faibles. Sur la pointe, trois forces agissent : l'adhésion, la force normale  $P$  et la force tangentielle de frottement  $F$ . La force de frottement correspond à une résistance à un mouvement s'exerçant entre deux corps en contact. Les deux corps dans le cas de la MFA, sont la pointe et la surface.

Lorsque le glisseur (la pointe du microscope) et la surface sont mis en mouvement l'un par rapport à l'autre, c'est la force de frottement statique qui intervient.

Lorsque les surfaces glissent l'une sur l'autre et qu'un régime stationnaire de glissement à une vitesse donnée est maintenu, c'est la force de frottement dynamique qui intervient. Cette force a pour valeur  $F = \mu P$  ;  $\mu$  étant le coefficient de friction (Admontons, 1699). Plusieurs tentatives ont été effectuées pour tenter de prendre en compte la force d'adhésion. Nous nous limiterons dans ce travail à une combinaison linéaire de la force normale et de la force adhésive :  $F = \mu[P + F_{adh}]$ . Ceci est vrai pour des expériences réalisées à l'air. Si elles sont effectuées en milieu liquide avec un milieu de constante diélectrique élevée, la force d'adhésion  $F_{adh}$  est nulle. Quand la force appliquée par la pointe est minimum, aucune force de frottement ne s'exerce.

### **Résultats et discussion sur la tribologie**

Afin d'évaluer la tenue mécanique des surfaces modifiées, deux surfaces greffées selon chaque protocole avec des molécules d'APTES ont été frottées avec une pointe de MFA.

L'état de ces surfaces greffées et la stabilité du greffage sont évalués par des études tribologiques, qui ont été effectuées pour chaque condition de greffage des molécules d'APTES et à deux températures différentes (à 30 °C et à 100 °C), selon un protocole détaillé dans le chapitre du « matériel et méthodes ». Dans le but de mettre en évidence une modification de la couche greffée (suivant les deux protocoles de silanisation), nous proposons de mesurer les forces de frottement entre la pointe du MFA et la surface du matériau tout d'abord à 30 °C puis à 100 °C. Cette température maximale a été définie expérimentalement à partir des résultats de tribologie eux même. C'est ce qui va être montré par la suite.

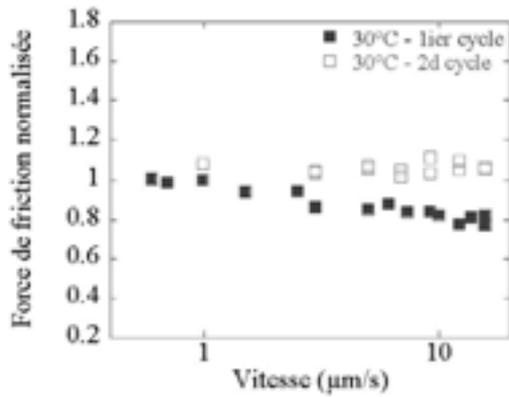
Pour un échantillon donné, une première mesure est effectuée à 30 °C puis à 100 °C. La température est ensuite abaissée à 30 °C (c'est le second cycle de température). Une autre expérience de tribologie est réalisée et les résultats sont comparés avec ceux initialement établis avant chauffage à 100 °C.

A température ambiante, quel que soit le protocole de préparation des surfaces utilisé, la force latérale est inversement proportionnelle au logarithme de la vitesse de balayage de la pointe du MFA (Figure 32. A. C.). La force de friction décroît quand la vitesse de balayage de la pointe augmente. Cette décroissance pourrait être attribuée à un comportement viscoplastique. Mais, d'une expérience à l'autre, la pente de la force de friction normalisée prenant en compte la vitesse de balayage de la pointe varie. Cette variation pourrait être attribuée à des molécules de silanes qui seraient mal greffées ou polymérisées sur la surface d'APTES greffés et qui seraient enlevées par le passage de la pointe du MFA. Les différences détectées par les études tribologiques entre deux échantillons pourraient être dues à une condensation spécifique des silanes. Cet effet observé à 30 °C par des études tribologiques entre différents échantillons n'est pas significatif, indiquant que le comportement de ces couches analysées par tribologie ne permet pas de discriminer une différence entre les processus de greffage.

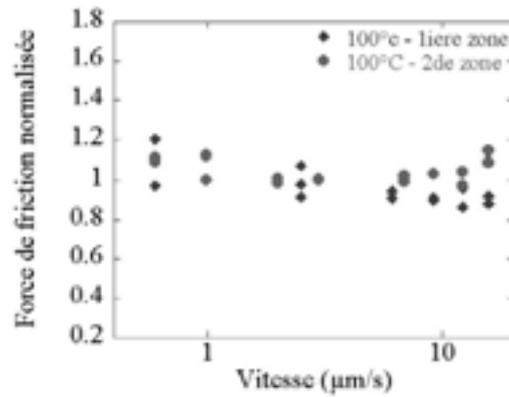
La stabilité de ces différents échantillons a ensuite été évaluée par des études tribologiques à haute température (Figure 32. B. et D.).

Dans le cas du greffage d'APTES sur une surface de silice préparée selon le second protocole, la force latérale est indépendante du logarithme de la vitesse de balayage de la pointe à 100 °C. Ce comportement a toujours été observé (Figure 32. D.). La force de frottement mesurée à 30 °C lors d'un second cycle de température est représentée sur la Figure 32. C. Elle a le même comportement que celle observée à température ambiante.

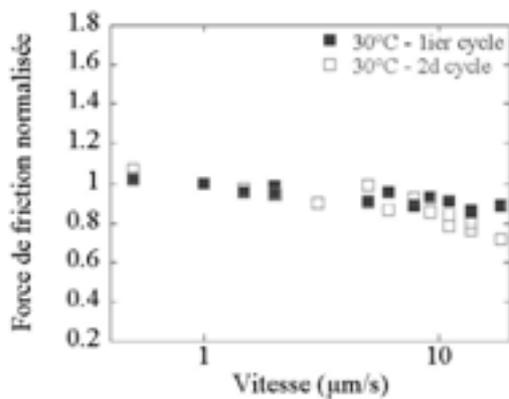
**A. APTES greffés en milieu acide-aqueux**



**B. APTES greffés en milieu acide-aqueux**



**C. APTES greffés en milieu anhydre**



**D. APTES greffés en milieu anhydre**

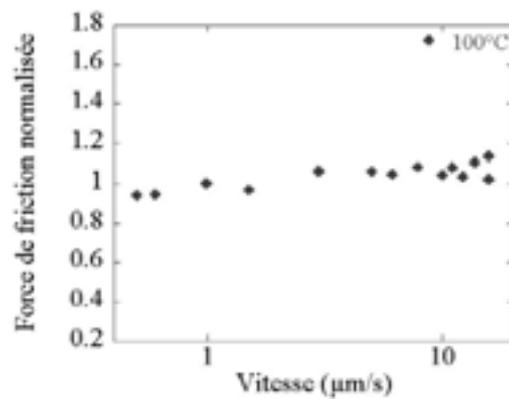


Figure 32. Graphes à différentes températures des forces de friction normalisées en fonction du logarithme de la vitesse de la sonde du MFA sur des surfaces d'APTES greffées sur une surface de silice en milieu acide-aqueux (A et B) ou en milieu anhydre (C et D)

Les températures sont de 30 °C avant et après un cycle de température (A et C) et de 100 °C (B et D). La force externe appliquée par la sonde est nulle dans tous les cas et pour chaque échantillon. A chaque vitesse, 10 mesures de force de friction ont été moyennées et la force de friction a été normalisée à la force de friction observée à la vitesse de 1 µm/s.

Puisque aucun changement n'a été montré à deux températures différentes, cette étude tribologique indique que l'homogénéité du greffage de la monocouche n'est pas altérée par le chauffage.

Il en va différemment pour un échantillon d'APTES greffé selon le protocole de préparation 1. A 100 °C, plusieurs domaines sont observés : la force de frottement mesurée est différente selon l'aire de microdomaine spécifique considérée (Figure 32. B.). Les points sont plus dispersés que ceux relevés à 30 °C. Contrairement à ce qui a été observé pour la préparation selon le protocole de greffage 2, le cycle de température modifie le comportement tribologique de la surface greffée. Cette conclusion est obtenue par comparaison des comportements tribologiques des surfaces greffées selon les deux protocoles. Non seulement des données dispersées sont observées à 100 °C mais, de plus, un changement de dépendance de la vitesse est observé quand la surface est refroidie à 30 °C (Figure 32. A.).

En conséquence, la préparation d'une surface d'APTES selon le protocole de greffage 1 apparaît moins stable que celle préparée selon le protocole de greffage 2.

La reproductibilité de ces résultats a été vérifiée sur plusieurs préparations.

#### d. Choix du protocole de silanisation

Dans ce chapitre, deux méthodes de greffage d'APTES sur de la silice ont été testées. Il a été démontré que quel que soit le protocole de greffage, les surfaces sont planes. La stabilité des greffages a été étudiée en chauffant les surfaces à 100 °C pendant plusieurs jours. Les résultats ont montré que le greffage en milieu anhydre est plus homogène et stable, avec peu d'agrégats d'APTES en surface, que le greffage en milieu acide-aqueux. De plus, les résultats ont montré qu'en milieu anhydre, une monocouche d'APTES est greffée. Ce protocole de greffage fournit les surfaces adéquates pour envisager le greffage de peptide RGD grâce à un agent intermédiaire sur une surface d'APTES greffée sur de la silice.

### 3. Greffage de peptides RGD terminés par une cystéine

La biofonctionnalisation d'une surface par des peptides nécessite de conserver leur bioactivité optimale. Cette bioactivité est évaluée dans un second temps, par la réponse des cellules à la surface de ces matériaux. Il faut cependant préciser que :

- le procédé de greffage des peptides ne doit pas les dénaturer ou les inactiver.
- Leur orientation ou leur configuration spécifique est un point crucial qui peut rehausser leur interaction avec les cellules.
- La densité de surface des peptides doit être suffisamment élevée<sup>145</sup>.
- La distance entre les espèces bioactives et la surface de silice doit permettre l'accessibilité, la flexibilité et l'ajustement des peptides RGD aux intégrines cellulaires. Une distance minimale critique entre la partie bioactive des peptides et la surface de la silice a été évaluée à 3.0-3.5 nm pour induire la biointégration des implants osseux revêtus de peptides<sup>146</sup> et la prolifération d'ostéoblastes<sup>147</sup>. C'est pourquoi les surfaces silanisées ont été fonctionnalisées par deux peptides: le peptide RGDC, qui contient la séquence minimale critique reconnue par les intégrines cellulaires et le peptide DGRAFVLC de longueur différente (Figure 33).



La fonction ester succinimide réagit avec le groupement amine de l'APTES (Figure 35).

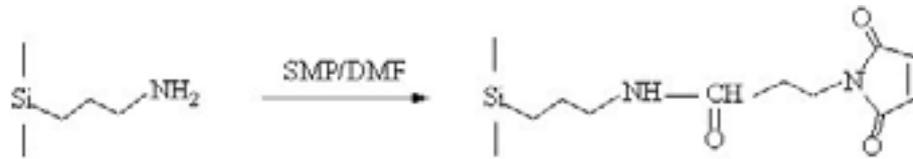


Figure 35. Schématisation du greffage de l'espaceur bifonctionnel SMP sur une surface silanisée par de l'APTES.

L'immobilisation du peptide terminé par une cystéine (Figure 33) se fait ensuite par l'intermédiaire du groupement thiol de la cystéine qui agit sur le groupement maléimide de l'espaceur (Figure 36)<sup>39,40</sup>.

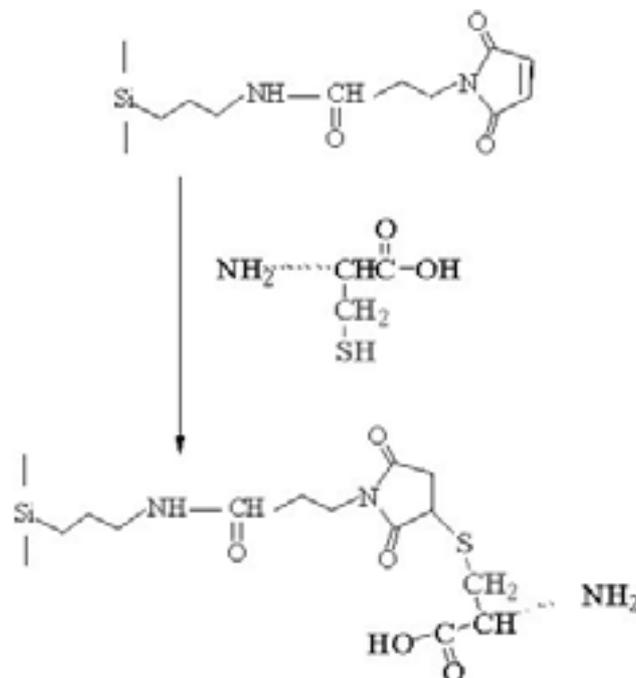


Figure 36. Schématisation du greffage de peptides RGD contenant un motif cystéine.

Les avantages de cette méthode de greffage sont multiples :

- Cette méthode n'est pas limitée aux espaceurs comprenant la fonction maléimide. Il en existe une grande variété. D'autres espaceurs comportant une combinaison à la fois des fonctions ester succinimide (ou hydrazide) et maléimide (ou disulfide) peuvent être

utilisés. Shriver-Lake *et al.*<sup>118</sup> ont comparé neuf espaceurs hétéro-bifonctionnels différents par la réactivité de leur groupement, leur longueur, la rigidité de la molécule et par leur capacité à fixer des anti-corps. Ils n'ont pas mis en évidence de différences de réactivité entre ces espaceurs et le greffage de biomolécules. Par conséquent, de nombreuses biomolécules possédant différents résidus réactifs peuvent être greffés par cette méthode.

- Les réactions peuvent être réalisées à température ambiante et dans des solvants organiques qui sont des conditions favorables pour greffer des biomolécules.
- La densité de greffage de peptides est grande<sup>148</sup>. Elle peut s'élever jusqu'à 20 pmol/mm<sup>2</sup>.
- Les réactions sont spécifiques. Aucune réaction de polymérisation ne se produit. La réaction entre le groupement maléimide et le thiol domine, et les réactions latérales, maléimide/amine par exemple ne sont pas en compétition.

## 3.2. Caractérisation physico-chimique du greffage du peptide RGDC

### a. Mouillabilité

Les angles de contact de l'eau sur la surface de silice fonctionnalisée par le peptide RGDC ont été mesurés. Une fois le peptide RGDC greffé, la surface devient hydrophobe puisqu'elle présente un angle de contact de 75 ° +/- 2° (Tableau 7) comparativement à un angle de 55 ° +/- 4° mesuré sur une surface de silice. L'hydrophobie de la silice est toujours modifiée : elle augmente après chacune des étapes du greffage.

De plus, pour chaque matériau, 5 surfaces préparées de façon indépendantes sont utilisées. Les angles de contact sont mesurés et moyennés à partir de 5 gouttes déposées en différents endroits sur chaque échantillon considéré. Or l'écart type obtenu sur la surface fonctionnalisée par des peptides RGDC est faible, ce qui met en évidence l'homogénéité du greffage.

		Angle de contact moyen (°)	Ecart-type moyen (°)	Rugosité (nm/μm <sup>2</sup> )
Solution acide aqueuse	Silice	16	3	0.3
	PDMES	39	3	0.6
	APTES	26	2	0.4
Solution anhydre	Silice	55	4	0.3
	PDMES	62	8	0.4
	APTES	74	3	0.3
	RGDC	75	2	0.3
	DGRAFVLC	61	2	0.4
	Thermanox ®	73	4	0.8

Tableau 7. Mesures d'angle de contact et de rugosité sur différentes surfaces.

Les angles de contact de gouttes d'eau sur des matériaux de silice, de silice fonctionnalisée par l'APTES et de silice fonctionnalisée par le peptide RGDC montrent une modification du caractère hydrophile des matériaux en fonction des différentes étapes du greffage. Cette mesure « macroscopique » donne une première indication de la modification de la surface par le greffage chimique.

## b. XPS

Des analyses par XPS permettent de valider définitivement le protocole de greffage chimique du peptide RGDC. Le Tableau 8 présente les résultats quantitatifs relatifs à l'analyse des surfaces de silice fonctionnalisées par les peptides RGDC.

Après le greffage de l'espaceur SMP, l'azote apparaît à la surface à une hauteur de 2.1 %. Le pourcentage de silice augmente de 0.8 %. Le rapport des pourcentages de silice et d'azote est de 0.38 ce qui est proche de celui théoriquement attendu (de 0.5).

Après le greffage du peptide RGDC, le pourcentage d'azote présent à la surface est de 2.6 % tandis que celui de silice est constant. Le calcul du rapport des pourcentages de silice et d'azote est de 0.12, ce qui est quatre fois celui théoriquement calculé. Ce résultat suggère une fixation non systématique des peptides RGDC à l'espaceur SMP lié certainement à des problèmes d'accessibilité des sites réactifs du SMP par la cystéine du peptide.

Echantillon	C	O	Si		N
			Substrat	Oxydé	
SiO <sub>2</sub> brut	18,7	29,1	43,0	8,5	0
APTES	25,2	28,6	35,7	9,2	1,3
SMP	28,5	28,0	32,0	9,3	2,1
RGD	24,4	30,5	33,2	9,2	2,6

Tableau 8. Composition atomique (en pourcentage) obtenue par XPS, SF Scofield pour différentes surfaces greffées.

Comme le prouvent ces résultats d’XPS, le greffage du peptide RGDC se produit sur la surface de silice silanisée. Les équations de réaction du peptide RGDC (Figure 35, Figure 36) excluent tout greffage en multicouches. Et puisque la surface de silice présentait une monocouche d’APTES à l’interface, il est raisonnable d’estimer qu’une couche peptidique est greffée en surface.

### c. Spectroscopie Infra-Rouge

Des analyses par spectroscopie infra-rouge ont été effectuées sur une surface de verre, fonctionnalisée avec le peptide RGDC. Elles ont été réalisées à partir du même protocole que celui réalisé sur la silice.

La Figure 37 montre un spectre PM-IRRAS d’une surface de verre biofonctionnalisée par des peptides RGDC. Le spectre de la surface de verre modifiée avec des peptides RGDC (Figure 37) et celui de la surface de verre (résultat non montré) sont identiques : aucun pic n’apparaît vers 1600 cm<sup>-1</sup>. Il serait caractéristique des groupements carboxyles et amines présents dans toutes les fonctions amides de la chaîne peptidique principale. Deux hypothèses sur l’absence de caractérisation du greffage du peptides RGDC peuvent être formulées :

- (i) La quantité de peptides greffés à la surface de verre est très faible.
- (ii) Les peptides greffés se sont décomposés ; ce qui pourrait expliquer la présence d’un pic à 1500 cm<sup>-1</sup>.

Ces résultats ne permettent pas de conclure que le peptide RGDC est greffé à la surface du verre. Le greffage du RGDC n’a pas été caractérisé par la spectroscopie PM-IRRAS.

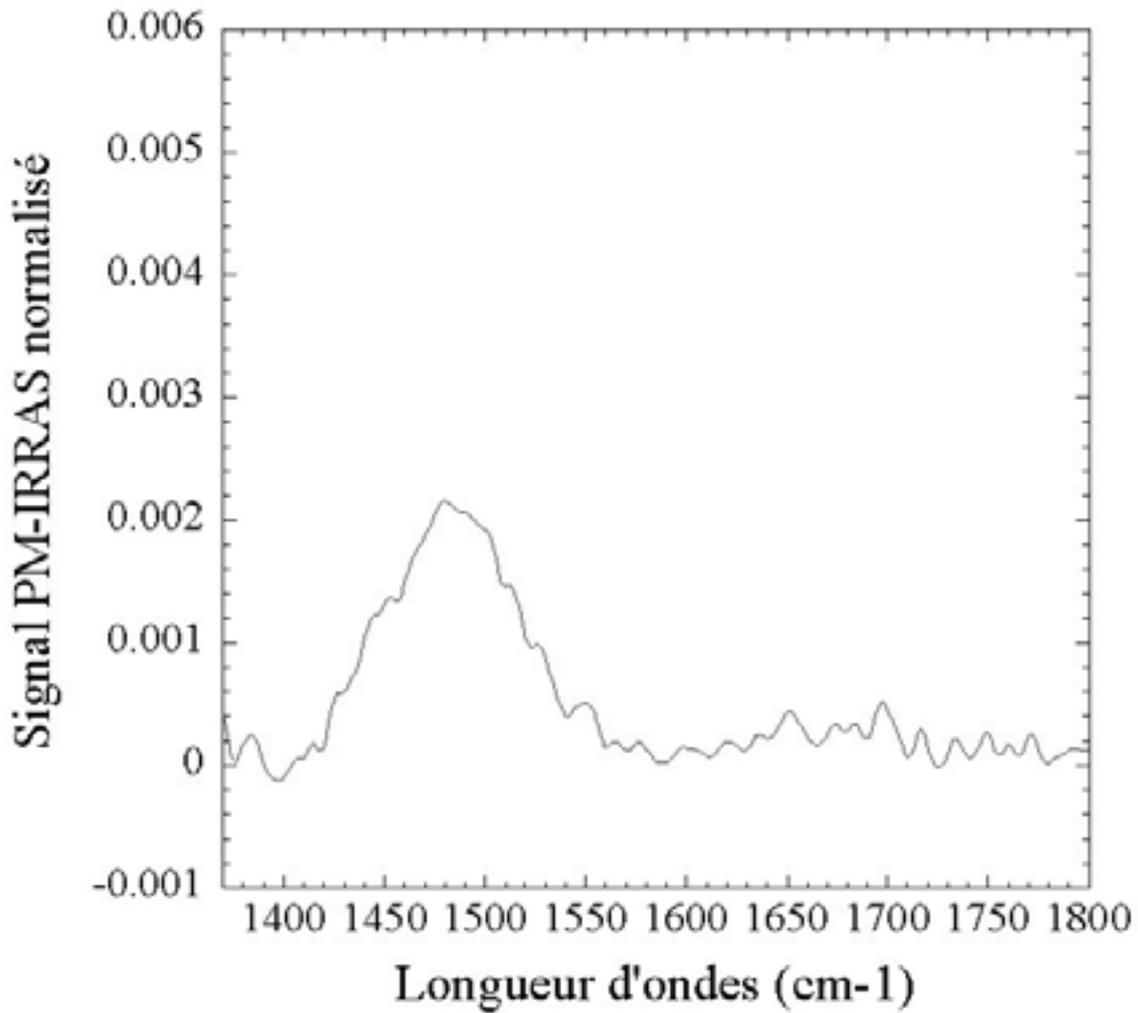
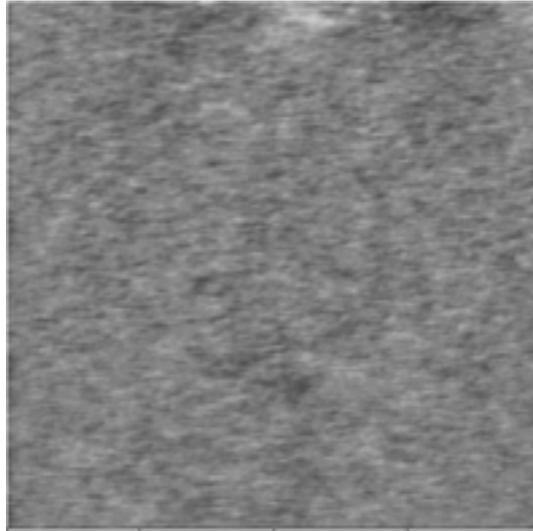


Figure 37. Spectre PM-IRRAS de peptides RGDC greffés sur du verre silanisé.

#### d. MFA

La surface de silice greffée avec le peptide RGDC a aussi été observée par MFA en mode contact à l'air sous une atmosphère contrôlée. Elle est plane (Figure 38) et présente une rugosité de  $0.3 \text{ nm}/\mu\text{m}^2$  (Tableau 5). La Figure 38 ne diffère pas de celle obtenue pour des surfaces de silice non traitées ou silanisées par de l'APTES.



*Figure 38. Image obtenue en mode contact à l'air de surface de peptides RGDC greffés sur une surface de silice silanisée.*

*Taille de l'image : 1  $\mu\text{m}$  x 1  $\mu\text{m}$  x 3 nm. Vitesse de balayage : 4  $\mu\text{m/s}$ .*

Cette technique de caractérisation permet donc de conclure que la surface de silice fonctionnalisée par les peptides RGDC est homogène et peu rugueuse, la technique d'XPS ayant permis précédemment de mettre en évidence le greffage chimique de ces biomolécules.

### 3.3. Caractérisation physico-chimique du greffage du peptide DGRAFVLC

A partir du protocole de greffage établi et validé pour les peptides RGDC, un peptide composé de huit acides aminés et terminé par une cystéine, le peptide DGRAFVLC (Figure 33) a aussi été greffé sur de la silice silanisée.

Le choix de cette séquence primaire du peptide a été guidé par différents critères inhérents au protocole de greffage (le peptide doit posséder une cystéine) et au système de reconnaissance cellule-ligand (il doit être terminé par la séquence RGD pour être reconnu par les intégrines portées par les cellules).

Les acides aminés RGD devront être bien exposés et accessibles aux intégrines sur la couche peptidique greffée. De plus, une longueur de 3.0 à 3.5 nm semble être la longueur minimale entre la séquence RGD et la surface minérale sous-jacente<sup>146,147</sup>. Or, il a été établi, à partir d'une échelle d'hydrophobie<sup>149</sup>, que certains acides aminés sont préférentiellement

rencontrés dans les feuillets  $\beta$  des protéines. Ce sont par exemple les acides aminés hydrophobes F,V ... En se basant sur cette relation entre des séquences d'acides aminés et leur organisation dans une protéine en feuillet  $\beta$ , ces acides aminés situés près de la surface de la silice devraient s'organiser en une courte structure en feuillet  $\beta$  et les acides aminés terminaux (RGD) seront exposés à l'extrémité de cette surface peptidique. Le peptide DGRAFVLC est ainsi proposé, l'hypothèse de travail étant de créer une monocouche peptidique présentant cette structure en feuillet  $\beta$  à l'interface de la silice silanisée et de la séquence RGD.

### a. Mouillabilité

Les surfaces de silice fonctionnalisée par le peptide DGRAFVLC présentent des angles de contact de l'eau de  $61^\circ \pm 2^\circ$ . Elles sont plus hydrophiles que les surfaces de silice fonctionnalisée par le peptide RGDC. Mais de la même façon, le faible écart type obtenu sur ces valeurs met en évidence l'homogénéité du greffage.

### b. Spectroscopie Infra-Rouge

Afin de démontrer le greffage effectif de ces peptides par le protocole déjà détaillé précédemment, des analyses par IR de ces surfaces greffées ont été réalisées. Le spectre du signal PM-IRRAS normalisé a été observé dans la région située entre  $1400$  et  $2000 \text{ cm}^{-1}$  (Figure 39). Les pics autour de  $1720 \text{ cm}^{-1}$  sont relatifs aux vibrations des groupements CH présents dans la chaîne peptidique. Ce spectre met aussi en évidence un pic à  $1615 \text{ cm}^{-1}$ , particulièrement intense. Ce pic est caractéristique des vibrations du carboxyle du groupement amide présent dans la chaîne peptidique principale. Le rapport du signal PM-IRRAS est de  $5/1000$ , ce qui est attendu dans le cas du greffage d'une monocouche de peptides. Le greffage du peptide DGRAFVLC est ainsi caractérisé par PM-IRRAS. De plus, il est à noter qu'à côté de ce pic, le pic correspondant aux vibrations amines des groupements amides de la chaîne peptidique n'est pas visible. Ces résultats sont la signature de la présence d'un feuillet  $\beta$  dans la couche peptidique.

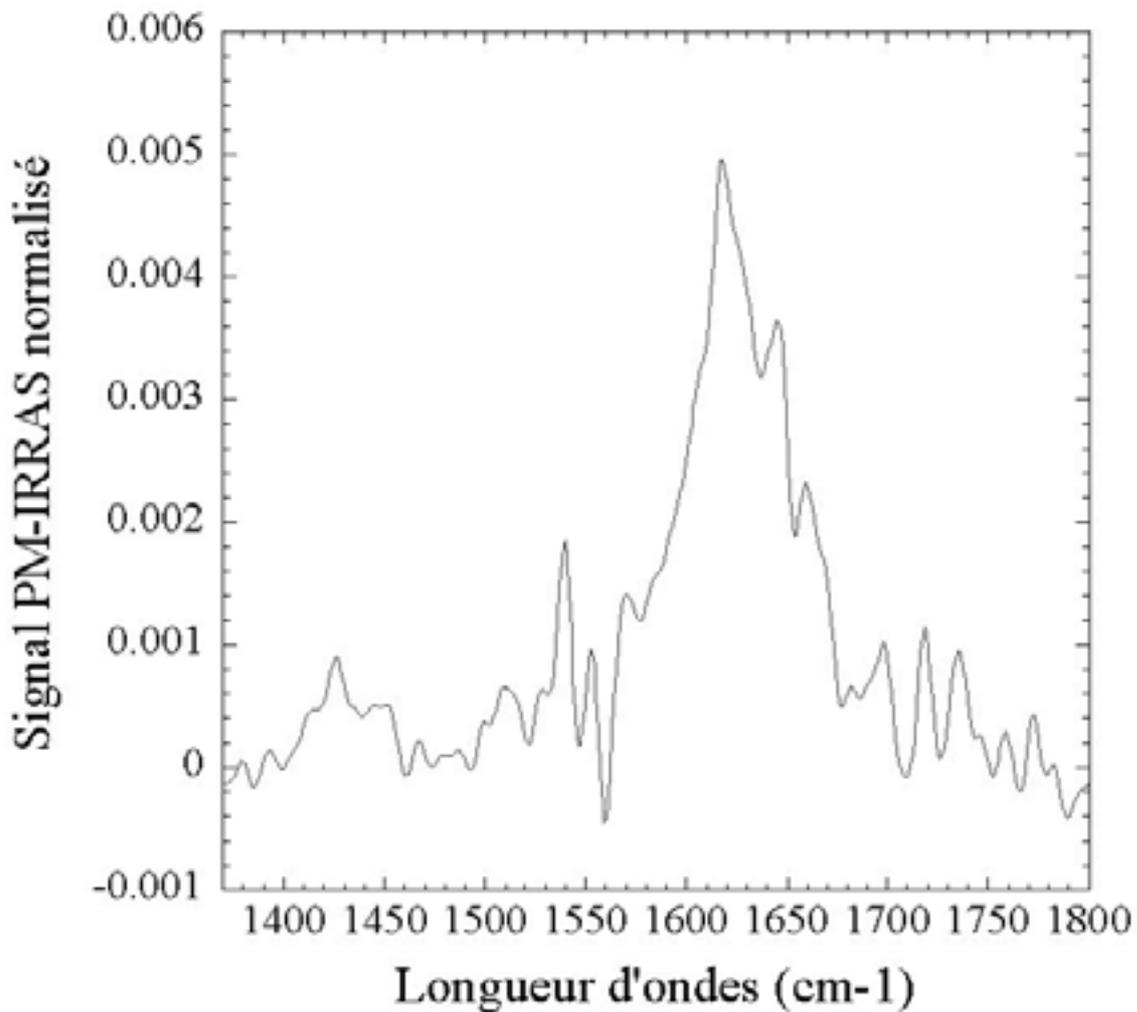


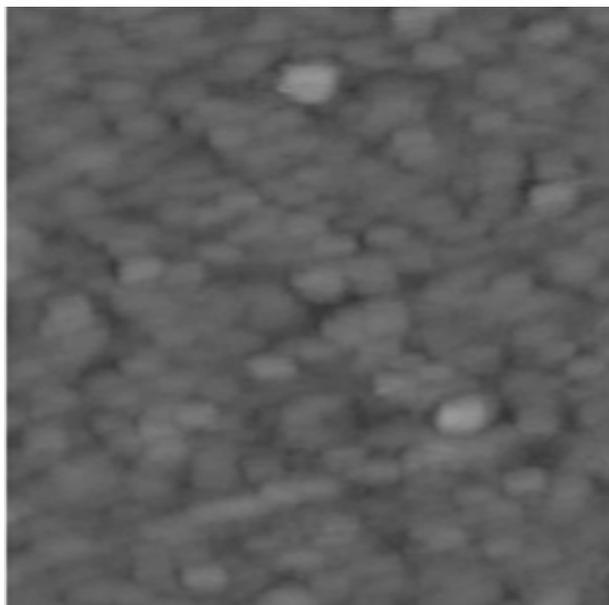
Figure 39. Spectre PM-IRRAS de peptides DGRAFVLC greffés sur du verre silanisé.

Ces résultats nous permettent de conclure qu'une monocouche de peptides DGRAFVLC est greffée à la surface de la silice et que cette monocouche est organisée en feuillet  $\beta$  à la surface de la silice.

Le protocole proposé conduit donc au greffage d'une monocouche peptidique. Avec un choix particulier de la séquence peptidique, une organisation particulière de la monocouche est obtenue.

### c. MFA

La Figure 40 montre la topographie de la surface peptidique greffée sur du verre. La surface est plane et dépourvue d'agrégats. La surface est particulièrement plane par comparaison à celle de la surface de verre qui est très rugueuse.



*Figure 40. Image obtenue en mode contact à l'air de surface de peptides DGRAFVLC greffés sur une surface de verre silanisée.*

*Taille de l'image :  $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m} \times 25\text{ nm}$ . Vitesse de balayage :  $4\ \mu\text{m/s}$ .*

Des surfaces de silice biofonctionnalisées ont été développées et caractérisées dans ce troisième chapitre. Nous disposons de quatre surfaces différentes :

- Surface de Thermanox<sup>®</sup>
- Surface de protéines adhésives de SVF adsorbées sur une surface de silice silanisée
- Surface de monocouche de peptides d'adhésion de type RGD greffés de façon covalente sur une surface de silice silanisée. Deux peptides de longueurs différentes (RGDC et DGRAFLVC) ont été greffés.
- Surface de silice

Des ostéoblastes humains ont été déposés sur ces surfaces et l'adhésion cellulaire est évaluée et comparée. C'est ce qui est abordé dans le dernier chapitre de cette étude.





# Chapitre IV.

## Etude de l'adhésion d'ostéoblastes humains sur des matériaux biofonctionnalisés



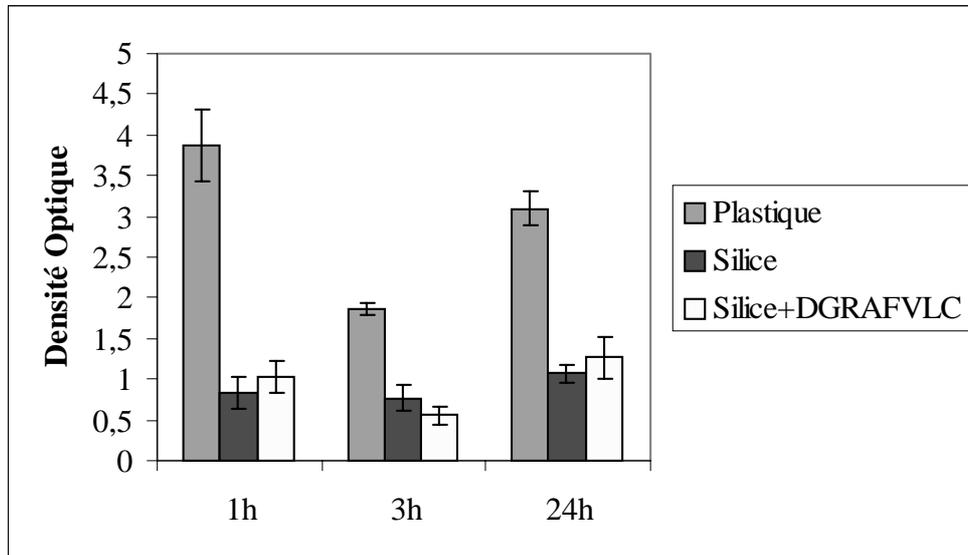
# 1. Résultats de l'évaluation de l'adhésion d'ostéoblastes bio-spécifiquement sur une surface de peptides RGDC greffés sur de la silice

## 1.1. Test d'attachement

L'attachement de cellules ostéoprogénitrices humaines sur de la silice et sur de la silice fonctionnalisée par des peptides RGDC ou DGRAFVLC a été mesuré dans un milieu de culture dépourvu de protéines du sérum de veau fœtal. En effet, puisque le but est de déterminer l'effet du greffage de peptides RGD sur l'attachement des cellules, il faut exclure les interactions entre les cellules et la surface présentant des protéines adsorbées par le sérum de veau fœtal. La quantité d'ostéoblastes a été évaluée pour chaque surface à 1h, 3h et 24h (Figure 41).

Après 1h d'incubation, il n'apparaît pas de différence de nombre entre les cellules attachées à la surface de la silice et celles attachées à la surface de silice fonctionnalisée par des peptides RGDC. Après 3h, la surface de silice fonctionnalisée par des peptides RGDC présente 30 % de cellules attachées en plus comparée à la surface de silice. A 24h, il n'apparaît pas de différence significative en nombre de cellules attachées suivant le traitement des surfaces.

A.



B.

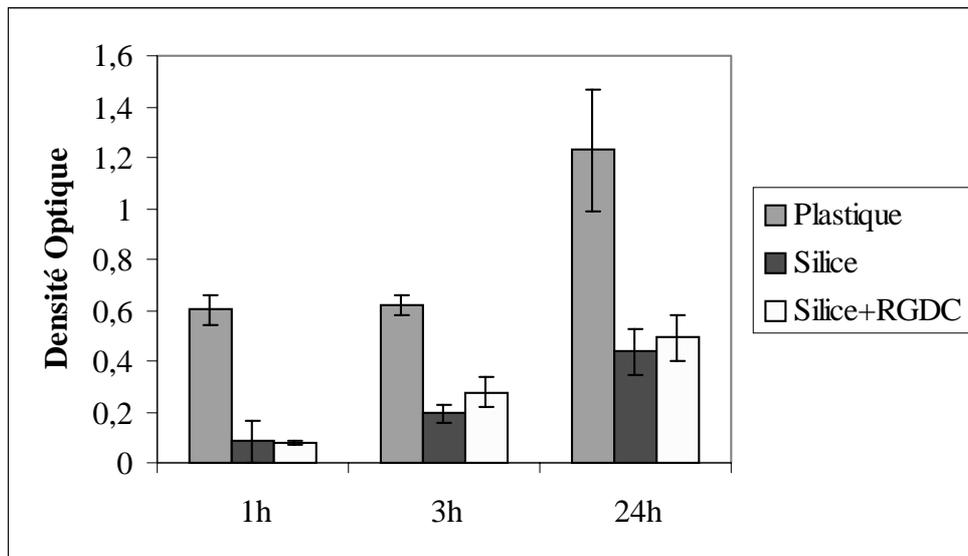


Figure 41. Histogramme de l'adhésion de HOP sur des surfaces de silice et d'une surface de silice biofonctionnalisée par des peptides RGDC ou DGRAFLC.

Ces résultats ne montrent pas d'effet de la fonctionnalisation de la silice par des peptides RGDC sur l'attachement des cellules ostéoprogénitrices humaines à 1h et à 24h d'incubation, mais met en évidence une augmentation du nombre de cellules attachées sur les

surfaces de silice fonctionnalisée par des peptides RGDC à 3h, par comparaison à celui d'une surface de silice.

Dans le cas de la surface de silice fonctionnalisée par des peptides DGRAFLC, il n'apparaît aucune différence significative du nombre de cellules attachées entre les différents traitements de surface.

## 1.2. Evaluation morphologique de l'adhésion de cellules ostéoprogénitrices de moelle osseuse humaine par MFA

La présentation de ces résultats et leur discussion sont organisées en deux parties : la visualisation d'ostéoblastes par MFA, l'évolution morphologique et la disparition de cellules faiblement adhérentes.

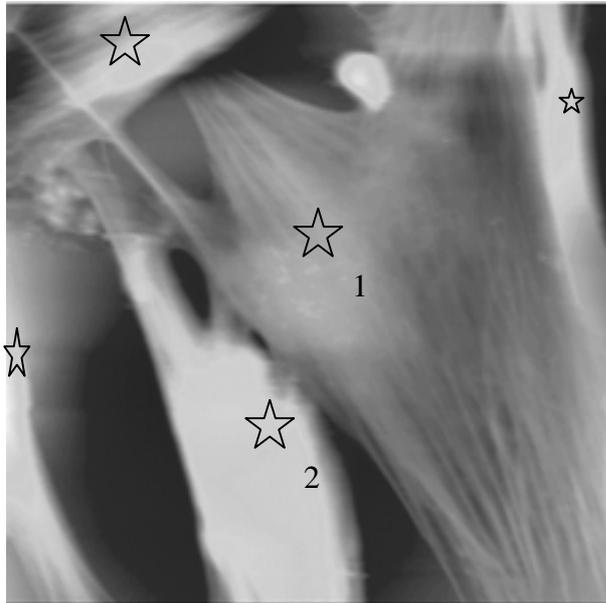
Bien que le nombre de cellules étudié par MFA soit peu élevé, l'observation et le comportement des ostéoblastes dans le temps a été observé sur différents échantillons. Ce qui est présenté dans ce manuscrit a été vérifié à plusieurs reprises.

### a. Images d'ostéoblastes et de structures intra-cellulaires obtenues par MFA.

#### *i. Résultats*

La forme des ostéoblastes et leur étalement sur la surface de Thermanox® sont les premières caractérisations visuelles de l'adhésion des ostéoblastes par MFA (Figure 42) comme par n'importe quelle microscopie<sup>150</sup>. Plus une cellule adhère à une surface, plus elle est étalée sur cette surface.

A. t = 0



B.



C.

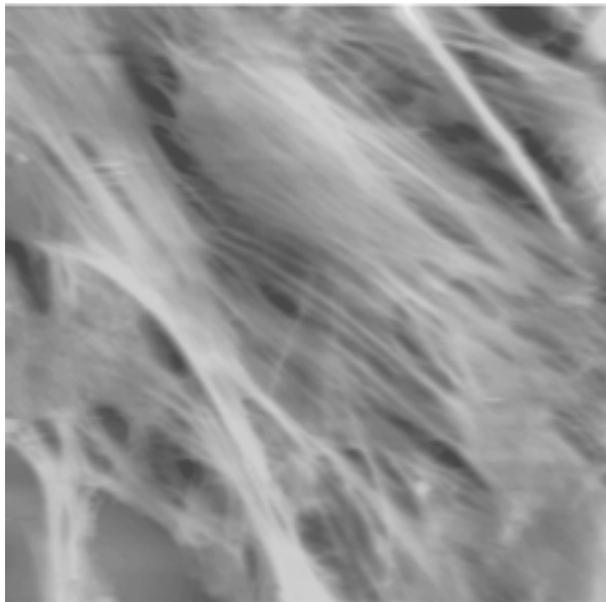


Figure 42. Aspects morphologiques d'HBMSC étalées sur des surfaces de Thermanox<sup>®</sup>, et observées par MFA en mode contact.

A. Cellule adhérente dans un milieu de culture non complété en SVF.

B. Cellule peu adhérente dans un milieu de culture non complété en SVF.

C. Cellules confluentes dans un milieu de culture complété en SVF.

Toutes ces images sont des images de topographie.

Taille des images : 130  $\mu\text{m}$  x 130  $\mu\text{m}$  x 15  $\mu\text{m}$ . Vitesse de balayage : 260  $\mu\text{m/s}$ .

Sur une surface de Thermanox<sup>®</sup>, différents états d'adhérence des cellules peuvent être observés :

- Cellule adhérente : la cellule indiquée par le numéro 1 sur la Figure 42. A. est complètement étalée et aplatie par comparaison avec la cellule notée 2 sur la Figure 42. A. ou avec celle de la Figure 42. B. Cet état est bien sûr vérifié lorsque les HBMSC sont à confluence (Figure 42. C.). Dans ce cas, les cellules forment des multicouches, ce qui peut rendre difficile la distinction de leur frontière. Mais après observation, la morphologie d'une cellule adhérente bien apparente et définie sur la Figure 42. A. (cellule numérotée 1) est identifiée pour toutes les cellules qui recouvrent toute la surface et qui sont à confluence.
- Cellule peu adhérente : c'est le cas d'une cellule, notée 2 sur la Figure 42. A. qui apparaît beaucoup plus compacte, avec une forme davantage elliptique et avec seulement quelques extensions cytoplasmiques visibles à son extrémité supérieure.
- Cellule en voie de détachement : la cellule montrée en Figure 42. B. représente cet état puisqu'elle est encore moins étalée par rapport aux cellules de la Figure 42. A.

Leur forme allongée caractérise toutes les cellules. Après cette considération morphologique, il faut s'attacher aux détails des structures intra-cellulaires des cellules, et plus particulièrement à la présence d'un important réseau à l'intérieur des cellules très adhérentes. La cellule 1 sur la Figure 42. A. est constituée d'un noyau situé au centre de la cellule qui apparaît comme l'endroit le plus haut, et d'un grand nombre de fibres qui sont dans le prolongement du noyau. Ce faisceau de filaments s'étend sur 30  $\mu\text{m}$  dans la partie supérieure de la cellule et sur 60  $\mu\text{m}$  vers son pôle inférieur. C'est le cytosquelette de la cellule.

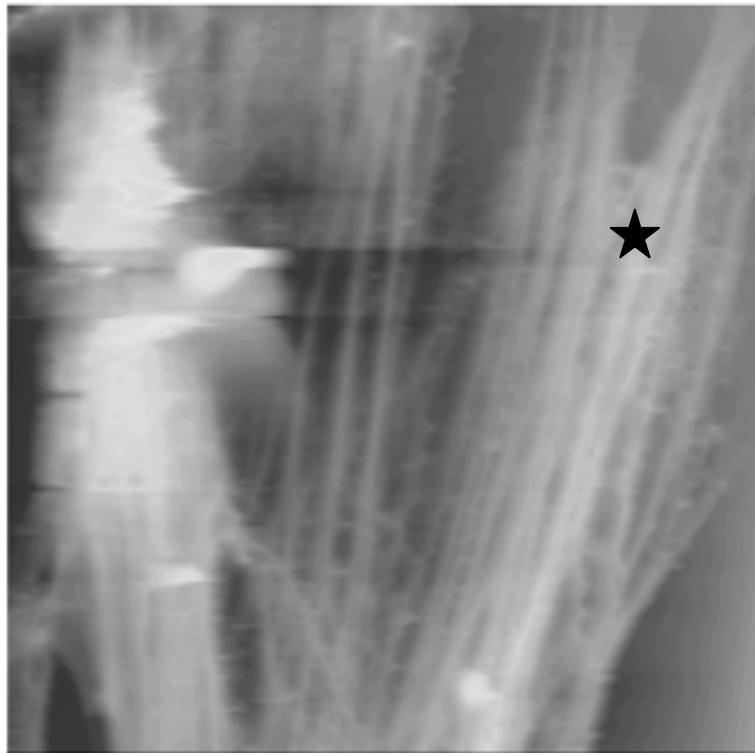
En plus de l'étalement et de la forme allongée de ces cellules, les HOP sont capables de générer une importante structure filamenteuse du cytosquelette dont la présence témoigne de l'établissement direct d'une forte adhésion. Il est à noter l'orientation particulière des fibres du cytosquelette, dans le cas des ostéoblastes.

La Figure 42 est donc une illustration par MFA des trois états d'adhérence d'ostéoblastes qui sont distinguables par la forme, l'étalement et la présence d'un cytosquelette plus ou moins développé de ces cellules.

Ces différences de morphologies entre les cellules permettent d'établir une hiérarchisation d'adhésion de cellules sur une même surface témoin, le Thermanox<sup>®</sup>. Mais pour une surface donnée, un seul état d'adhésion cellulaire est majoritairement observé. Sur

une surface de Thermanox<sup>®</sup> recouvertes de SVF (ou pas), les HOP sont adhérentes et leur adhésion est semblable à celle de la cellule montrée Figure 42. A.

Parallèlement, des ostéoblastes sont déposés sur une surface de protéines adhésives adsorbées sur une surface silanisée. Il est attendu que les ostéoblastes soient adhérents. Dans des conditions favorables d'adsorption de ces protéines, les ligands spécifiques des récepteurs intégriniques sont à la surface et peuvent interagir. La Figure 43 montre effectivement une cellule, sur la gauche de l'image, constituée d'un corps cellulaire qui adopte une forme très allongée. Le corps cellulaire est d'ailleurs la seule partie visible de cette cellule. Près de celle-ci, un grand nombre de fibres apparaissent : c'est la structure cytosquelettique d'une autre cellule dont le corps cellulaire n'est pas observé sur cette image. Ces caractérisations morphologiques et cytosquelettiques sont l'établissement direct d'une adhésion des ostéoblastes sur une surface de protéines adhésives adsorbées.

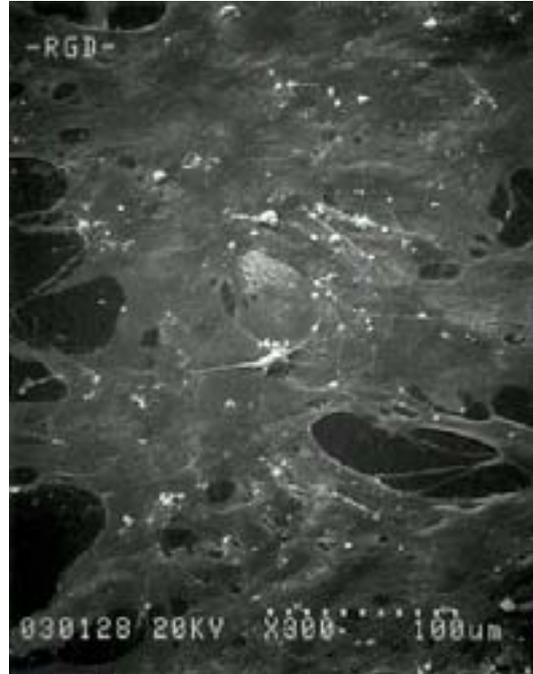


*Figure 43. Aspect morphologique d'HBMSC étalés sur des protéines adhésives adsorbées sur une surface de silice silanisée et observés par MFA en mode contact.*

*A gauche de l'image, seul le corps cellulaire d'une cellule apparaît. Le reste de la surface est recouvert par des fibres du cytosquelette d'une autre cellule dont le corps cellulaire n'est pas visualisé sur cette image.*

*Taille de l'image : 130  $\mu\text{m}$  x 130  $\mu\text{m}$  x 15 nm. Vitesse de balayage : 260  $\mu\text{m/s}$ .*

Après 24h de culture des ostéoblastes sur des surfaces de peptides RGDC greffés sur de la silice dans un milieu dépourvu de protéines du sérum, la surface a été caractérisée par MEB. Comme le montre la Figure 44 et en accord avec le test d'attachement (Figure 41), les cellules recouvrent la surface.

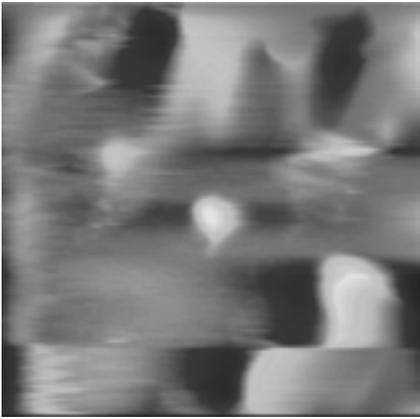


*Figure 44. Image d'ostéoblastes cultivés pendant un jour sur une monocouche peptidique greffée sur de la silice en l'absence de protéines de Sérum de Veau Fœtal, obtenue par MEB.*

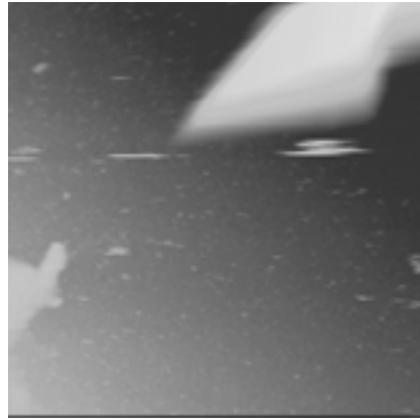
Les mêmes préparations d'échantillons ont été observées par MFA après 24 h de culture. Rappelons que dans ce cas, les cellules ne sont pas fixées. Les images obtenues par MFA montrent des cellules peu étalées à la surface, et très hautes (supérieure à 5,5  $\mu\text{m}$ , qui est le déplacement limite de la céramique piézo-électrique) ; ce qui les rend difficile à visualiser avec l'appareil dont nous disposons. De nombreuses cellules sont en voie de détachement de la surface. La Figure 45 A et B illustre l'état d'adhésion cellulaire rencontré généralement. Puisque les résultats des tests d'attachement ont montré un effet favorable du greffage du peptide RGDC à 3h et à 24h, il a été envisagé de modifier les temps d'incubation des surfaces pour les observer par MFA. En effet, dans cette condition d'étude, les cellules sont placées dans des conditions de culture extrême (milieu de culture minimum), qui pourrait entraîner une mort cellulaire plus précoce que dans les autres cas déjà montrés. Pour écarter cette éventualité, des observations ont été réalisées à des temps plus courts, de l'ordre de 10 h. Elles

ont conduit aux mêmes états d'adhésion des ostéoblastes en surface : les cellules sont en voie de détachement de la surface.

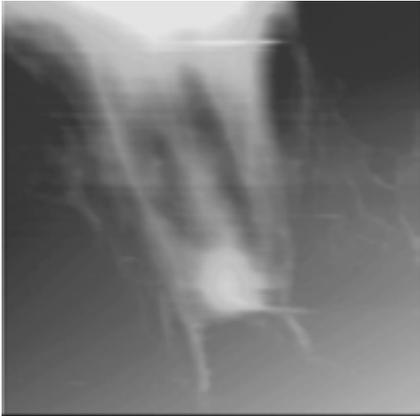
A.



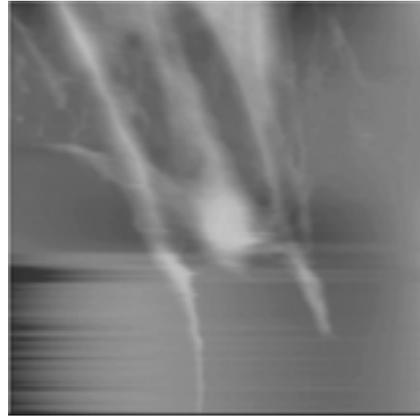
B.



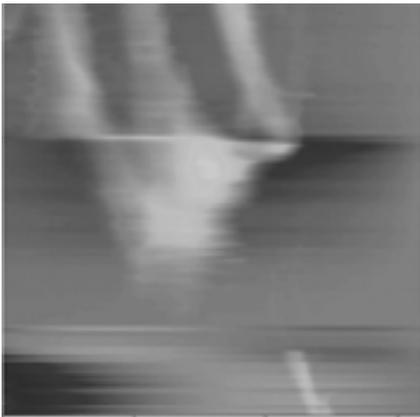
C.



D.



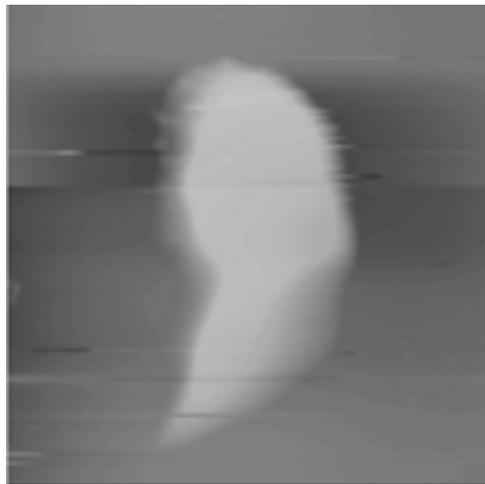
E.



*Figure 45. Images en topographie d'ostéoblastes déposés sur une surface de RGDC greffés sur de la silice et observés in situ en mode contact par MFA. La force externe appliquée était minimum (A et B) et de 0.2 nN en C. Taille des images : (A, B et C) 130  $\mu\text{m}$  x 130  $\mu\text{m}$  x 3  $\mu\text{m}$ . Vitesse de balayage : 260  $\mu\text{m}/\text{s}$ . (D et E) 98  $\mu\text{m}$  x 98  $\mu\text{m}$  x 3  $\mu\text{m}$ . Vitesse de balayage : 196  $\mu\text{m}/\text{s}$ .*

La visualisation d'une cellule isolée dont le corps cellulaire n'apparaît pas sur l'image présentée et qui, par conséquent, est plus facile à visualiser (Figure 45. C à E.) montre que leur forme est plutôt allongée, bien que très peu étalée. Contrairement à la caractérisation morphologique des ostéoblastes adhérent à une surface de Thermanox<sup>®</sup>, et comme défini précédemment, les cellules déposées sur des surfaces de RGDC greffées sur de la silice ne présentent pas, en général, de structure cytosquelettique attribuée à celle de cellules adhérentes. Un seul cas de cellule possédant un étalement et développant un cytosquelette qui est caractéristique d'une cellule adhérente a été observé sur l'ensemble des nombreuses préparations analysées. Il est montré Figure 45. La cellule est peu adhérente.

Des ostéoblastes déposés sur des surfaces biofonctionnalisées par des peptides DGRAFVLC présentent des caractéristiques morphologiques de cellules en voie de détachement (Figure 46).



*Figure 46. Image en topographie d'ostéoblaste déposé sur une surface de DGRAFVLC greffés sur de la silice et observés in situ en mode contact par MFA.*

*Une force externe minimale est appliquée.*

*Taille des images : 130  $\mu\text{m}$  x 130  $\mu\text{m}$  x 6  $\mu\text{m}$ . Vitesse de balayage : 260  $\mu\text{m/s}$ .*

Généralement, les ostéoblastes sont en voie de détachement sur une surface de peptides RGDC greffés sur de la silice.

L'adhésion d'ostéoblastes déposés sur des surfaces de silice a été observé par MFA, avec ou sans protéines du sérum de veau fœtal. Aucune cellule n'a été visualisée. Sur une surface de silice, les ostéoblastes n'adhèrent pas.

## *ii. Discussion*

La première caractérisation de l'adhésion cellulaire des HBMSC par MFA est une visualisation de la morphologie de ces cellules sur une surface. Les images obtenues montrent que les HBMSC adhérentes sont étalées sur la surface et adoptent une forme allongée.

Ces résultats sont en accord avec ceux établis par microscopie électronique à balayage par Massia *et al.*<sup>37</sup>. Ils ont montré l'existence de plusieurs morphologies distinctes de fibroblastes sur une surface. Quatre catégories de morphologie des cellules ont été proposées : les cellules sphéroïdes avec 0, 1 ou 2, ou plus de 2 extensions de filipodes et les cellules complètement aplaties. Les filipodes sont des extensions de surface d'une cellule : elles sont dynamiques et contiennent des filaments d'actine. Cette classification est le résultat d'au moins 100 observations différentes de cellules.

Pour les expériences de MFA présentées, des données sur un grand nombre de cellules ne sont pas disponibles. Les images reportées dans cette étude sont tout de même représentatives de l'état d'adhérence des cellules classifié par Massia *et al.*<sup>37</sup>, sauf l'état où les cellules sont non adhérentes i.e. avec une forme sphéroïde et dépourvue d'extensions de filipodes sur une surface. De telles cellules ne peuvent pas être observées par MFA, parce que le balayage de la pointe du MFA induit des forces suffisamment importantes pour déplacer des cellules faiblement adsorbées sur une surface. De plus, la hauteur d'une cellule non-adhérente est supposée être élevée, comparée à celle d'une cellule adhérente qui est étalée à une surface.

Dès lors que la hauteur maximale de la cellule est inférieure à 5.5  $\mu\text{m}$ , tous les autres états d'adhérence possibles des cellules sont par contre observés par MFA. La morphologie d'une cellule adhérente vue par MEB est bien corrélée à celle identifiée et montrée par MFA sur la Figure 42. Dans le cas d'une cellule adhérente, un cytosquelette particulièrement développé avec un grand nombre de fibres de stress, probablement des fibres d'actine existe dans la cellule. Ce cytosquelette est nettement visible sur une image de topographie comme le montre la Figure 42. A.

Sur une surface recouverte de protéines adhésives (Thermanox<sup>®</sup> ou silice silanisée), les HOP sont étalées et de forme allongées. Ils présentent un cytosquelette particulièrement développé avec un grand nombre de fibres de stress, probablement des filaments d'actine. Dans le cas d'une surface de Thermanox<sup>®</sup>, les cellules sont à confluence. Les difficultés de délimitation des cellules entre elles feront que dans un premier temps, l'étude de ces cellules sera écartée. Les fibres du cytosquelette s'étalent sur plus de 100  $\mu\text{m}$  et occupent une grande

partie de l'image. Dans la littérature, l'organisation du cytosquelette est associée à l'adhésion cellulaire, puisque le cytosquelette intra-cellulaire est relié à la surface par des récepteurs d'adhésion, les intégrines. Ces protéines membranaires sont nombreuses et leur attachement à la surface est nécessaire pour la survie des cellules. Bien que d'autres études comme l'immuno-fluorescence par microscopie par exemple soient nécessaires pour confirmer la nature de ces fibres, elles constituent le cytosquelette cellulaire. Elles pourraient être des filaments d'actine. Lorsque les intégrines sont recrutées par les ligands de la MEC, elles s'agrègent entre elles. Cette agrégation ou « clustering » est typiquement associée avec le recrutement de protéines cytosoliques qui lient les protéines du cytosquelette et les protéines des voies de signalisation.

Dans notre étude, l'observation du cytosquelette indique indirectement une agrégation des intégrines qui influence ensuite les fonctions biochimiques et biophysiques de ces récepteurs, essentiellement par un recrutement hiérarchique des protéines cytosoliques au site d'agrégation des intégrines.

La visualisation par MFA des surfaces de monocouche de peptides RGDC greffés de façon covalente met en évidence la faible adhérence des HOP à la surface. Les ostéoblastes sont peu étalés et adoptent une forme allongée, contrairement à la surface recouverte de protéines adhésives. L'occupation des intégrines et leur agrégation sont requises pour engager des interactions avec de nombreuses protéines cytosoliques et des voies de signalisation. Notre étude montre donc que la séquence RGD est bien la séquence minimale critique. Elle favorise l'adhésion cellulaire par l'occupation des intégrines ; mais elle ne stimule pas leur agrégation et la formation de plaque d'adhésion focale qui correspond à une zone de la membrane basale de la cellule qui présente des nombreux agrégats d'intégrines. C'est ce que prouvent les tests d'attachement et les observations par MFA.

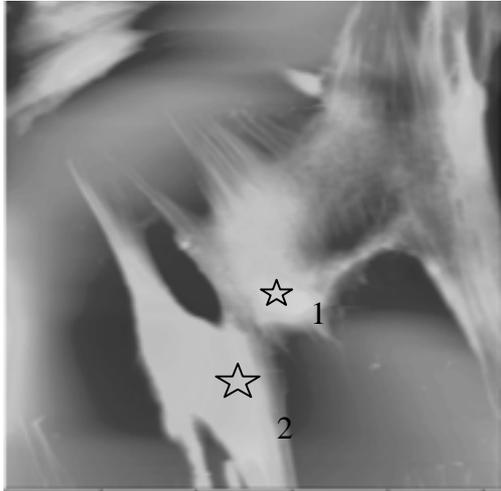
## b. Suivi du processus de détachement d'ostéoblastes par MFA.

### *i. Résultats*

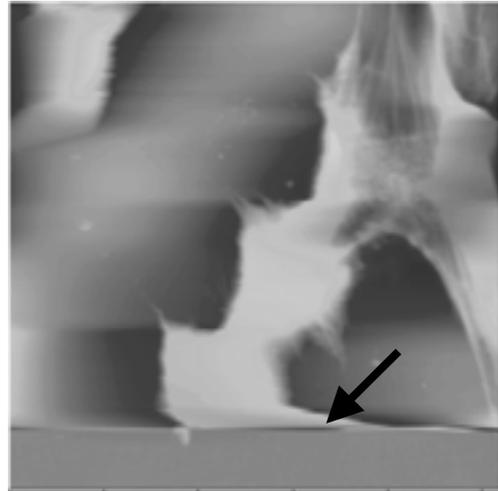
Le suivi de l'évolution dans le temps de la morphologie des cellules, estimée précédemment comme un critère de caractérisation de l'adhésion cellulaire, est possible. Dans cette étude, afin d'évaluer l'adhésion effective de ces cellules, une contrainte mécanique i.e.

une force externe de 4 nN (Figure 47) a été exercée sur les cellules par la sonde du MFA pour les détacher. D'autres facteurs qui peuvent influencer l'adhésion cellulaire peuvent être testés comme certains composés biologiques, des facteurs de croissance<sup>151</sup> par exemple, ou des contraintes de topographie de surface<sup>152</sup>. Ils n'ont pas été expérimentés dans ce travail.

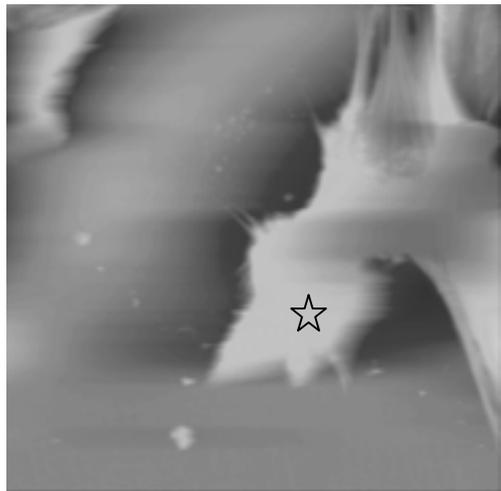
A. t = 5 min



B. t = 10 min



C. t = 35 min



D. t = 40 min

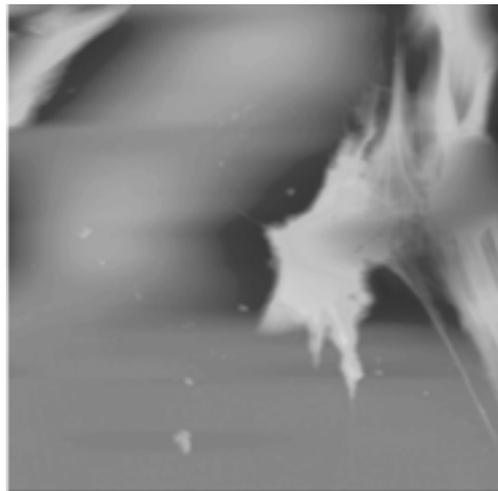


Figure 47. Détachement des ostéoblastes, observé en mode contact par MFA.

Les figures A, B, C, D sont des images de topographie prises successivement, sur la même zone que celle observée Figure 42. A. Le temps d'enregistrement d'une image nécessite 5 min.

A. Le détachement des cellules est induit par l'application d'une force externe de 4 nN pendant 5 min. Cette image a été enregistrée avec une force externe appliquée de 4 nN.

B, C et D. Réponse dynamique des ostéoblastes après l'application d'une force externe par la sonde du MFA et présentée sur des images successives. L'évolution de l'adhérence des cellules est observé avec l'application d'une force externe minimum (0.4 nN) pendant 35 min après avoir appliqué une force externe de 4 nN. La flèche (B) indique le décollement de la cellule.

Taille des images : 130  $\mu\text{m}$  x 130  $\mu\text{m}$  x 15  $\mu\text{m}$ . Vitesse de balayage : 260  $\mu\text{m/s}$ .

L'effet de cette force a été suivi, tout d'abord, dans le cas où les ostéoblastes sont le plus fortement adhérent selon les critères morphologiques définis précédemment. Un exemple est montré sur la Figure 47.

L'application d'une telle force provoque une transformation radicale de la cellule notée 1 et peu de réponse de la cellule numéro 2 (Figure 47. A.). La cellule 1 se rétracte immédiatement après le passage de la sonde du MFA et la structure du cytosquelette est partiellement désintégrée ; la cellule s'arrondie et se contracte autour du noyau, qui apparaît plus haut. La cellule 2 se rétracte aussi un peu.

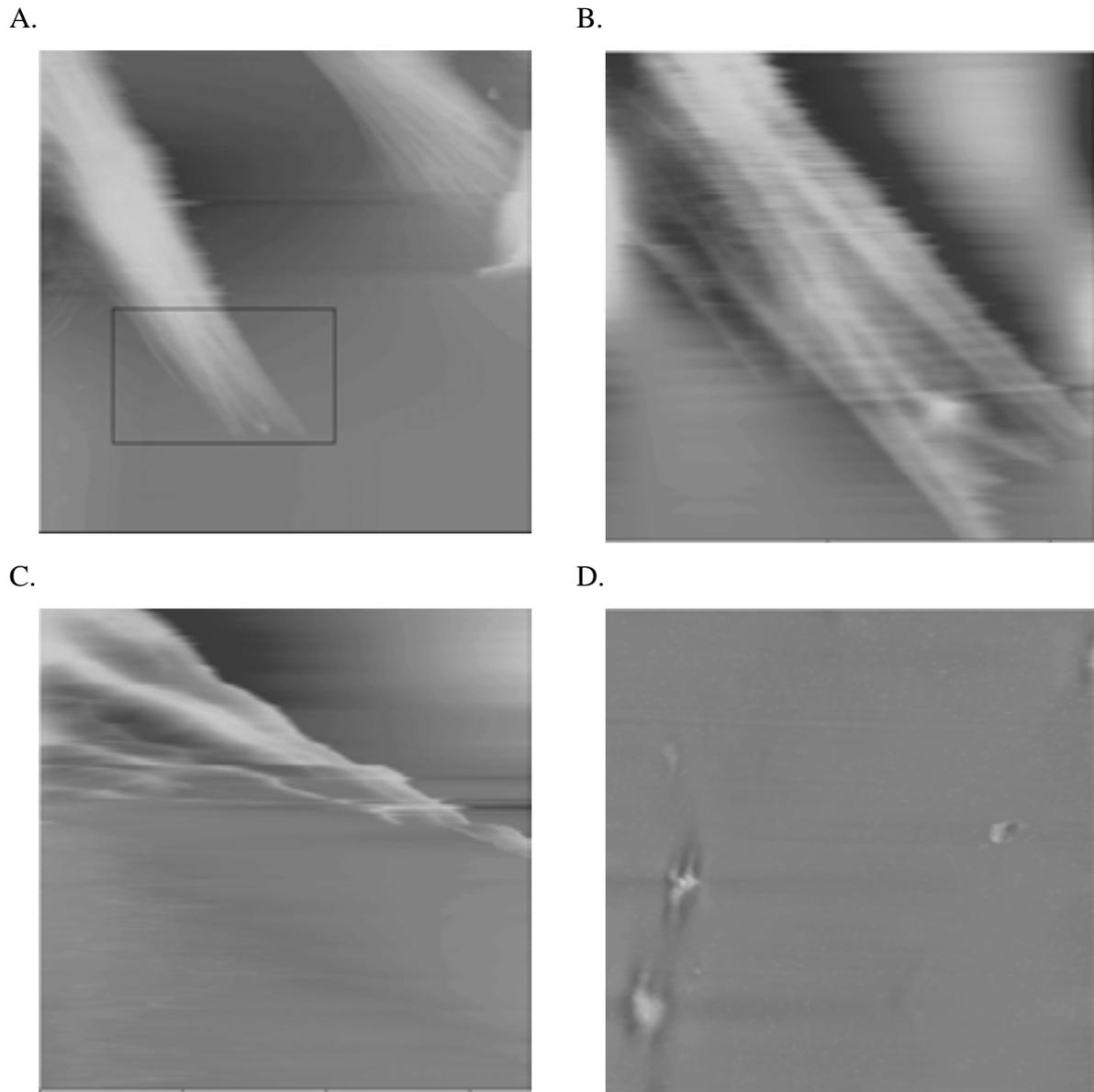
Après l'enregistrement de l'image présentée en Figure 47. A. qui correspond à une perturbation de l'adhésion des cellules après balayage avec une force importante, le processus de détachement des cellules se poursuit pendant les balayages suivant de cette surface. Les Figure 47. B, C et D sont des situations particulières d'images enregistrées successivement de la même zone à des temps différents. Le temps entre l'image Figure 47. B. et l'image Figure 47. E. est de 35 min. La force externe appliquée par la sonde du MFA a été réduite au minimum (0.4 nN) nécessaire pour visualiser les cellules. L'image Figure 47. B. a été enregistrée avec une force externe minimale appliquée 5 min après l'enregistrement de la Figure 47. A. (situation où une forte force externe a été appliquée).

La force exercée par la sonde du MFA semble avoir perturbé davantage la cellule 2 que la cellule 1 contrairement à ce qu'il semblait Figure 47. A. et par comparaison de la morphologie des cellules 1 et 2. La cellule 2 a été très déstabilisée et elle s'est complètement rétractée sur son noyau (Figure 47. B). Dans le bas de la cellule, une épaisse traînée apparaît. Elle est indiquée par une flèche sur la Figure 47. B. Ce n'est pas un artéfact et cela peut être attribué au déplacement de la cellule induit par le passage de la sonde du MFA. C'est un signe précurseur du détachement de la cellule. Effectivement, comme le montre la Figure 47. C., cette cellule se détache de la surface et retourne dans le milieu liquide environnant. Elle a été « balayée » de la surface par la sonde du MFA et elle n'est plus présente à la surface du Thermanox<sup>®</sup> sur la Figure 47. C.

Le comportement de la cellule 1, après l'application d'une force externe, évolue peu en comparaison avec celui de la cellule 2. La cellule 1 continue sa rétraction sur la surface (Figure 47. B.). Les Figure 47. C. et D. montrent que cette cellule se rétracte, mais elle reste toujours liée à la surface.

Un autre exemple de perte d'adhérence des cellules sous l'effet d'une force externe appliquée par la sonde du MFA est montré Figure 48. Cette évolution des cellules et de leur cytosquelette a été vérifiée sur plusieurs échantillons et conduit aux mêmes résultats : en

fonction de l'état d'adhésion de la cellule à la surface, elle se rétracte ou se détache plus ou moins progressivement de la surface.



*Figure 48. Images de cellules déposées sur une surface de Thermanox<sup>®</sup> et observées à différentes résolutions avec une force externe appliquée minimale (A, B et D) et avec une force externe appliquée de 1 nN.*

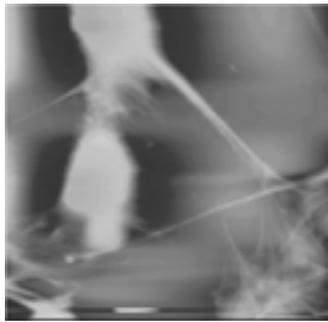
*L'image B correspond à un zoom sur l'image A, indiqué par le rectangle.*

*Taille des images : (A) 130  $\mu\text{m}$  x 130  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$ . Vitesse de balayage : 130  $\mu\text{m}/\text{s}$  et (B) 55  $\mu\text{m}$  x 55  $\mu\text{m}$  x 2.5  $\mu\text{m}$ . Vitesse de balayage : 110  $\mu\text{m}/\text{s}$ . (C) 34  $\mu\text{m}$  x 34  $\mu\text{m}$  x 2.5  $\mu\text{m}$ . Vitesse de balayage : 68  $\mu\text{m}/\text{s}$ . (D) 55  $\mu\text{m}$  x 55  $\mu\text{m}$  x 1  $\mu\text{m}$ . Vitesse de balayage : 68  $\mu\text{m}/\text{s}$*

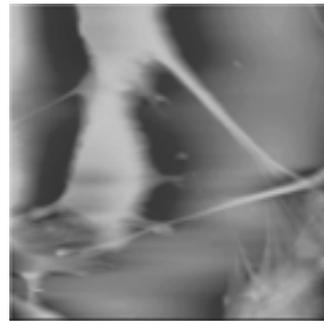
Afin de préciser si la force exercée par la sonde du MFA est bien responsable du détachement des cellules et afin d'exclure un détachement spontané des cellules provoqué par

un facteur inconnu, une expérience de contrôle a été réalisée. L'adhésion d'ostéoblastes cultivés dans les mêmes conditions a été observée dans le temps avec une force externe appliquée minimale (de l'ordre de 0.4 nN). La Figure 49 montre l'ensemble des images successivement enregistrées.

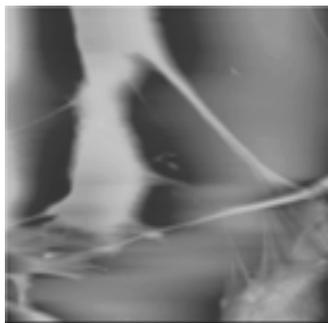
A. t = 0 min



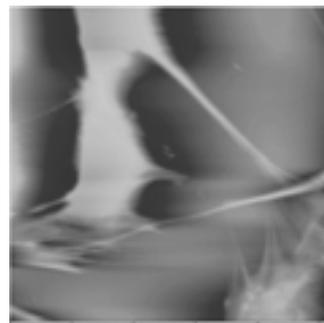
B. t = 10 min



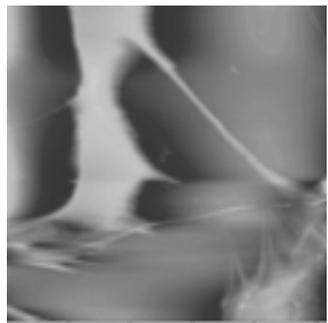
C. t = 15 min



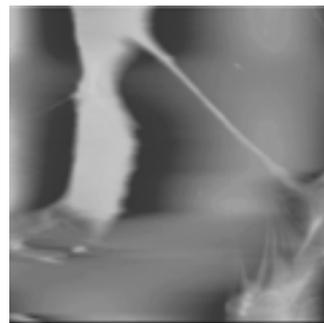
D. t = 20 min



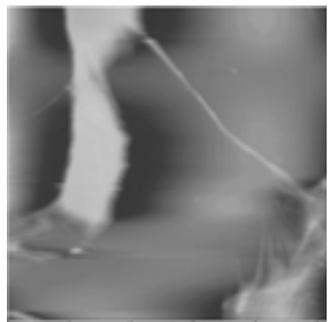
E. t = 25 min



F. t = 30 min



G. t = 35 min



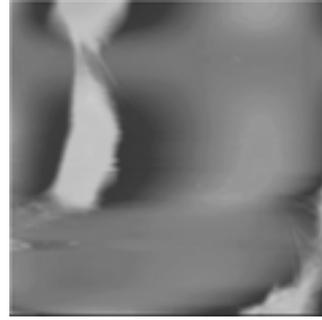
H. t = 40 min



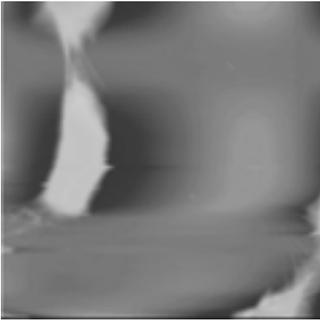
I. t = 45 min



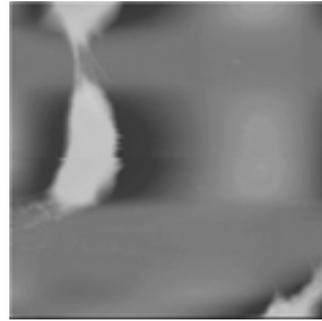
J. t = 50 min



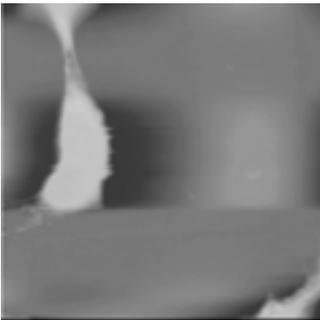
K. t = 55 min



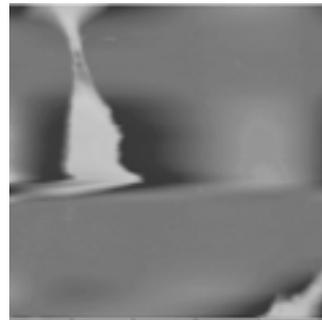
L. t = 60 min



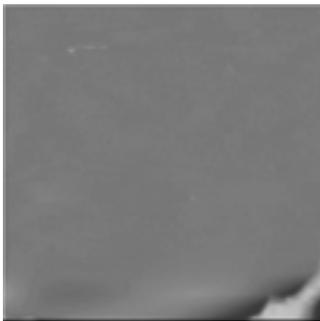
M. t = 65 min



N. t = 70 min



O. t = 75 min



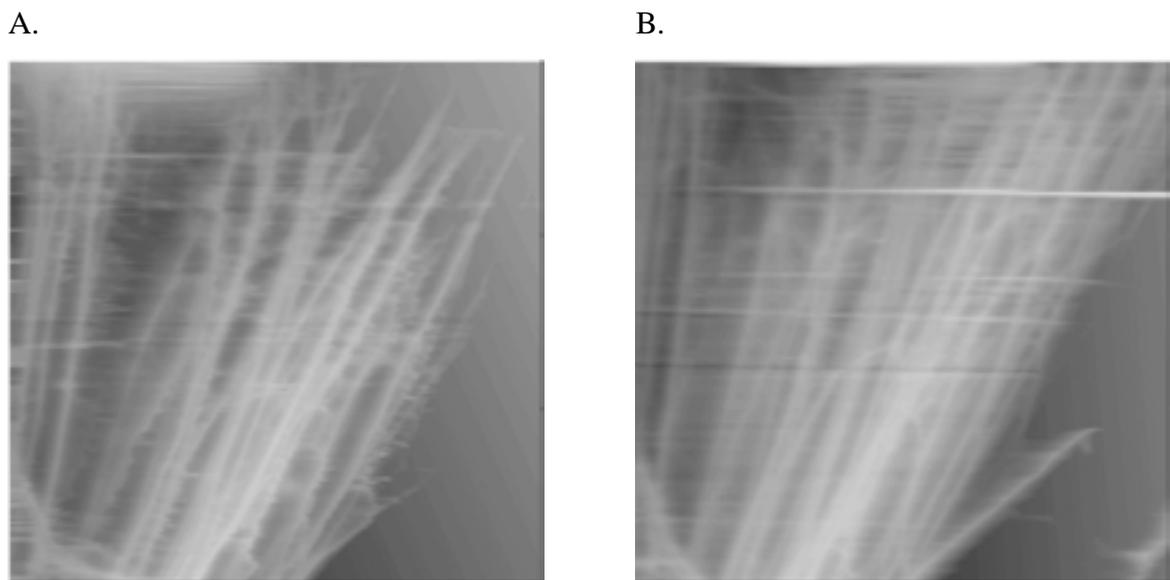
*Figure 49. Dynamique d'ostéoblastes observée in situ en mode contact par l'application d'une force externe minimale par MFA.*

*Les figures A à O sont les images successives en topographie d'une même zone et montrent l'évolution de l'adhérence d'ostéoblastes. L'enregistrement d'une image nécessite 5 min. Le temps est indiqué pour chaque image. Taille des images : 130  $\mu\text{m}$  x 130  $\mu\text{m}$  x 4  $\mu\text{m}$ . Vitesse de balayage : 260  $\mu\text{m}/\text{s}$ .*

De la Figure 49. A. à la Figure 49. E., aucun changement de morphologie des cellules n'est observé. Il est clair, à partir de cette expérience, que la rétraction rapide des cellules dans les 5 premières minutes observée sur la Figure 47 est due à la force exercée par la sonde du MFA.

De la Figure 49. F. à la Figure 49. O., les cellules se détachent progressivement. Plusieurs facteurs peuvent inciter ce détachement ; comme cela est discuté par la suite.

La même expérience d'évaluation de l'adhésion effective d'ostéoblastes déposés sur une surface de protéines adhésives adsorbées sur une surface de silice silanisée a été renouvelée. Exercer une force externe de 4 nN sur ces ostéoblastes ne semble pas perturber la cellule. La cellule est stable et adhérente. Pour examiner l'effet de la force appliquée, une zone de la cellule qui présente un cytosquelette développé a été examinée. Elle est indiquée par une étoile sur la Figure 43.



*Figure 50. Cytosquelette observé à deux forces appliquées différentes par MFA en mode contact. Ces ostéoblastes ont été déposés sur des protéines du sérum de veau fetal adsorbées sur une surface de silice silanisée par de l'APTES. Ces images correspondent à un zoom au niveau de l'étoile indiquée sur l'image de la Figure 43. L'image A a été enregistrée avec une force externe appliquée de 4 nN et l'image B avec une force de 0.4 nN.*

Comme le montre la Figure 50, la cellule reste non seulement toujours attachée à la surface et n'est pas perturbée par l'application d'une forte force, mais les fibres du cytosquelette présentent un plus grand contraste qui est fonction de la force appliquée. Cela

prouve que la cellule est fortement adhérente. La cellule présente encore la même structure cytosquelettique. La réversibilité de ce phénomène i.e. la visualisation de la membrane plasmique a été vérifiée par l'enregistrement sur la même zone de la cellule avec une force minimale appliquée. Dans ces conditions, la membrane plasmique et le cytosquelette sous-jacent sont visualisés par MFA (Figure 50. B.). Davantage de détails sont visibles sur cette image puisque la membrane plasmique et le cytosquelette sont observés en même temps.

La comparaison de l'adhésion des cellules montre que les cellules sont adhérentes sur la surface de Thermanox<sup>®</sup>, tandis qu'elles sont fortement adhérentes sur la surface de protéines adhésives adsorbées.

Il est très difficile d'obtenir des images des ostéoblastes en voie de détachement sur une surface de monocouche RGDC, même en appliquant une force externe minimum (de l'ordre de 0.3 à 0.5 nN) . Les cellules se détachent quand elles sont soumises à cette force. L'adhésion effective d'ostéoblastes sur une surface de peptides RGDC greffés a été évaluée par l'application d'une force. Dans ce cas où la cellule est plus adhérente que celles habituellement observées (Figure 45. C.), il a suffi d'appliquer une force de 1 nN pour provoquer une perte d'adhérence de la cellule et son détachement de la surface. L'enchaînement de la séquence d'observation est montré Figure 45. C. à F.

Ces résultats montrent que sur une surface de peptides RGDC greffés, différents degrés d'adhésion des ostéoblastes existent. Quels que soient les cas, les cellules sont peu adhérentes ou en voie de détachement.

## *ii. Discussion*

La MFA, par l'application d'une force extérieure, permet de détacher des cellules d'une surface pour évaluer leur adhésion puis de suivre la réponse de ces cellules soumises à cette perturbation.

A partir d'indications de forme, d'étalement et de présence ou d'absence de cytosquelette sur la Figure 42. A., la cellule 1 avait été définie comme plus adhérente que la cellule 2. Ces expériences de détachement des cellules le confirment (Figure 47) puisque la cellule 1 est toujours liée à la surface tandis que la cellule 2 s'est détachée après balayage.

L'interprétation des résultats est cependant délicate. Une modification de morphologie de la cellule est certes la réponse de la cellule à une perturbation, mais l'identification de la nature de cette perturbation est difficile. A t'on vraiment un détachement de la cellule provoqué par le balayage de la pointe du MFA ou un mouvement de celle-ci (par exemple, en réponse à un composé situé à proximité) ?

Il est établi que le processus de migration<sup>153,154</sup> de cellules est fortement lié à celui de l'adhésion cellulaire<sup>155,156</sup>. Il correspond à une régulation particulière de l'adhésion cellulaire par un cycle d'attachement et de détachement de la cellule. Schématiquement, trois étapes distinctes peuvent être identifiées dans les mouvements rampants des cellules : la protrusion, dans laquelle des filopodes s'étendent à l'avant de la cellule ; l'attachement, où le cytosquelette d'actine établit une connexion avec la surface, et la traction, où le corps de la cellule se déplace vers l'avant, afin de relâcher une partie de la tension. De nouveaux contacts focaux sont établis et les anciens sont rompus au fur et à mesure que la cellule rampe vers l'avant. La migration cellulaire nécessite donc une force adhésive de la cellule intermédiaire et optimale et un contrôle spatial et temporel à la fois des facteurs cellulaires intrinsèques et des signaux extérieurs captés par les récepteurs en surface de la cellule. Cette situation de mouvement rampant n'est pas observée Figure 47. De plus, Dee *et al.*<sup>151</sup> ont étudié la migration d'une population d'ostéoblastes sur différents peptides adhésifs immobilisés. Les ostéoblastes sont des cellules très peu mobiles. Leur coefficient de diffusion varie de  $1,22 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  à  $2,23 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Au mieux, les ostéoblastes parcourront donc  $30 \mu\text{m}^2$  en 2h40min. En considérant les échelles de temps et la stabilité de l'adhésion cellulaire pour des observations par MFA (de l'ordre de 1h30), le suivi de la migration des ostéoblastes n'est pas détectable et peut donc être exclu de toutes les interprétations de ces résultats.

Une expérience de contrôle a été réalisée. Elle a consisté à observer une cellule avec une force externe appliquée minimale par MFA (Figure 49). Durant les 25 premières minutes d'observation, l'adhésion des cellules à la surface reste identique. Donc, le détachement des cellules a bien été provoqué par une force externe appliquée. Après 30 minutes d'observation, les cellules se détachent progressivement. Plusieurs facteurs peuvent induire ce détachement. Il est possible que le contact de la sonde du MFA au niveau cellulaire au cours du temps provoque un stress aux ostéoblastes. Il faut aussi rappeler que les conditions d'observations de ces cellules sont contraignantes. Le faisceau laser du MFA peut chauffer partiellement les cellules. La température et l'atmosphère (taux d'humidité et de  $\text{CO}_2$ ) ne sont pas optimales pour les cellules. Dans le temps, le milieu liquide peut s'évaporer, ce qui conduit, dans le cas d'un milieu de culture, à une augmentation de la salinité, à une variation du pH et à une possible augmentation de la force externe appliquée à cause du système d'asservissement du microscope. Le signal des photodiodes a dans ce cas été modifié. Ce sont toutes ces conditions limites et ces différents facteurs qui peuvent expliquer la perte d'adhérence des ostéoblastes dans le temps et dont il faut tenir compte dans l'interprétation des résultats.

Pour conclure, ces expériences de détachement des ostéoblastes adhérents à une surface de Thermanox<sup>®</sup>, quoique très qualitatives, fournissent une caractérisation supplémentaire de leur adhésion.

Cette perte d'adhérence des ostéoblastes adhérents à une surface recouverte de protéines adhésives (adsorbées sur une surface de silice silanisée) n'a pas été constatée. Dans ce cas, les cellules sont fortement adhérentes comparées à une surface de Thermanox<sup>®</sup>. Cette expérience de détachement des HOP permet de distinguer un niveau supplémentaire dans la hiérarchisation de l'adhésion des cellules adhérentes. Dans notre étude, bien que les premières observations de l'organisation du cytosquelette soient similaires sur les surfaces de Thermanox<sup>®</sup> et de SVF adsorbées sur de la silice silanisée, le détachement d'une cellule montre des différences dans l'organisation du cytosquelette. La stabilité du cytosquelette soumis à une force externe appliquée indique clairement la possibilité de distinguer différents états d'adhésion cellulaire. Les HOP fortement adhérents ont une forme allongée, présentent un cytosquelette développé qui reste stable et montre une réponse mécanique bien reproductible, comme le montre la séquence Figure 43 et Figure 50.

Le cytosquelette conduit à une visualisation indirecte de l'agrégation des intégrines. Cette agrégation ou « clustering » est typiquement associée avec le recrutement de protéines cytosoliques liant les protéines du cytosquelette et les protéines des voies de signalisation. Les fibres de stress d'actine se lient aux intégrines ainsi qu'à d'autres protéines du cytosquelette comme l' $\alpha$ -actinine, la taline, la paxiline. La vinculine se lie à ces protéines et stabilise les filaments d'actine et les protéines associées du cytosquelette. La vinculine n'interagit pas directement avec les intégrines mais la stabilisation de l'organisation du cytosquelette par la vinculine peut induire une forte adhésion, comme celle observée pour les ostéoblastes adhérents sur une surface de protéines adhésives adsorbées. Les intégrines se lient aux protéines du cytosquelette et la vinculine pourrait stabiliser les protéines associées au cytosquelette. La cellule n'est pas perturbée et reste adhérente à la surface, même si une force est exercée par la sonde du MFA. Inversement, une adhésion plus faible a été observée sur une surface de Thermanox<sup>®</sup>. Cela peut être attribué de la même façon, à l'absence de stabilisation du cytosquelette par la vinculine, à cause de l'absence d'interaction entre les intégrines et la surface de Thermanox<sup>®</sup>. La différence de surface pourrait expliquer l'effet des forces exercées par la sonde du MFA sur le cytosquelette. Le détachement des cellules pourrait être dû au clivage des récepteurs d'adhésion, à la diminution de l'élasticité de la

membrane.... Quel que soit le mécanisme, la modulation des propriétés de la cellule reliée à l'organisation du cytosquelette est différente en fonction de l'état d'adhésion des cellules.

Dans notre étude, l'observation du cytosquelette indique indirectement une agrégation des intégrines qui influence ensuite les fonctions biochimiques et biophysiques de ces récepteurs, essentiellement par un recrutement hiérarchique des protéines cytosoliques sur le site d'agrégation des intégrines. Ces résultats, comparés à ceux obtenus sur les surfaces de Thermanox<sup>®</sup> montrent que sur une surface de peptides RGDC greffés (Figure 45, A, B et C), différents degrés d'adhésion des ostéoblastes existent. Mais quels que soient les cas, l'adhésion est moins forte que sur une surface de Thermanox<sup>®</sup> ou sur une surface de protéines adhésives adsorbées. Les critères de morphologie des cellules et l'absence de structures cytosquelettiques définis précédemment (page 131 à 138) permettent d'établir cette conclusion.

### 1.3. Mesures des propriétés mécaniques des ostéoblastes

#### *i. Méthode d'analyse des résultats*

Comme nous l'avons indiqué lors de l'introduction sur la MFA, les études plus quantitatives de l'élasticité des cellules par MFA sont toutes basées sur le modèle de Hertz<sup>157,158</sup>. Nous avons montré que pour des enfoncements de la pointe notables, de l'ordre ou supérieurs à la centaine de nanomètres, l'utilisation d'une forme conique de la pointe était plus appropriée que la géométrie d'une sphère. Nous rappelons succinctement les quelques notions que nous allons exploiter. La raideur locale de l'échantillon  $k_e$  considéré comme un milieu élastique est donnée par :

$$k_e = G\phi$$

où  $G$  est le module élastique. Pour un cône d'angle au sommet  $\theta = 35^\circ$ , le diamètre  $\phi$  est relié à l'indentation  $\delta$  par la relation :

$$\phi = \frac{8}{\pi} \delta \tan(\theta)$$

Lors de l'obtention d'une courbe de force, le déplacement vertical que nous imposons  $\Delta$  est la somme de la flexion du levier et de l'indentation de la pointe:  $\Delta = \delta_c + \delta$ . Rappelons que pour un type de levier donné, la valeur de la raideur peut présenter une certaine dispersion comme le montrent les analyses de bruit thermique (voir annexe). Par voie de conséquence, la force appliquée déduite des courbes de force  $F = k_c \delta_c$  n'est pas connue précisément.

A partir de la pente de la courbe de force, nous pouvons déduire la raideur du contact puis ensuite évaluer le module élastique grâce à la relation :

$$p = \frac{1}{1 + \frac{k_c}{k_e}} = \frac{1}{1 + \frac{k_c}{G \frac{8}{\pi} \tan(\theta) \delta}}$$

Il existe un autre moyen d'accéder aux réponses mécaniques de la cellule. C'est de relever sur une image à force constante l'indentation de la pointe en différents points. Dans ce cas le module local se déduit de la relation :

$$G = \frac{F}{\frac{8}{\pi} \tan(\theta) \delta^2}$$

Cette méthode possède le grand avantage de pouvoir déterminer directement les variations des propriétés mécaniques de la cellule en fonction de la structure locale identifiée par l'image (Figure 51). Cependant, parce que la cellule se comporte globalement comme un matériau mou, cette méthode a l'inconvénient d'ajouter une incertitude sur la valeur réelle de l'indentation. L'absence de hauteur de référence, qui serait fournie par des zones de la cellule indéformable, fait que les valeurs d'indentation  $\delta$  seront toujours sous-estimées. Cette erreur sera d'autant plus importante que la charge est élevée. Cette sous-estimation de la profondeur d'indentation conduira inévitablement à une sur-estimation du module élastique local.

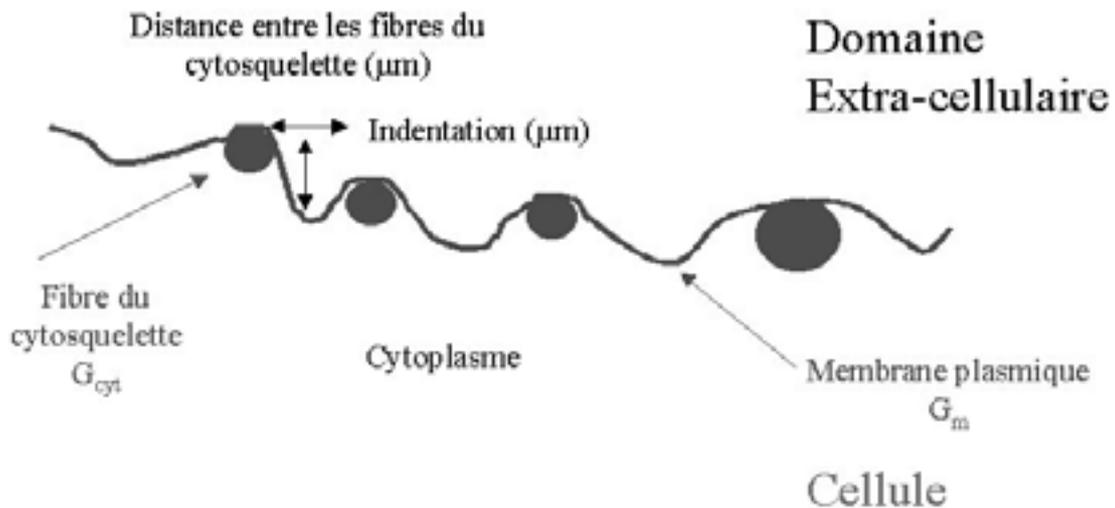


Figure 51 : Représentation schématique en coupe des structures mécaniques d'une cellule.

### ii. Mesures par courbes de force.

Dans la Figure 51 que nous avons présenté, le cytoplasme se comporte comme un liquide et seule la membrane et la structure cellulaire sont susceptibles de tenir une contrainte. Le module de compressibilité de la membrane est déterminé par l'encombrement stérique des lipides. Pour un rayon d'occupation d'un lipide de  $a=0,8$  nm, le module de compressibilité est donné par :  $G_C \sim k_B T / a^3 = 4 \cdot 10^{-21} / 0,5 \cdot 10^{-27} \sim 10^7$  Pa. La courbure de la membrane est gouvernée par le module de flexion. L'écart à la planéité de la membrane conduit à une variation d'énergie par unité de surface  $\Delta E \sim 10^{-20} \text{J} / R^2$ . Le module de flexion correspondant sera donné par  $G_B h^3 \sim 10^{-20} \text{J}$ . Avec une épaisseur de membrane  $h = 5$  nm, cela conduit à  $G_B \sim 10^5$  Pa. La différence entre les modules élastiques autorise à considérer la membrane comme un milieu continu et homogène. Au moins pour les petites déformations, on pourra analyser son comportement comme celui d'une surface élastique analogue à une peau de tambour. Pour les enfoncements élevés, plusieurs centaines de nanomètres, voire un micron, il est probable que la membrane subisse des réorganisations internes sortant du cadre de cette évaluation. Pour le cytosquelette, nous considérons des modules élastiques de l'ordre de  $10^8$  Pa. C'est par exemple la valeur que l'on peut déduire des mesures sur les microtubules.

D'une façon générale, cette description est trop simplificatrice. D'une part la membrane n'est pas une simple bicouche lipidique, et ses propriétés mécaniques vont varier de place en place aussi bien à cause de variations dans sa constitution que de variations dans son épaisseur. D'autre part, le cytosquelette n'est pas constitué d'un simple réseau de fibres qui

renforce la structure de la cellule. C'est un réseau dont la réponse peut être viscoélastique. Dans ce cas, l'approche que nous employons, qui est une approche décrivant un état d'équilibre, ne permet pas de prendre en compte une éventuelle évolution temporelle de la réponse du réseau. Par ailleurs, ces fibres ont un comportement dynamique qui implique que le réseau peut modifier ses propriétés en fonction de la contrainte imposée.

Dans le cadre de cette étude, la complexité de ces réponses peut être difficilement abordée. Dans le but d'être plus quantitatif, nous présentons dans un premier temps des mesures réalisées sur une bicouche lipidique supportée puis un ensemble de courbes de force réalisé sur des ostéoblastes. Dans ce cas, l'évolution de la flexion du levier en fonction du déplacement de la céramique piézo-électrique n'autorise pas son exploitation à partir des modèles que nous avons présentés. Cependant, nous montrerons quelques courbes sélectionnées qui sont susceptibles d'être analysées à l'aide du modèle de Hertz.

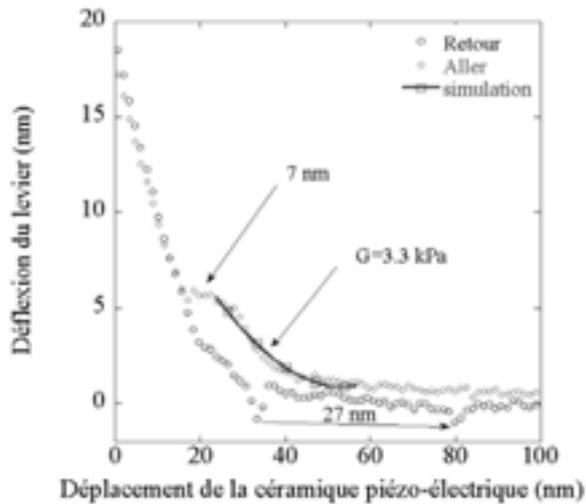
### **Estimation du module élastique de la membrane plasmique : Exploitation de courbes de force enregistrées sur une bicouche supportée de POPC.**

Une bicouche supportée de phospholipides a été déposée sur une surface de mica. La présence de la bicouche supportée de POPC a été mise en évidence par l'absence d'adsorption de la sous-unité  $\beta$  de la choléra toxine rajoutée dans le tampon. En effet, Mou *et al.* <sup>159</sup> ont montré que la sous-unité  $\beta$  de la choléra toxine s'adsorbe sur une surface de mica, et non sur une bicouche lipidique.

En effectuant une courbe de force, lors de l'approche, on distingue assez facilement deux domaines sur ces courbes de force : une zone de croissance non linéaire lorsque la pointe se trouve dans la bicouche, puis une zone dont la pente tend vers 1 correspondant à la valeur de calibration pour les surfaces dures. Cette dernière situation qui permet d'obtenir un comportement de référence sur la même courbe, correspond au contact de la pointe avec la surface de mica.

Les mesures de hauteur réalisées sur les images nous donnent des épaisseurs de 4 et 8 nm (Figure 52 A. et B.). Ces épaisseurs indiquent que dans un cas nous avons une bicouche, dans l'autre deux bicouches.

A.



B.

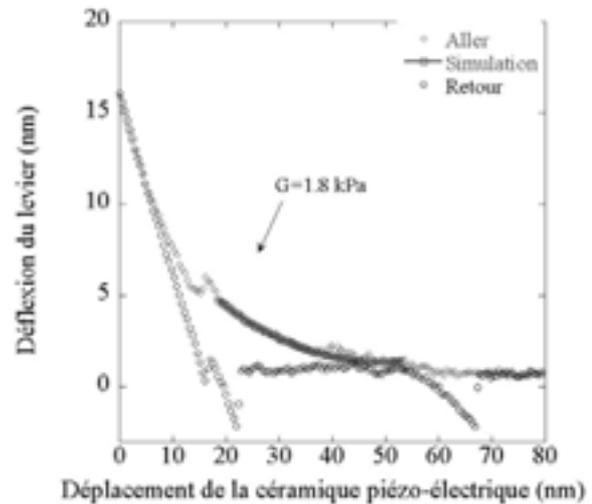


Figure 52. Courbes de force enregistrées sur une bicouche lipidique (A) ou sur une double bicouche lipidique (B) de POPC dans un tampon Tris 10 mM, KCl 1 M, CaCl<sub>2</sub> 2 mM pH 7.4

Cependant, les courbes « aller » montrent une indentation dans un matériau mou correspondant à un déplacement vertical d'une vingtaine de nanomètre dans le premier cas et d'une trentaine de nanomètre dans le second. Ceci indique clairement que l'épaisseur de phospholipides entre la pointe et la surface est bien supérieure à la valeur d'une bicouche ou d'une double bicouche. Une telle situation apparaît dans le cas où des phospholipides se fixent sur la pointe. Les courbes de retour renforcent cette hypothèse en montrant systématiquement au moins deux instabilités séparées par une trentaine de nanomètres. Compte tenu d'une interaction attractive très faible, la première instabilité correspond à la rupture d'un col formé entre la pointe et la surface. Cela ne signifie pas pour autant la disparition complète de chaînes, c'est ce que montre la seconde instabilité. Ce type de situations a été souvent rencontré dans le cadre de l'étude d'un col de PDMS piégé entre la pointe et la surface (Figure 53)<sup>160</sup>. La formation d'un col se comprend avec le fait que la partie hydrophobe des phospholipides préfère se coller à la pointe, ainsi la stabilité du col résulte, lors de son étirement, entre une compétition d'une force capillaire, tension de surface de la partie hydrophobe en contact avec l'eau, et sa force élastique de façon similaire à ce qui fût observé sur le col de PDMS à l'air. Nous devrions faire face au même type de recouvrement de pointe

lors des mesures sur les cellules. Cependant, nos vérifications sur des surfaces dures n'ont jamais mis en évidence une pollution notable des pointes.

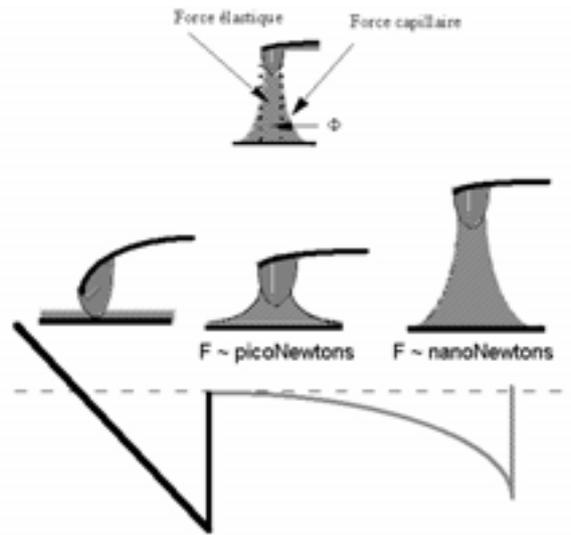


Figure 53. Représentation schématique du recouvrement de la pointe du MFA par des phospholipides.

Les modules que nous déduisons sont de 3,3 kPa et 1,8 kPa respectivement pour la bicouche et la double bicouche. Notons que ces mesures ne reflètent pas la situation mécanique d'une membrane cellulaire. La déformation que nous imposons oblige les phospholipides de la bicouche à se réarranger à l'intérieur de la membrane alors que dans le cas de la cellule, la membrane repose sur le cytoplasme et peut se déformer élastiquement au moins pour les faibles indentations. Une mesure plus adéquate aurait été de travailler sur une vésicule géante. On peut formuler l'hypothèse que, dans ce cas, le module mesuré eût été plus faible.

### **Courbes de force enregistrées sur un ostéoblaste**

La Figure 54 présente une succession de courbes de force enregistrées à plusieurs hauteurs. Ces différences de hauteur sont contrôlées par l'action du moteur pas à pas utilisé lors de l'approche de la surface. Ces mesures sont réalisées a priori au même endroit de la cellule, puisque nous avons conservé les mêmes valeurs de tension des positionnements en X et Y de la céramique piézo-électrique.

Cependant, comme nous l'avons constaté à maintes reprises lors de mesures en mode image, les dérives mécaniques sont souvent notables et déplacent la position de la pointe par

rapport à la cellule. Cela est d'autant plus vrai quand on actionne le moteur pas à pas. De la première courbe à la dernière on rapproche la cellule vers la pointe. Sur les premières courbes on observe des ondulations du levier de l'ordre de la vingtaine à la trentaine de nanomètres. Cela peut correspondre à des fluctuations dynamiques de la membrane qui entrent en contact plus ou moins prononcé avec la pointe. Lorsque que la cellule est rapprochée, on voit apparaître une pente régulière puis à nouveau des pentes proches de zéro voire négatives. Cela peut correspondre au fait que l'on pousse latéralement la cellule, à cause de l'angle d'inclinaison du levier, et que l'on perd un contact bien identifié. La dernière courbe correspond à une courbe d'indentation plus usuelle, et c'est sur ce type de courbe que nous avons réalisé les ajustements avec le modèle de Hertz.

Sur la Figure 55, nous montrons une série de courbes que l'on peut comparer à la courbe de force effectuée sur une surface dure, dans le cas présent le Thermanox<sup>®</sup> (Figure 55. A.). La sonde du MFA touche la surface puisqu'une pente égale à 1 est relevé sur la courbe. De plus, une différence entre les courbes « aller » et les courbes « retour » est systématiquement observée. Les pentes à l'aller et au retour ont une allure différente, avec un comportement quasi linéaire lors du retour. Ces différences indiquent que la cellule conserve une mémoire de la déformation imposée. Néanmoins, la succession de ces courbes montre que la cellule se réorganise pour donner des réponses similaires. Une estimation des modules nous donne des valeurs entre 400 et 800 Pa.

Sur la Figure 56, nous montrons un comportement plus riche et plus complexe. La première zone correspond à une absence de contact, puis le levier défléchit nettement pour ensuite annuler sa flexion. Ces courbes suggèrent que la pointe rencontre un matériau plus dur, puis il s'opère un glissement et le levier ne rencontre plus de résistance. Dans certains cas, une hystérésis est observée, analogue à celle que l'on peut obtenir quand la pointe emporte avec elle des polymères.

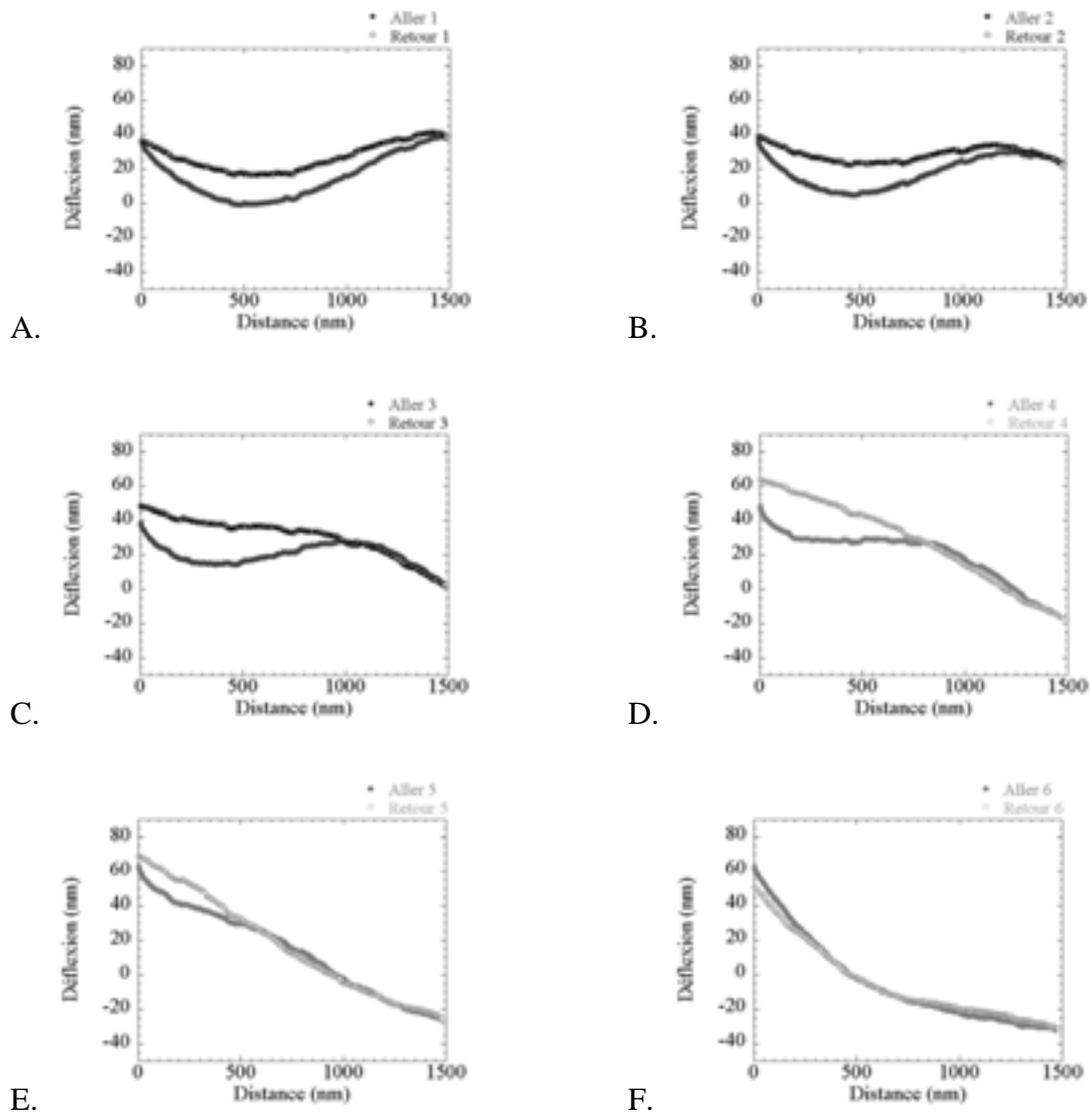
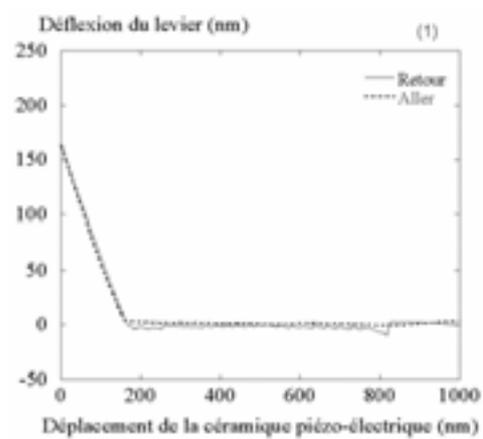
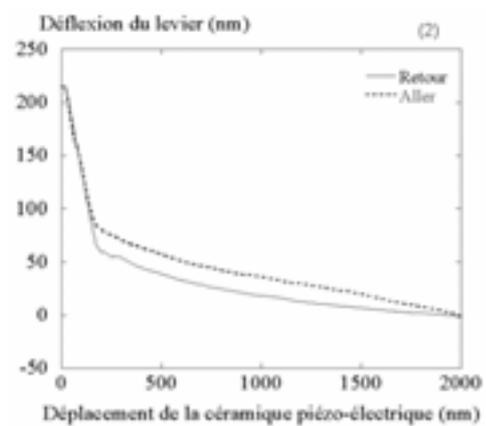


Figure 54. Courbes de force enregistrées successivement sur un ostéoblaste déposé sur une surface de Thermanox®.

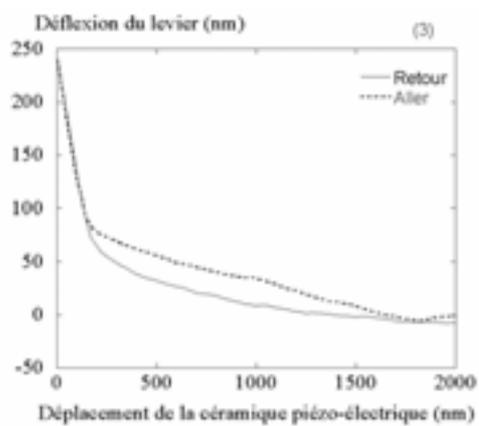
A.



B.



C.



D.

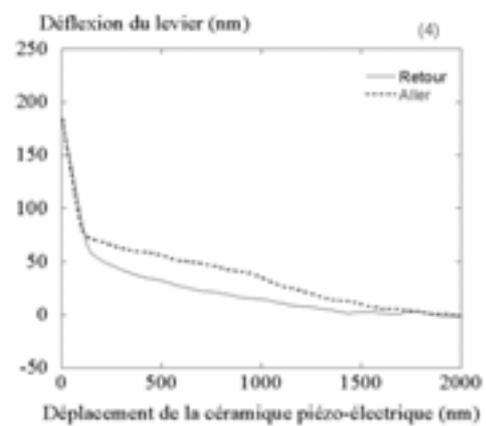
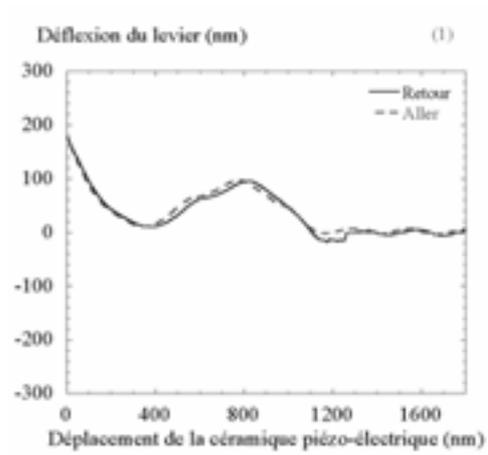
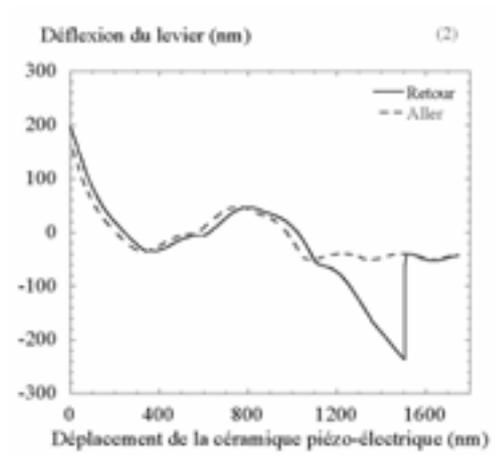


Figure 55. Courbes de force enregistrées sur une surface de Thermanox<sup>®</sup> (A) et sur un ostéoblaste déposé sur une surface de Thermanox<sup>®</sup> (B, C, D).

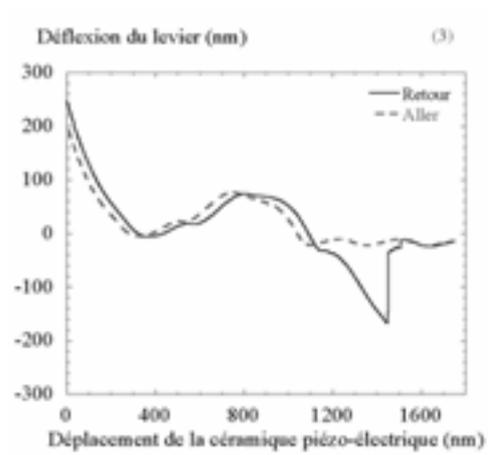
A.



B.



C.



D.

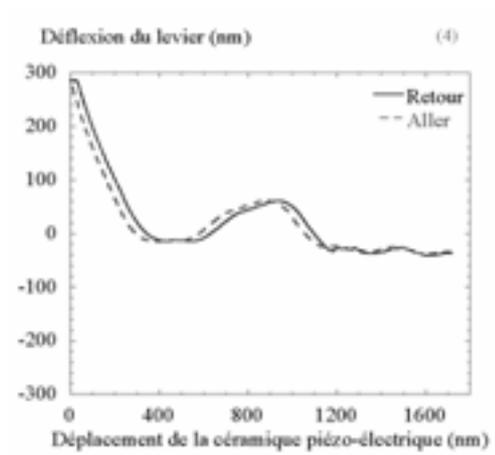


Figure 56. Autres exemples de courbes de force enregistrées sur un ostéoblaste déposé sur une surface de Thermanox®

Nous présentons par la suite des ajustements sur les courbes de force montrant des variations régulières et reproductibles. Dans ces cas, l'exploitation des modèles est utile. Ainsi, la Figure 57 montre une superposition de courbes de forces et la simulation de leur comportement à partir du modèle de Hertz.

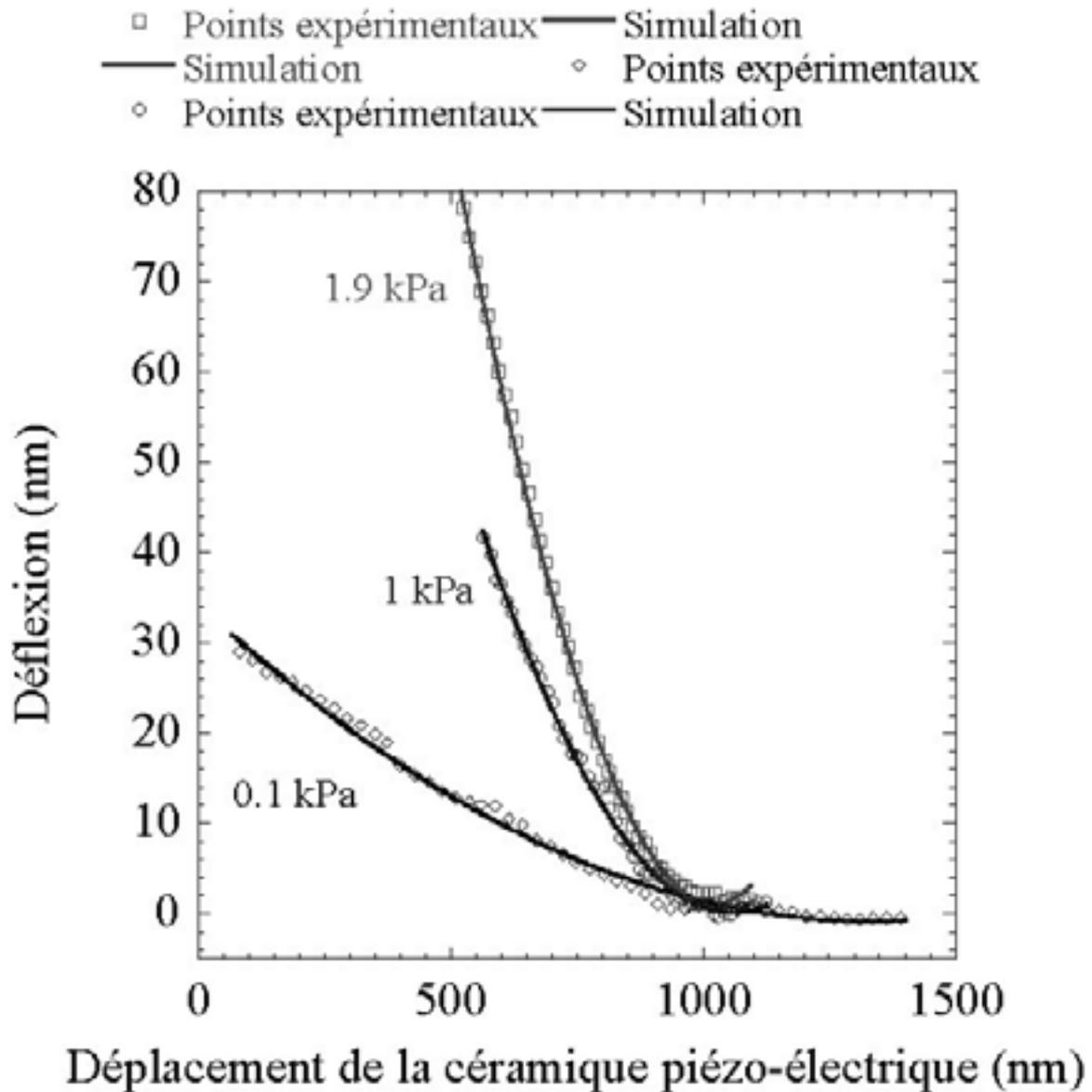


Figure 57. Courbes de force et simulations du comportement de ces courbes (à partir du modèle de Hertz avec une pointe de forme conique) sur un ostéoblaste déposé sur différentes surfaces (Thermanox<sup>®</sup>, Silice+APTES+SVF et Silice+RGDC). Le module élastique  $G$  est indiqué près de chaque courbe. Les points correspondent aux résultats expérimentaux et les traits continus à leurs simulations.

On voit très clairement une grande variation des valeurs de pente. Cela est dû à la diversité des réponses mécaniques des cellules en fonction de la situation de la cellule (i.e. la nature de la surface où a été déposée la cellule). La compréhension des réponses mécaniques d'un milieu aussi complexe que celui d'une cellule est difficile à partir de ces courbes de force.

Compte tenu de la grande dimension du balayage de la céramique piézo-électrique et des dérives constatées, il nous est difficile, voire impossible, d'identifier exactement son positionnement en (X,Y). Ceci est particulièrement vrai quand la gamme des déplacements possibles de la céramique est inférieure à la taille des ostéoblastes. Ces incertitudes et la dispersion des valeurs des pentes nous ont conduit à rechercher une autre approche de mesure du module élastique à partir des images obtenues. Comme nous l'avons indiqué dans l'introduction, c'est cet autre moyen, plus simple, et plus immédiat, qui permet de relier les différences de propriétés mécaniques de la cellule à sa structure locale. L'image fournit la valeur du module élastique correspondant à un endroit choisi sur la cellule. Le contraste d'une image de MFA intègre à la fois les caractéristiques topographiques de la cellule et les variations locales de ses propriétés mécaniques. Cette situation est obtenue dans le cas d'un bon asservissement de la sonde du MFA. Dans ce cas, un profil d'indentation à force constante obtenu à partir d'une section sur l'image nous renseigne directement sur les propriétés mécaniques de la cellule. Son élasticité peut être composée de la raideur de la membrane plasmique uniquement ou de celle cumulée des structures intracellulaires (comme le cytosquelette, si elles sont présentes dans la cellule) à la fois à cause de leur rigidité structurale ou de la déformation de la membrane plasmique autour de ces structures.

### *iii. Etude des propriétés mécaniques à partir des images.*

#### **Analyse de sections d'images en fonction de la charge.**

Les images du comportement mécanique des cellules suggèrent de nombreuses modulations de leurs propriétés intérieures qui sont reflétées par la visualisation du comportement du cytosquelette des cellules adhérentes. L'organisation du cytosquelette peut être suivie en effectuant des sections dans le plan (X,Y) sur différentes zones d'une cellule à partir des images obtenues à deux forces externes appliquées différentes.

Un exemple de détails qui sont révélés par ce traitement des images est montré sur deux cas de cellules adhérentes : sur une surface de Thermanox® (Figure 58) et sur une surface de silice silanisée biofonctionnalisée par des protéines du SVF adsorbées sur cette surface (Figure 59).

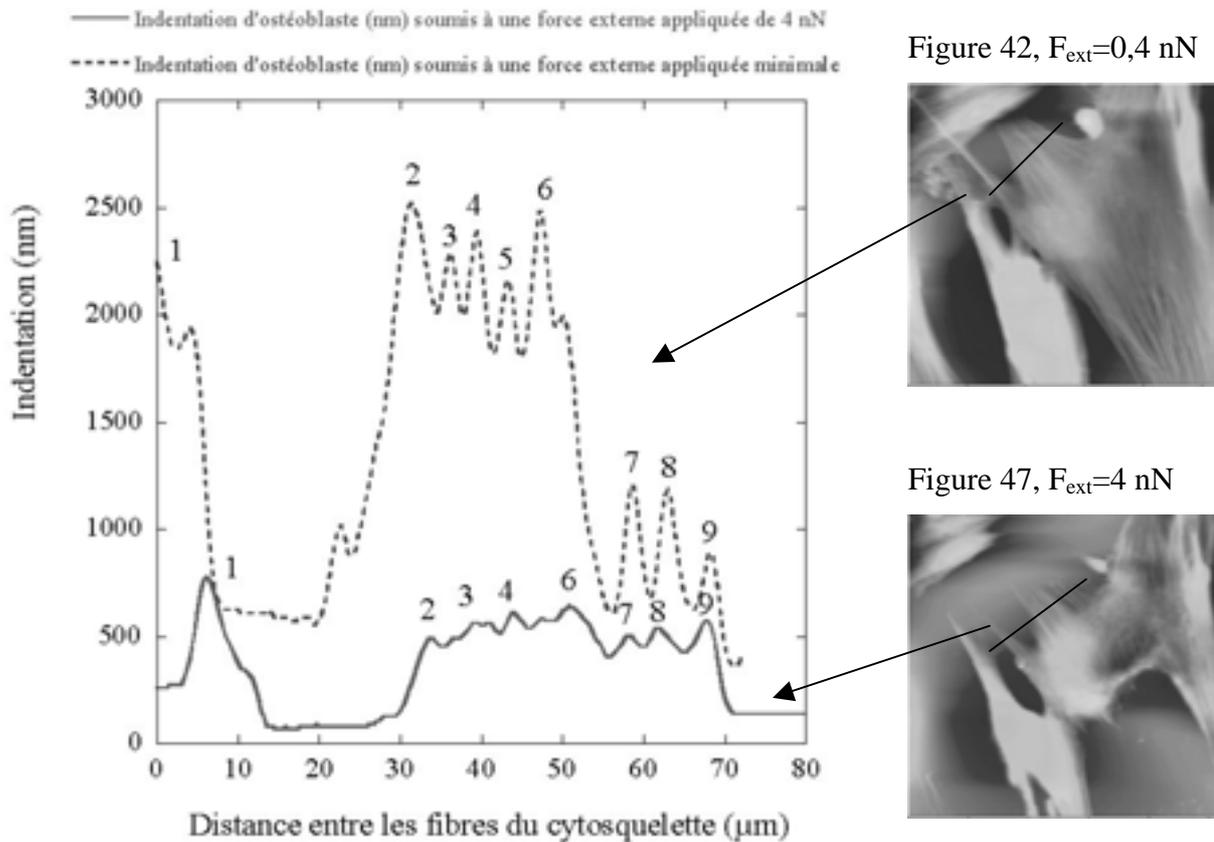


Figure 58. Indentation dans les fibres du cytosquelette de la cellule montrée Figure 42. A. et Figure 47. B. et enregistrée à différentes forces externes appliquées. L'indentation a été mesurée à l'extrémité des fibres du cytosquelette. Les numéros reportés sur le graphe sont donnés à titre indicatif pour faciliter la comparaison et le commentaire des courbes.

Sur la cellule faiblement adhérente (Figure 58), chaque pic est attribué à une fibre de stress du cytosquelette. L'application d'une force externe entraîne une modification du contraste sur la cellule et la disparition de certaines fibres du cytosquelette. Quand la force externe est variée, l'emplacement et l'agencement des fibres du cytosquelette sont modifiés. Ainsi pour les sections reportées dans la Figure 58, la position des fibres du cytosquelette n'est pas exactement la même pour les deux charges appliquées, comme le montre la comparaison des pics numérotés 2 à 6 par rapport aux pics 7 à 9. Par contre, leur orientation

est identique. D'ailleurs, le parallèle des pics 2 à 6 à deux forces exercées n'est pas facile à établir. Les numéros ont été marqués à titre indicatif pour faciliter la comparaison des courbes. Les pics a et b apparaissent lorsqu'une force externe est appliquée mais ne sont pas bien définis. Les pics 1, et 7 à 9 sont plus facilement identifiables. Ces mêmes fibres sont observées quel que soit la force appliquée. La même structure du cytosquelette persiste, bien qu'à forte force exercée, les fibres soient plus courtes qu'à faible force exercée.

Figure 43,  $F_{\text{ext}}=0,4\text{nN}$

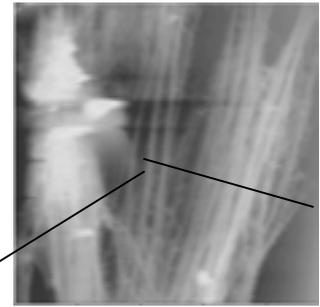


Figure 50,  $F_{\text{ext}}=4\text{nN}$

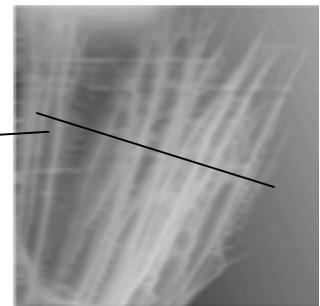


Figure 50,  $F_{\text{ext}}=0,4\text{ nN}$

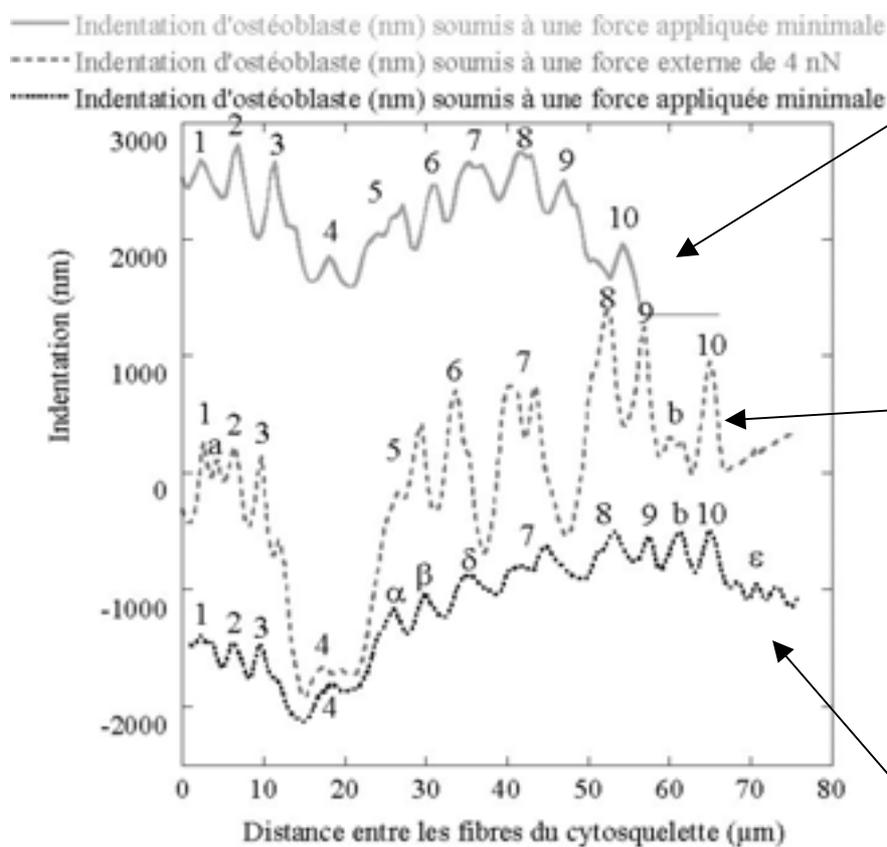
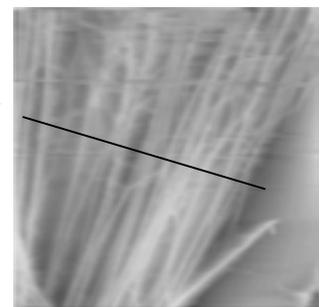


Figure 59. Profil d'indentation d'ostéoblaste en fonction de la force externe appliquée. Les indentations ont été mesurées aux extrémités des fibres du cytosquelette dans la zone marquée d'une étoile sur la Figure 43 et sur les images de la Figure 50. A. et B., exactement aux mêmes endroits. Les profils ont été traduits dans le plan (X,Y). De haut en bas sur le graphe, des forces de 0.4 nN, 4 nN et 0.4 nN ont été successivement appliquées.

L'hypothèse dans ce cas est la correspondance d'une même fibre du cytosquelette à différentes forces appliquées.

Pour les surfaces présentant des protéines adhésives adsorbées et pour lesquelles la cellule montre une structure cytosquelettique stable, les profils sont donnés Figure 59. Chaque pic correspond à une fibre du cytosquelette. Les conclusions concernant l'étalement et la stabilité de la cellule déjà énoncées à partir des images peuvent être retrouvées. La comparaison des profils à forte et à faible force appliquée met en évidence un contraste plus accentué avec une visualisation plus nette à forte charge du cytosquelette sous-jacent. La membrane plasmique et le cytosquelette apparaissent à faible force appliquée, tandis qu'à forte force appliquée, le cytoplasme est plus indenté et la membrane disparaît. Par contre, quelle que soit la force appliquée, la même structure cytosquelettique persiste dans la cellule. A cause de la forte adhésion de la cellule sur la surface et de l'élasticité de la membrane plasmique, la réversibilité de la visualisation de la membrane plasmique est constatée (Figure 59). Lorsque l'on effectue à nouveau une faible force, un profil d'indentation tout à fait similaire à celui obtenu lors des premiers balayages est observé. De plus, il existe un strict parallèle entre l'organisation du cytosquelette en terme de nombre de fibres du cytosquelette, de leur position et de leur orientation sur la surface. Les profils ont été réalisés exactement aux mêmes endroits sur les Figure 50. A. et B. Le nombre de fibres est presque le même. Une tentative de suivi des différents fibres du cytosquelette en fonction de la charge est réalisée en notant les épaulements. Seul trois pics (notés  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\delta$ ) observés à faible force appliquée correspondent à deux pics (notés 5 et 6) observés à forte force appliquée. Cependant, les ostéoblastes adhérents résistent à une forte force appliquée sans que leur cytosquelette semble en être affecté puisque nous obtenons à nouveau les mêmes résultats après la réalisation d'une image à faible force. Ce point sera confirmé dans le paragraphe qui suit lors du tracé des profils d'indentation en fonction de la distance entre fibres.

### **Profil d'indentation en fonction de l'espacement des fibres.**

On peut utiliser les sections d'images sur les cellules montrées précédemment pour extraire des profils d'indentation en fonction de la distance entre les fibres du cytosquelette. Du fait de l'absence de référence de hauteur non déformée de la cellule, les profondeurs d'indentation que nous avons relevées sont nécessairement plus faibles que l'enfoncement réel. En conséquence, les modules extraits de ces données seront surestimés et nous nous concentrerons sur l'identification de l'évolution relative de ces indentations en fonction de la charge et de l'espacement entre les fibres.

### *Cellules fortement adhérentes*

Afin d'extraire les comportements principaux, nous discuterons en premier lieu du cas des cellules fortement adhérentes pour lesquelles la structure du cytosquelette est bien définie et la plus stable. Les profils d'indentation sont donnés dans la Figure 60, où les variations d'indentation (localisées au milieu de deux fibres du cytosquelette) ont été reportées en fonction de la distance entre les fibres du cytosquelette.

Ces mesures montrent généralement une croissance régulière de l'indentation avec la distance entre les fibres, puis un plateau correspondant à une saturation de l'indentation pour de grandes distances entre fibres. Ces résultats sont bien reproductibles. La première image a été obtenue à faible charge de 0,4 nN (profil 1), puis à une charge importante de 4 nN (profil 2), puis à nouveau à la même charge que pour la première image (profil 3). Les évolutions 1 et 3 sont quasi identiques, indiquant que la cellule, au moins pour ce qui est de sa réponse mécanique, est revenue dans le même état après l'application de la forte charge.

Le domaine de croissance régulière varie en fonction de la charge appliquée. Pour la plus forte charge, nous ne notons pas la présence d'un plateau. Le dernier profil, noté 4, correspond à la charge la plus faible, approximativement la moitié de la charge faible soit  $F \sim 0,2$  nN (juste en dessus de la limite du décollement). Pour cette charge, le plateau apparaît pour une distance entre les fibres du cytosquelette plus petite. Il est à noter que l'ensemble de ces relevés (y compris pour les cellules moins fortement fixées sur la surface que nous montrons par la suite) a été effectué de telle sorte que la profondeur d'indentation soit toujours inférieure à la hauteur de la cellule ; cela afin d'éviter que la présence d'un plateau résulte de l'interaction sonde du MFA/surface sous-jacente.

La saturation pour une grande distance entre les fibres est attendue. Lorsque la distance entre les fibres est suffisamment grande, la sonde du MFA n'est plus sensible à leur présence, et elle s'enfonce d'une valeur constante, uniquement due à la réponse élastique de la membrane plasmique et éventuellement du cytoplasme sous-jacent. L'apparition d'un plateau à différentes hauteurs, voire sa non apparition, s'explique assez bien, au moins qualitativement, en prenant en compte l'effet de taille de la pointe. Le diamètre de l'aire de contact varie comme le produit de l'indentation par la tangente de l'angle au sommet. Plus la charge est forte, plus la pointe s'enfonce et est susceptible d'entrer en contact avec des fibres plus éloignées. Pour la plus faible charge, la valeur de l'indentation se situe aux alentours de 300 nm. En exploitant la relation de Sneddon, on obtient un module pour la membrane de l'ordre de 1500 Pa.

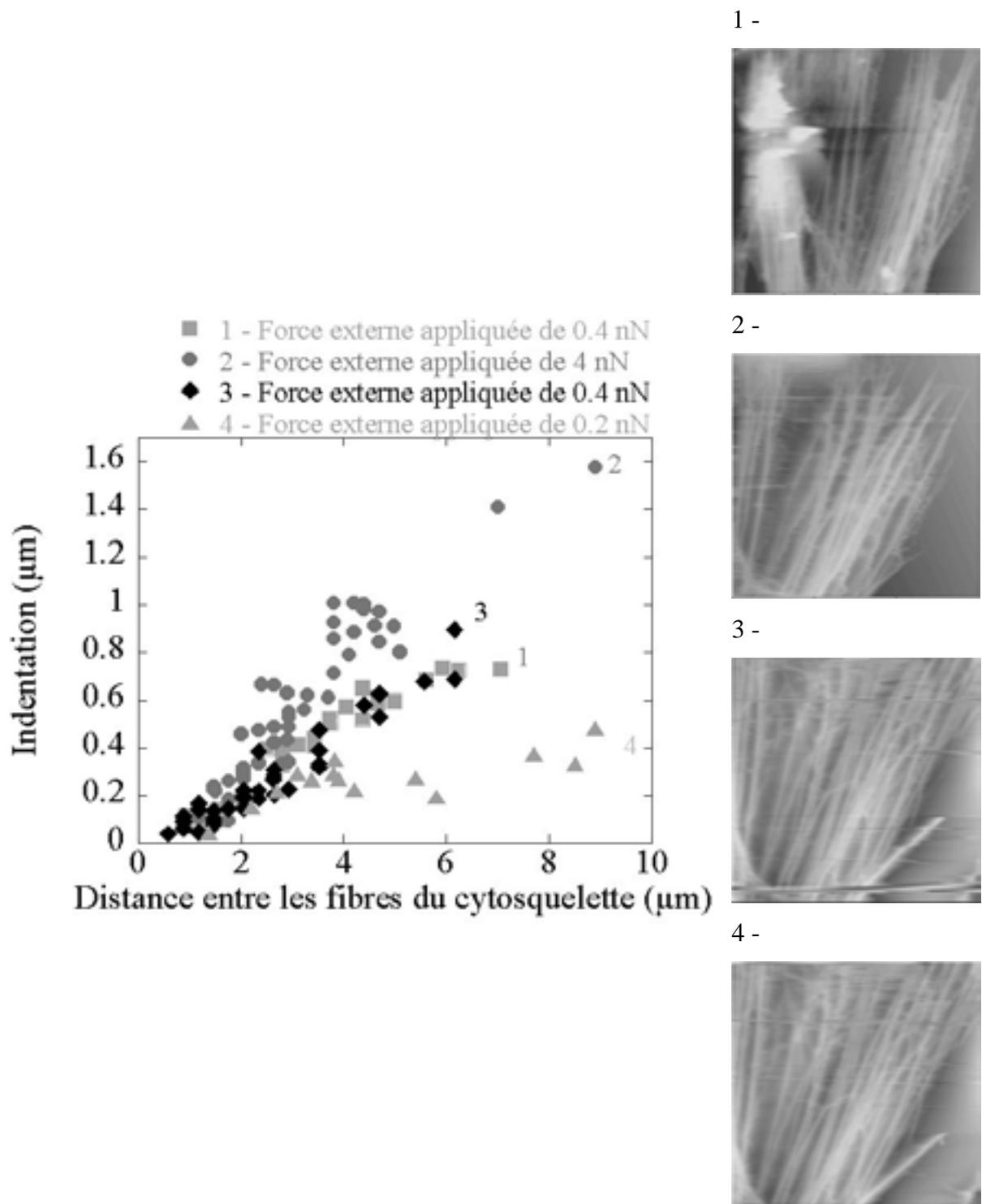


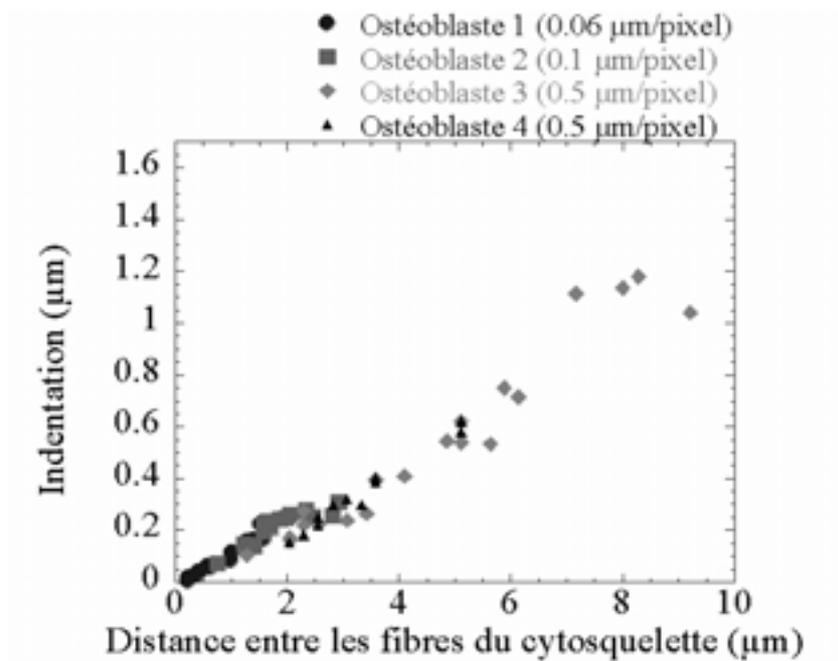
Figure 60. Indentation d'ostéoblaste en fonction de la distance entre les fibres du cytosquelette, suivant la force externe appliquée. L'indentation a été mesurée à partir de profils réalisés sur les images des Figure 43 et Figure 50.

La croissance régulière de l'indentation indique l'influence de la réponse du cytosquelette. L'accroissement de la pente avec la charge souligne l'importance relative de la distance entre fibres et du diamètre de la surface de contact. Pour les faibles charges, l'indentation sera plus faible. Il en est de même pour l'aire de contact. Si la croissance de l'indentation est principalement gouvernée par le cytosquelette, on s'attend à observer une pente qui augmente avec la charge ; c'est qui est observé. Ainsi, nous classerons ces évolutions en deux domaines, l'un lors de la croissance de l'indentation en fonction de la distance entre les fibres principalement gouverné par la réponse mécanique du cytosquelette, l'autre correspondant à l'émergence d'un plateau dont la hauteur est gouvernée par le module élastique de la membrane cellulaire.

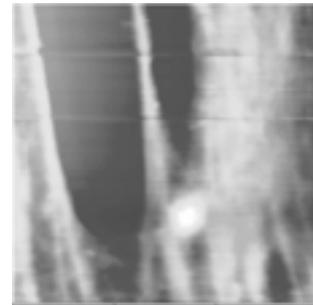
Ces comportements montrent bien la raison pour laquelle nous observons une grande dispersion dans les valeurs de pentes obtenues par courbes de force. Ils montrent également que, dans la plupart des cas, les mesures par courbes de force ne seront pas appropriées, puisque la raideur observée est susceptible d'évoluer en fonction de la charge appliquée. Ainsi par exemple, pour une distance entre fibres de 4 microns, on trouve une indentation de 250 nm pour une force externe appliquée de 0,2 nN, une indentation de 500 nm pour une force de 0,4 nN, et de 900 nm pour une force de 4 nN. Ces valeurs d'indentation conduisent, en appliquant la formule de Sneddon, à des modules élastiques de 1.8 kPa, 0.9 kPa et 2.8 kPa respectivement. Ce résultat est la conséquence de l'effet combiné d'un milieu hétérogène et de l'effet de taille de la pointe.

Avant de comparer ces profils à ceux obtenus pour des cellules présentant une adhérence moins grande, ces expériences ont été renouvelées avec des cellules fortement adhérentes déposées sur une surface de Thermanox<sup>®</sup> biofonctionnalisée par du SVF. L'un des objectifs était d'améliorer la résolution d'une image en augmentant le nombre de points de mesure pour le relevé des valeurs d'indentation. Des enregistrements d'images pour différentes tailles ont été réalisés. Les profils d'indentation et les images correspondantes sont montrés Figure 61.

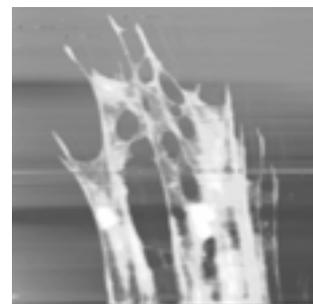
Pour une image à la résolution de 0,06  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ , les points relevés pour de faibles indentations sont moins dispersés que ceux relevés sur une image à la résolution de 0,1  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ . Le but principal était d'augmenter la précision sur la détermination des pentes de croissance qui se situent aux faibles valeurs de distance entre fibres. Dans tous les cas, les tendances dégagées restent les mêmes (Figure 61). Comme le montrent les différents relevés, les pentes observées se recouvrent de façon très robuste.



1-



2 -



3 et 4 -

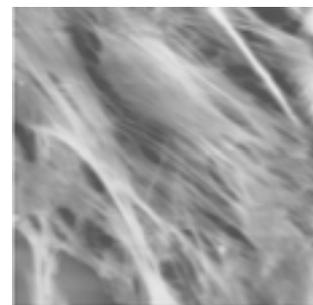


Figure 61. Profil d'indentation des fibres du cytosquelette en fonction de leur distance, à force externe appliquée minimale et à différentes résolutions. L'indentation a été mesurée sur des ostéoblastes adhérents à une surface de Thermanox® biofonctionnalisée par du SVF. Les images n'ont pas été montrées par ailleurs. Elles sont reportées près de ce graphe. Sur la dernière image, deux ostéoblastes ont été distingués.

*Cellules adhérentes ou faiblement adhérentes.*

Sur les cellules non fortement fixées sur la surface ou faiblement adhérentes, une étude similaire est beaucoup plus délicate à réaliser puisque le comportement de la cellule elle-même est beaucoup plus sensible aux forces appliquées. De fait, il nous fut impossible d'effectuer des mesures autres que celles réalisées à très faibles charges.

Nous présentons les quelques cas où il nous a été possible de relever une évolution de l'indentation en fonction d'une structure du cytosquelette plus ou moins marquée. Il s'agit de cellules déposées sur le Thermanox<sup>®</sup> (Figure 62, Figure 64) et sur des surfaces biofonctionnalisées par le peptide RGDC (Figure 62).

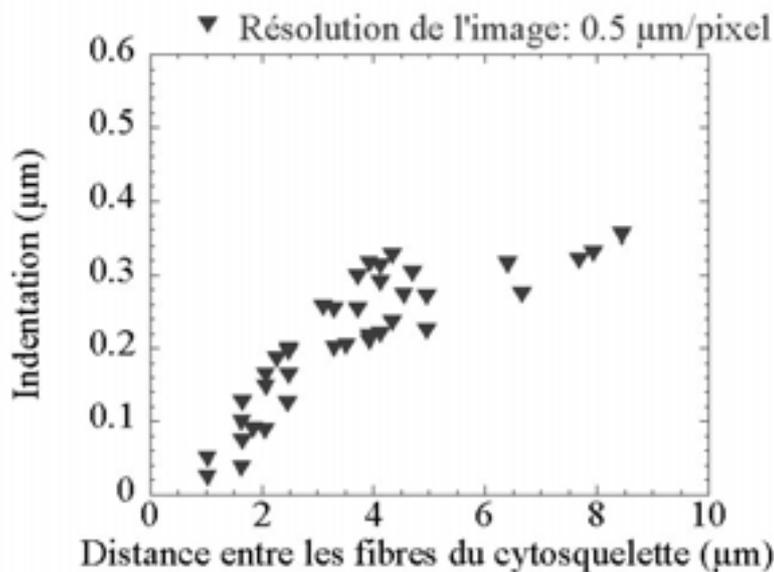


Figure 42



Figure 62. Profil d'indentation des fibres du cytosquelette en fonction de leur distance, à force externe appliquée minimale. L'indentation a été mesurée sur l'image de la cellule de la Figure 42. A.

Dans le premier cas, on observe nettement une croissance puis l'émergence d'un plateau (Figure 62). Ce comportement est similaire à celui observé pour les faibles charges sur les cellules fortement adhérentes. Dans les autres cas, la pente est très faible (Figure 62, Figure 64). Lorsqu'on ne peut pas détecter un accroissement marqué de l'indentation en fonction de l'espacement entre les fibres, cela suggère une influence de la réponse du cytosquelette nettement moins importante, ou un mélange indiscernable entre les propriétés mécaniques de la membrane et du cytoplasme par rapport au cytosquelette.

Figure 45

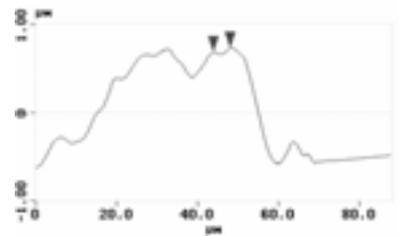
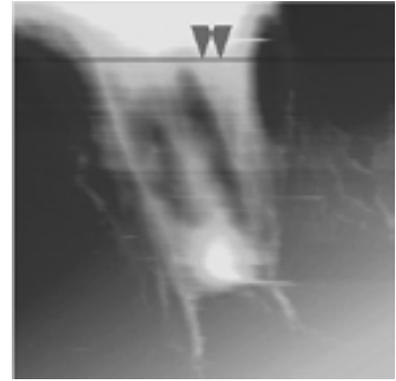
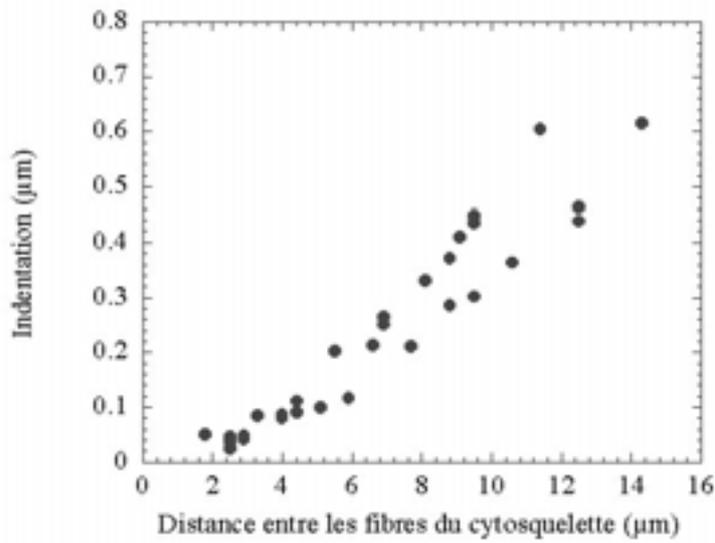


Figure 63. Graphe d'indentation d'un ostéoblaste déposé sur des peptides RGDC greffés sur de la silice, à force externe appliquée minimale (0.2 nN). L'indentation a été mesurée sur l'image de la cellule de Figure 45.

Comme précédemment, il nous a paru nécessaire de vérifier ces comportements en réalisant de nouvelles mesures et en augmentant la résolution de l'image. Pour ces cellules, cela était d'autant plus important que l'information principale se trouve principalement dans l'évaluation du rôle du cytosquelette. Comme cette information se situe surtout dans le domaine des petites valeurs de la distance entre les fibres, cela nécessitait d'améliorer encore plus la définition de la mesure des profondeurs d'indentation. Ces mesures ont été réalisées sur des surfaces de Thermanox<sup>®</sup> (Figure 64). Elles sont comparées directement aux mesures précédentes et montrent une bonne reproductibilité.

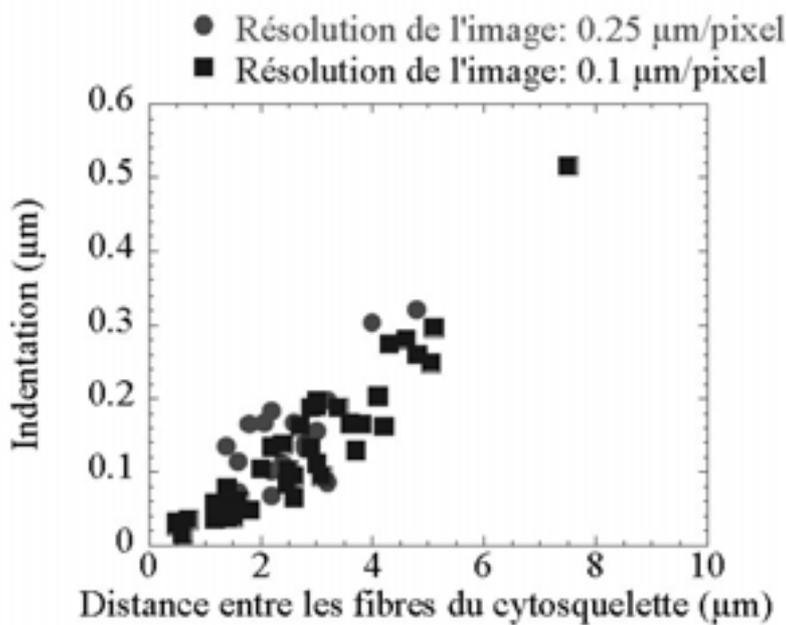
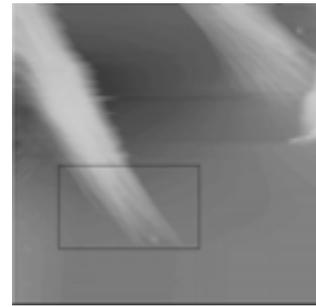


Figure 48



0.25µm/pixel

Figure 48



0.1 µm/pixel

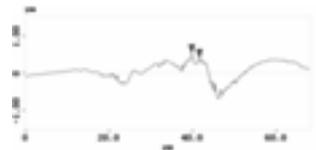


Figure 64. Profil d'indentation des fibres du cytosquelette en fonction de leur distance, à force externe appliquée minimale.

L'indentation a été mesurée sur l'image de la cellule de la Figure 48. A. et B..

*iv. Tentative de corrélation entre la réponse mécanique de la cellule à l'enfoncement d'une pointe et son état d'adhérence.*

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les réponses mécaniques que nous observons sont constituées d'une combinaison non triviale de la réponse mécanique d'un milieu hétérogène et d'un effet de taille de la pointe lié à sa dimension finie. Même en considérant la cellule comme un milieu élastique, la résolution d'un tel problème demeure très difficile, puisqu'il s'agirait d'appliquer l'approche de Hertz à un milieu élastique hétérogène.

Cependant, à partir de la classification simple de l'adhésion cellulaire que suggère nos résultats, nous pouvons tenter d'identifier s'il apparaît des comportements susceptibles d'être liés à l'état d'adhésion des cellules.

Aux faibles charges, nous avons constaté la présence de deux comportements, d'abord une croissance de l'indentation puis l'émergence d'un plateau. La hauteur de ce plateau est attribuée à la réponse élastique de la membrane plasmique de la cellule. Dans les cas les mieux identifiés i.e. une surface de silice silanisée biofonctionnalisée avec du SVF (ostéoblastes fortement adhérents) et une surface de Thermanox<sup>®</sup> (ostéoblastes adhérents), nous trouvons pour les faibles charges des hauteurs similaires, de l'ordre de 300 nm (Figure 65). Ce résultat suggère que l'élasticité de la membrane plasmique est faiblement dépendante de l'état d'adhérence.

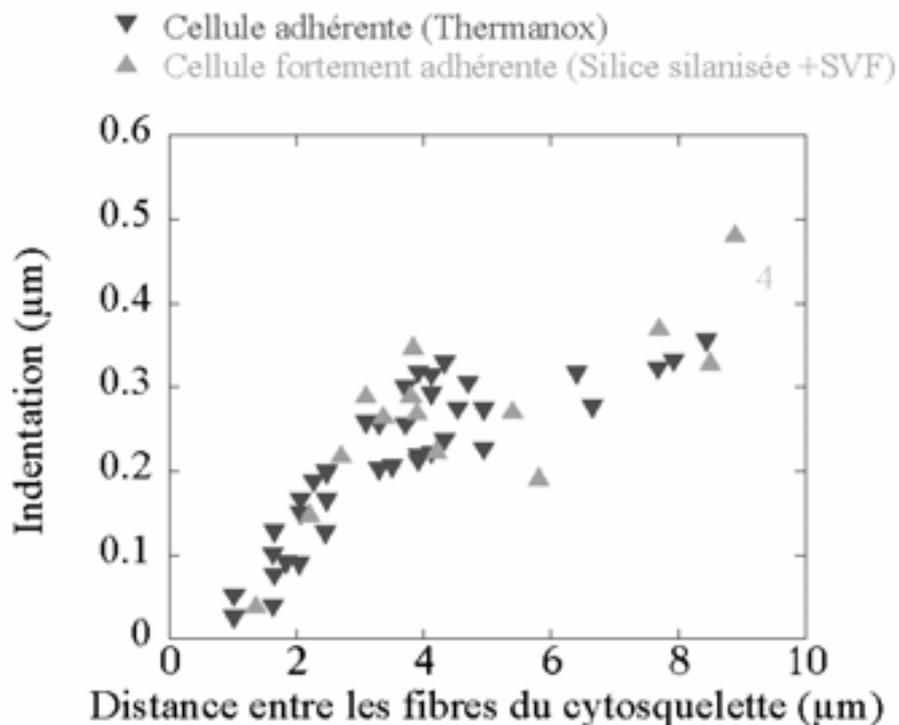


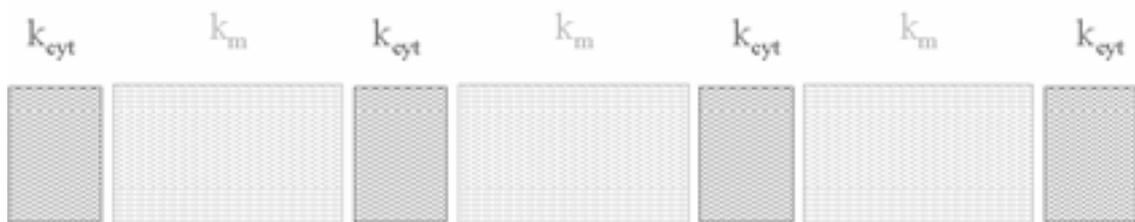
Figure 65. Profil d'indentation des fibres du cytosquelette en fonction de leur distance, à force externe appliquée minimale. Deux profils ont été reportés ; il s'agit de la Figure 60. 4. et de la Figure 62.

En conséquence, une information sur l'état d'adhérence, ou pour le moins sur l'état du cytosquelette, se trouvera plutôt dans les pentes de la variation de l'indentation. Cette information est plus délicate à extraire, puisque d'une part elle nécessite une très bonne

résolution de l'image et que d'autre part, elle ne permet que des comparaisons concernant les faibles charges. Comme nous avons pu le constater sur les différents graphes, malgré nos multiples mesures sur plusieurs cellules et l'analyse de plusieurs sections, cela conduit inévitablement à une dispersion notable des points d'où il est délicat d'extraire de façon précise des valeurs de pente. Aussi dans nos comparaisons, nous chercherons principalement à extraire des tendances si celles-ci se dégagent nettement.

Pour ce faire, nous avons à aborder deux difficultés, l'une est la modélisation de la réponse mécanique de la cellule, l'autre la description effective de nos mesures mécaniques avec la MFA.

Pour la modélisation des propriétés mécaniques de la cellule mesurées par MFA, nous prendrons une approche délibérément simple. Cette approche est en grande partie déterminée par l'analyse de nos résultats. Plus précisément, elle repose sur le fait que l'indentation mesurée montre une croissance quasi linéaire avec la distance entre les fibres. Nous allons considérer que la raideur totale de la cellule est la combinaison de deux raideurs en parallèle, celle de la membrane plasmique de la cellule et celle du cytosquelette (Figure 66).



*Figure 66. Représentation schématique de la membrane plasmique et du cytosquelette, caractérisés par des modules élastiques différents.*

La raideur de la membrane est donnée par la relation  $k_m = G_m \phi$ . Pour la contribution du cytosquelette, nous considérons une raideur  $k_{cyt}$ . La contribution globale de cette raideur est pondérée par son nombre par unité de longueur le long d'une section normale à la fibre. Nous lui affecterons donc un coefficient similaire à une densité linéique  $1/D$ . A cause de la taille finie de la pointe, la force appliquée n'est pas ponctuelle. Par conséquent, une expression plus générale doit prendre en compte le diamètre de l'aire de contact qui s'accroît avec l'indentation. C'est ainsi que nous expliquons l'origine d'une apparition des plateaux à des valeurs de distance entre les fibres du cytosquelette ( $D$ ) plus faibles quand la charge est plus

faible. Une fonction prenant en compte le rapport  $\delta/D$  devrait être affectée à la raideur  $k_{cyt}$ . Nous prendrons comme raideur globale l'expression suivante :

$$k_{tot} = G_m \delta \tan(\theta) + \frac{f(\delta / D)}{D} k_{cyt}$$

Cependant, pour les cellules fortement adhérentes, nous observons une croissance quasi linéaire. Dans ce cas, seule une expression où  $f(\delta/D)$  est une constante est susceptible de rendre compte d'un tel comportement. Nous poserons  $f(\delta/D) = C_0$ . Cette constante  $C_0$  traduira l'extension latérale des filaments du cytosquelette, donc le diamètre des fibres du cytosquelette. Sa valeur est de l'ordre de la centaine de nanomètre. L'expression de l'indentation réelle  $\delta$  sera donnée par :

$$\delta = \frac{F}{k_{tot}} = \frac{F}{G_m \delta \tan(\theta) + \frac{C_0}{D} k_{cyt}} \quad (1)$$

L'indentation que nous mesurons dans nos profils ne peut pas être l'indentation réelle donnée par l'équation précédente. Pour évaluer l'indentation réelle, nous aurons à nouveau recours à une simplification. Considérons que la cellule a un rayon de courbure suffisamment grand pour que l'on puisse la considérer comme localement plane.

Alors que cette approximation était justifiée pour l'étude de l'indentation de la pointe avec le modèle de Hertz qui consistait à comparer le rayon de courbure de la pointe avec le rayon de courbure de la membrane ; une telle approximation, dans le cas présent, devient très grossière puisque que nous considérons des distances d'arc de l'ordre de quelques microns.

Suivant la Figure 67, nous obtenons :

$$\delta = \delta_{mes} + \delta_{cyt} \quad (2)$$

Les équations 1 et 2 nous conduisent à une équation du second degré donnant la l'expression de  $\delta_{mes}$  en fonction de  $\delta_{cyt}$ .

$$\delta_{mes} = \frac{-2G_m \delta_{cyt} \tan(\theta) + \frac{C_0}{D} k_{cyt} + \sqrt{\left(2G_m \delta_{cyt} \tan(\theta) + \frac{C_0}{D} k_{cyt}\right)^2 + 4G_m \left(F - G_m \delta_{cyt}^2 + \delta_{cyt} \frac{C_0}{D} k_{cyt}\right)}}{G_m} \quad (3)$$

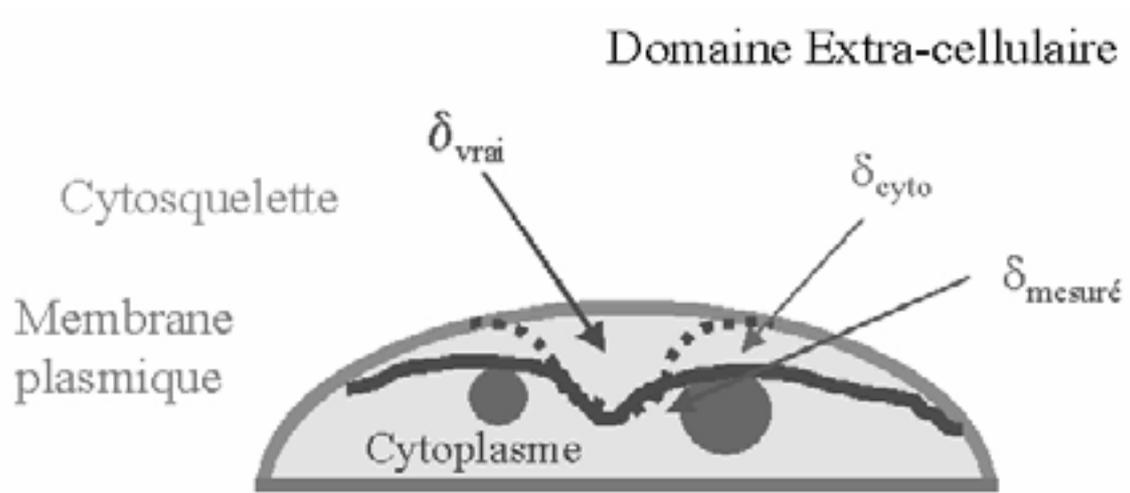


Figure 67. Abaissement de la cellule sous le passage de la sonde du MFA.

Sur la Figure 68, les courbes d'indentation sont reportées. Elles ont été calculées avec l'équation 3 pour trois charges différentes.

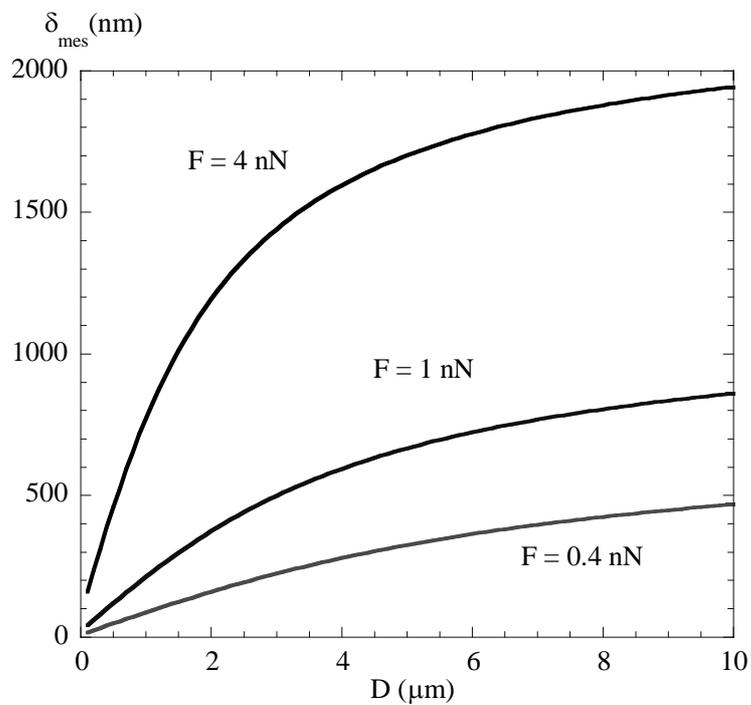


Figure 68. Courbes d'indentations calculées avec trois forces différentes. Les paramètres du calcul sont :

$$G_m \tan(\theta) = 3 \text{ kPa}, k_{\text{cyt}} = 0,1 \text{ Nm}^{-1}, C_0 = 100 \text{ nm}, F = 4\text{nN}, 1\text{nN}, 0,4 \text{ nN}$$

L'allure générale des courbes est relativement bien reproduite. On perd également la relation linéaire entre l'indentation mesurée et la force ainsi que nous l'avons observé. Par exemple, entre 4 nN et 0.4 nN, à  $D = 2$  microns, nous calculons un facteur 7 entre les indentations au lieu du facteur 10 donné par les charges. Comme on peut s'y attendre, si on augmente le module élastique de la membrane (ou on réduit la raideur du cytosquelette), le plateau apparaît pour une valeur de  $D$  plus faible.

Sur la Figure 69, nous avons repris une comparaison entre les valeurs mesurées aux faibles charges entre des cellules fortement adhérentes et des cellules faiblement adhérentes.

Dans le cadre de cette modélisation, un tel comportement peut être approximativement reproduit si nous diluons la structure du cytosquelette dans le cytoplasme. Ce paramètre de « dilution » est obtenu en augmentant le diamètre du cytosquelette i.e. la constante  $C_0$ .

La Figure 70 représente un tel calcul pour une charge de 0,4 nN et des diamètres de fibres du cytosquelette de 100 et 300 nm respectivement.

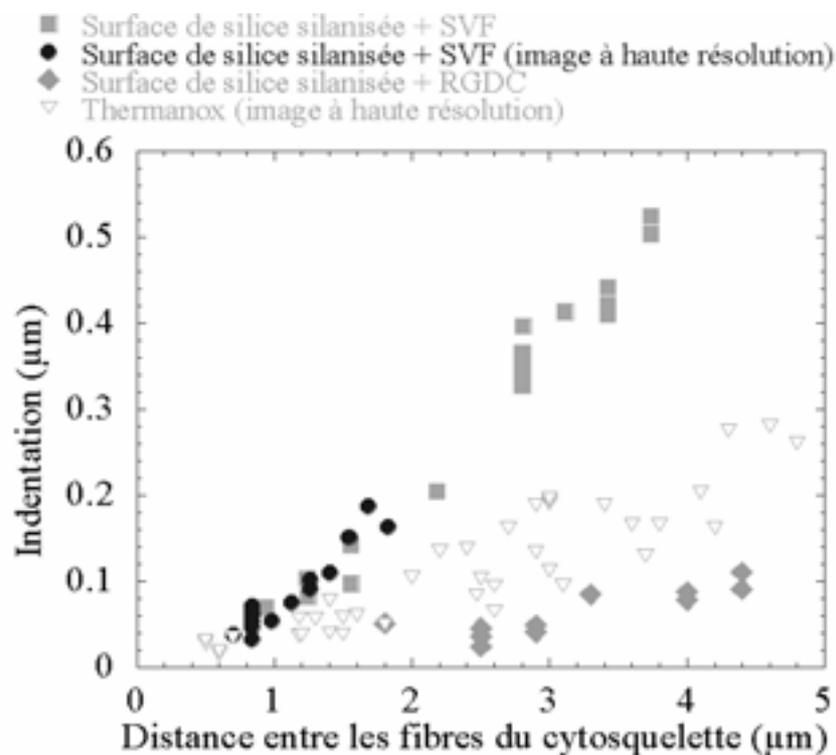


Figure 69. Profil d'indentation des fibres du cytosquelette en fonction de leur distance, à force externe appliquée minimale. Les profils reportés sont ceux de la Figure 60. 1., Figure 61, Figure 62 et de la

Figure 63.

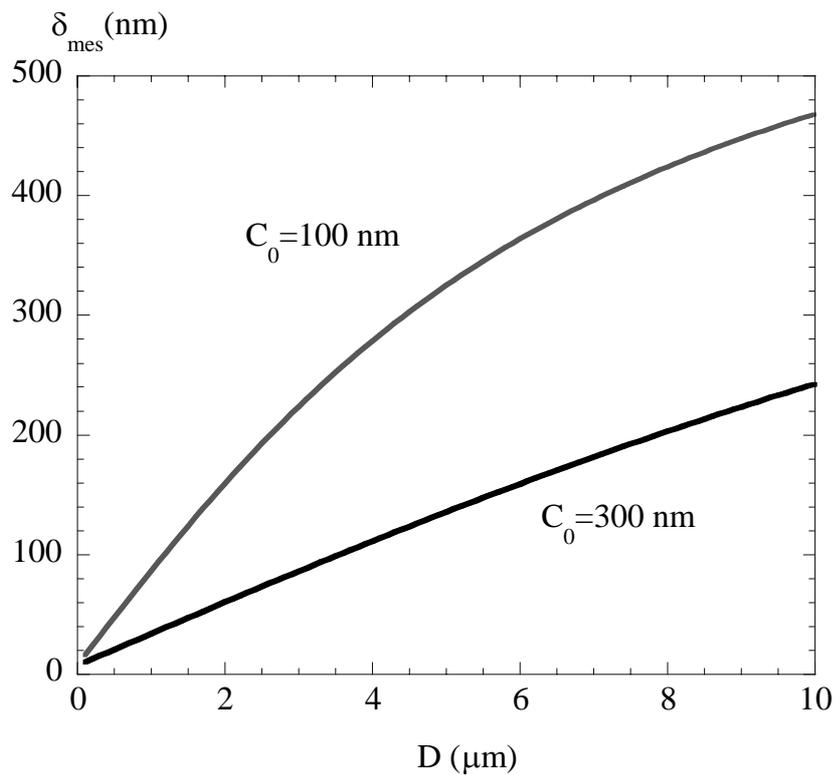


Figure 70. Courbes d'indentation calculées avec une force de 0.4 nN et des diamètres de fibres de stress du cytosquelette de 100 nm et de 300 nm. Les paramètres du calcul sont :  $G_m \tan(\theta) = 3 \text{ kPa}$ ,  $k_{\text{cyl}} = 0,4 \text{ Nm}^{-1}$ ,  $C_0 = 100 \text{ nm}$ , ou  $300 \text{ nm}$ .

Pour terminer ce paragraphe, soulignons les limites d'un tel modèle. Par exemple, si on augmente fortement la raideur du cytosquelette, celui-ci dominera la réponse dynamique de la cellule quelle que soit la valeur de la distance entre les fibres du cytosquelette avec une faible pente d'accroissement de l'indentation mesurée. En d'autres termes, l'évolution de l'indentation mesurée serait similaire à celle observée pour des cellules faiblement structurées. Dans le cas présent, seul l'information extraite de l'image et des sections permet d'éliminer cette hypothèse.

## 2. Discussion

L'hypothèse de travail est de considérer la réponse de la cellule comme la réponse élastique d'un gel renforcé par une infinité de fibres rigides. L'élasticité du gel dans cette approche correspond à celle de la membrane plasmique et du cytoplasme cellulaire, tandis que les fibres rigides représentent les filaments d'actine et les microtubules. Dans ce cas d'étude, la réponse d'un tel système hétérogène et dynamique n'est pas du tout évidente. C'est ce que montre les mesures d'indentation réalisées par des courbes de force sur des cellules distinctes. Elles présentent de grandes variations.

Ces différences peuvent venir, tout d'abord, de la difficulté à estimer le point de contact sur la courbe de force entre la sonde et la surface de la cellule. Il est à noter qu'il n'est pas possible, avec le type d'appareil dont nous disposons, et étant donnée la taille des ostéoblastes, de contrôler l'endroit d'acquisition des courbes de force sur la cellule. Cependant, Domke *et al.*<sup>94</sup> sont parvenus à des modules élastiques moyens de 2,1 kPa à 8,8 kPa pour des ostéoblastes de lignée cellulaire (SaOS2) en fonction de la surface de dépôt et en enregistrant des courbes de force près du noyau de ces cellules. La comparaison de nos résultats avec ceux de Domke *et al.*<sup>94</sup> montre une correspondance de ces valeurs.

Les mesures de courbes que nous avons réalisées et que nous pouvons analyser à l'aide du modèle de Hertz conduisent à des modules élastiques entre la centaine de Pascals et 2kPa. D'après les mesures discutées précédemment, on peut déduire que ces courbes ont été réalisées sur la membrane et le cytoplasme avec une influence faible du cytosquelette. Dans ce cas, certaines de ces valeurs recoupent celles déduites des hauteurs de plateau.

Enfin, les valeurs de module élastique disponibles dans la littérature varient de plusieurs ordres de grandeur suivant le mode de mesure de ce module (Tableau 9) et suivant le type cellulaire concerné.

Type cellulaire	Module élastique (kPa)	Référence
Fibroblastes	3-5	Rotsch <i>et al.</i> <sup>161</sup>
Ostéoblastes (SaOS2)	2 à 9 près du noyau	Domke <i>et al.</i> <sup>94</sup>
Plaquettes	1,5-4 pour le noyau	Radmacher <i>et al.</i> <sup>162</sup>
HUVEC	7 pour le noyau 1-3 pour le reste de la cellule	Mathur <i>et al.</i> <sup>163</sup>
Cellules endothéliales de rat	2	Braet <i>et al.</i> <sup>164</sup>

Tableau 9. Modules élastiques de cellules.

Elles sont notamment fonctions de la force appliquée et de son estimation. Cette inhomogénéité de résultats couplée à la difficulté de maîtriser expérimentalement ces mesures ne permet pas de donner des conclusions fermes sur la correspondance entre les valeurs de module élastique des cellules et leur adhésion. Une autre méthode a donc été recherchée pour comparer les changements de propriétés élastiques en de multiples endroits de la cellule. C'est cette approche, à partir d'images obtenues sur des cellules, qui a été présentée.

Une information plus quantitative de la relation entre la structure locale et la réponse mécanique est obtenue en reportant la profondeur d'indentation de la sonde du MFA dans la cellule en fonction de la distance entre les fibres du cytosquelette. Un calcul simplifié indique que pour une force donnée, la profondeur d'indentation dépend de la distance entre les fibres et atteindrait une saturation pour une grande distance entre les fibres. C'est, effectivement, ce qui a été montré dans un certain nombre de cas par l'expérience.

A partir de ce modèle établi sur la réponse élastique de la membrane plasmique en fonction de celle des fibres du cytosquelette, il demeure difficile de définir l'influence respective du cytosquelette sous-jacent et de la contribution de l'ensemble membrane plasmique et cytoplasme. L'importance respective de ces deux contributions est fonction de l'état d'adhérence de la cellule et de la zone sur la cellule où est relevée l'indentation. Une différence d'élasticité d'une cellule près du noyau ou près d'un de ses bords a été effectivement observée par Radmacher *et al.*<sup>162</sup> et par Mathur *et al.*<sup>163</sup>. C'est pourquoi nous avons tenté d'estimer le module élastique d'une bicouche supportée de POPC pour pouvoir différencier la contribution du module élastique de la membrane plasmique de celle du cytoplasme. Pour ces bicouches, nous avons obtenu des modules de 1,8 et 3,3 kPa. Bien que ce système soit un modèle très simplifié comparé à la composition et à l'organisation d'une membrane cellulaire et que la mesure MFA sur ces bicouches ne soit pas directement comparable à celle réalisée sur la membrane cellulaire, la valeur obtenue sur le plateau à faible charge est du même ordre de grandeur. Cette correspondance nous conforte dans l'analyse de la réponse du profil d'indentation.

L'absence de saturation dans d'autres cas (Figure 62), empêche une classification précise du rôle respectif du cytosquelette et de l'ensemble « membrane et cytoplasme ». Cependant, puisque ces structures locales sont différemment établies suivant les surfaces biofonctionnalisées sous jacentes, les propriétés mécaniques sont ainsi caractérisées en fonction de la surface de dépôt des cellules. C'est ce qu'illustre la comparaison de ces propriétés élastiques d'ostéoblastes sur des surfaces de Thermanox<sup>®</sup> et de silice silanisée biofonctionnalisée par du SVF ou des peptides RGDC (Figure 69). La difficulté pour

l'analyse du comportement réside dans l'absence d'évolution marquée. Dans le cas, par exemple, d'un ostéoblaste faiblement adhérent sur une surface de silice biofonctionnalisée par des peptides RGDC, la faible valeur de l'indentation mesurée ainsi que sa faible dépendance en fonction de l'espacement entre fibre ne nous permet pas de conclure de façon non ambiguë sur une évolution des propriétés mécaniques intrinsèques du cytosquelette. Ce comportement peut tout aussi bien résulter d'un élargissement des fibres du cytosquelette avec des filaments moins fortement liés comme d'un renforcement du cytoplasme qu'il ne conviendrait plus de décrire comme un liquide.

Inversement, pour le cas des cellules fortement adhérentes, la reproductibilité des mesures suggèrent non seulement que la structure du cytosquelette est stable mais également que le cytoplasme s'apparente à un liquide, au moins aux échelles de temps de nos expériences. Ce système fibrillaire très organisé se présente comme un système mécanique homogène entouré d'un autre système (la membrane plasmique et le cytoplasme) très mou dont la mémoire des déformations si elles ont lieu, y compris pour les très fortes indentations, n'est pas discernable par nos mesures,.

Puisque la mise en place de la structure cytosquelettique cellulaire est fonction de l'adhésion de la cellule et des mécanismes d'interaction cellule-surface, nous pouvons énoncer que l'adhésion est aussi caractérisée par les propriétés mécaniques ainsi définies.

La forte adhésion d'un ostéoblaste à une surface pourrait résulter de multiples interactions entre la surface biofonctionnalisée, les intégrines et le cytosquelette cellulaire ainsi que les protéines associées. Ce système d'interaction crée une « force » d'attachement de la cellule à la surface et entraîne la mise en place d'une organisation du cytoplasme cellulaire. L'ostéoblaste devient ainsi un ensemble homogène très mou tenu par une structure fibrillaire.

Les différences d'organisation du cytosquelette cellulaire dues à ses protéines associées crée une perte d'adhésion. Elles entraînent une perte d'organisation interne de la cellule qui se traduit par une dureté mécanique globale de la cellule. Le détachement de la cellule pourrait être provoquer par la rupture mécanique des quelques sites d'adhésion entre les intégrines et la surface. Ainsi, la cellule se rétracte et le cytoplasme se contracte. Cette hypothèse sur l'origine mécanique du détachement des cellules<sup>165</sup> est cohérente avec l'ensemble des résultats que nous avons montré.

Le travail exposé précédemment établit la potentialité du Microscope de Force Atomique pour caractériser l'état d'adhésion des ostéoblastes. Il permet de visualiser des cellules vivantes, dans leurs conditions physiologiques de façon non destructive et de suivre dans le temps, le comportement d'une cellule. La cellule peut être soumise à une contrainte qu'elle soit mécanique ou chimique, puis la réponse de la cellule à ce stress peut être suivi dans le temps. Enfin, une importante littérature présente l'étude des propriétés mécaniques des cellules, en particulier le module élastique peut être calculé à partir des courbes de force. En plus de ces mesures de courbes de force, l'approche par la mesure de profils d'indentation nous paraît mieux adaptée pour comprendre les propriétés mécaniques de la cellule. A partir de ces profils, une mesure de l'évolution relative du module élastique en fonction de la structure locale de la cellule peut être déduite. Les hypothèses sur un détachement des cellules lié à une contraction et un durcissement du cytoplasme sont en accord avec les variations de profils d'indentation que nous avons observées en fonction de l'état d'adhésion de la cellule.





# Conclusions et perspectives

L'étude réalisée a établi dans quelle mesure l'adhésion d'ostéoblastes est favorisée par la bio-fonctionnalisation d'une surface.

Trois natures de surfaces ont été envisagées :

- une surface de Thermanox<sup>®</sup>, couramment utilisée en culture cellulaire et choisie comme surface témoin et une surface de Thermanox<sup>®</sup> biofonctionnalisée par des protéines de SVF
- une surface de silice brute ou biofonctionnalisée par des protéines de SVF
- une surface de silice silanisée biofonctionnalisée par des protéines de SVF adsorbées en surface
- une surface de silice silanisée biofonctionnalisée par une monocouche homogène de peptides RGDC ou DGRAFVLC. La séquence RGD est la séquence minimale critique, responsable de l'adhésion cellulaire.

Une attention particulière a été portée sur la caractérisation de la biofonctionnalisation des surfaces par les peptides adhésifs.

Les surfaces sont silanisées préalablement au greffage des peptides. Afin d'assurer la reproductibilité, l'homogénéité et la durabilité de ce traitement de surface, des études tribologiques à différentes températures par MFA ont été menées sur ces surfaces silanisées.

Nous nous sommes ensuite assurés du greffage des peptides à la surface par différentes techniques de caractérisation (mouillabilité, XPS, PM-IRRAS).

Des ostéoblastes ont été déposés sur ces différentes surfaces et ont été visualisés par MFA. Malgré des limitations expérimentales en partie dues au déplacement vertical limité du support de l'échantillon, la MFA a démontré sa potentialité dans l'étude de cellules vivantes, dans leur milieu de culture. A partir de leur forme, de leur étalement et de la présence d'un cytosquelette plus ou moins développé, différents états d'adhésion des ostéoblastes ont été établis. Ces résultats sont corrélés à leurs propriétés mécaniques.

La perte d'adhérence de ces cellules a été testée pour chaque condition de dépôt envisagée en appliquant une force externe avec la sonde du microscope. L'évolution du comportement dynamique des cellules a ensuite été suivie.

L'adhésion forte des ostéoblastes est liée à la présence de structures cytosquelettiques cellulaires et à leur stabilité. Elle a aussi été corrélée aux propriétés mécaniques des ostéoblastes à partir de l'analyse d'images obtenues par MFA. Les variations de l'indentation en fonction de la structure locale de la cellule ont été étudiées. Elles permettent de comparer qualitativement l'état d'adhésion des ostéoblastes.

Notre étude montre que :

- les cellules sont faiblement adhérentes sur une surface de silice biofonctionnalisée par des peptides. Deux peptides différents par leur longueur ont été utilisés et ont conduit à des résultats similaires. La séquence RGD est bien la séquence minimale critique. C'est ce que prouvent les tests d'attachement et les observations par MFA. Elle favorise l'adhésion cellulaire par l'occupation des intégrines ; mais elle ne stimule pas leur agrégation et la formation de plaque d'adhésion focale qui correspond à une zone de la membrane basale de la cellule qui présente des nombreux agrégats d'intégrines.
- Pourtant, l'adhésion des ostéoblastes sur les surfaces de RGDC greffées est favorisée par rapport à une surface de silice, mais elle n'est pas optimale comparée à une surface biofonctionnalisée par des protéines adhésives adsorbées. Cependant, l'adhésion des ostéoblastes est moins favorisée sur une surface de silice biofonctionnalisée par des peptides RGD que sur une surface silice biofonctionnalisée par des protéines adhésives adsorbées. La séquence RGD est la séquence minimale critique pour l'adhésion cellulaire, mais elle est aussi, par elle-même, substantiellement moins active que son équivalent dans les protéines natives. Afin de prouver que les cellules s'attachent à la surface peptidique par un processus intégrine-dépendant, des tests d'inhibition devront être réalisés.

- La surface de la silice a été biofonctionnalisée par un peptide RGDC dont la séquence est très courte (4 acides aminés). Or, il a été proposé que des peptides greffés sur des surfaces se lient effectivement aux intégrines cellulaires s'il existe une distance d'au moins 3.5 nm entre la surface greffée et la membrane de la cellule<sup>147</sup>. Cette condition n'est pas satisfaite pour le peptide RGDC. C'est pourquoi une autre séquence peptidique a été choisie à partir de ce critère de longueur. Il s'agit du peptide DGRAFVLC, dont le greffage et la structuration en monocouche particulière ont déjà été détaillés précédemment. Il faut ajouter que cette séquence devrait être plus accessible pour les intégrines à cause d'une plus grande flexibilité et d'une plus faible rigidité que celles obtenues avec des séquences RGDC. L'étude de l'adhésion d'ostéoblastes sur ces surfaces a conduit aux mêmes résultats que ceux obtenus avec la surface biofonctionnalisée par le peptide RGDC.
- les cellules sont fortement adhérentes sur une surface de silice biofonctionnalisée par des protéines adhésives adsorbées
- L'étude de l'évolution de l'indentation à force constante en fonction de la structure locale montre des différences significatives devant l'état d'adhésion de la cellule. A l'aide d'un modèle simple, on peut extraire les tendances sur l'évolution d'un modèle élastique en fonction de cette structure locale.

Cette étude se situe dans le contexte de la conception de biomatériaux fonctionnalisés. Elle permet de présenter quelques propositions de recherches susceptibles d'améliorer la biofonctionnalisation des surfaces par une meilleure analyse de l'état de la cellule.

La force d'adhésion est proportionnelle au nombre de liens entre la cellule et la surface (intégrine-ligand) et à l'organisation de ces liens ; isolés ou agrégés en plaque focale. Pour obtenir une adhésion d'ostéoblastes forte sur les surfaces biofonctionnalisées par des peptides RGD, il faudrait donc reproduire artificiellement le phénomène de « clustering » i.e. l'agrégation des liens entre la cellule et la surface.

Il faut souligner l'effet de la densité des peptides RGD en surface. D'après les travaux de Massia *et al.*<sup>145</sup>, un espacement entre les peptides de 440 nm est requis pour favoriser l'étalement de fibroblastes, tandis qu'il faut atteindre un espacement entre les peptides de 140 nm pour induire l'adhésion de fibroblastes i.e. la formation de plaques focales d'adhésion et

l'organisation de fibres de stress. La densité de peptides greffés, dans notre étude, est largement supérieure à celle indiquée par Massia *et al.* Cette hypothèse peut donc être exclue.

Dans la séquence RGDC ou DGRAFLVC, il manque des informations qui déterminent la spécificité du ligand pour le récepteur intégrine. Ces données peuvent avoir plusieurs origines.

Dans les protéines natives, il existe à proximité des séquences RGDC, des séquences dites « synergiques » qui influent sur l'interaction entre les séquences RGD dans les protéines natives et les intégrines.

Les séquences encadrant directement le peptide RGD peuvent aussi influencer sur son activité à la fois à cause de leur interaction avec les protéines et les lipides de la membrane plasmique cellulaire et à cause de la conformation qu'ils peuvent entraîner au niveau du tripeptide lui-même. Les travaux de Bogdanowich-Knipp *et al.* <sup>166,167</sup> et de Wang *et al.* <sup>168</sup> soulignent l'effet de la conformation et de la stabilité de courtes séquences de peptides RGD, cycliques ou linéaires, ainsi que les différences de flexibilité suivant la séquence peptidique choisie.

Enfin, pour terminer, les sites d'attachement des peptides greffés et la chimie de la surface environnante pourraient être remis en cause. La rugosité, l'hydrophobie et la nature des charges électrostatiques présentes sur les surfaces n'ont pas été étudiées dans ce travail. Elles ne doivent pas interférer avec l'orientation et l'activité de ces biomolécules. Elles pourraient expliquer cette interaction défavorable entre des ostéoblastes et des surfaces biofonctionnalisées par des peptides adhésifs.





# Annexes



# Annexe 1 :

## Matériels et méthodes

# 1. Matériels

Les surfaces de silicium oxydées Si(100) bipolies utilisées dans cette étude sont fournies par la société Micropolish (France). La rugosité évalué par MFA est de  $0.3 \text{ nm}/\mu\text{m}^2$ . Les surfaces de plastique (Thermanox<sup>®</sup>) et les surfaces de verre proviennent de chez PolyLabo (France).

Les silanes: le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) et le phenyldiméthyl-éthoxysilane (PDMES) sont fournis par ABCR (France).

Les peptides: Arginine-Glycine-Acide Aspartique-Cystéine (ou RGDC) et Acide Aspartique-Glycine-Arginine-Alanine-PhenylAlanine-Valine-Leucine-Cystéine (ou DGRA-FVLC) sont synthétisés par Bachem (France).

Les surfaces nettoyées ou fonctionnalisées sont conservées dans un dessiccateur enceinte contenant un desséchant de type gel de silicium et d'aluminium, fournie par Roth Sochiel (France).

Les phospholipides, Palmitoyl-oleoyl de phosphatidylcholine (POPC) ont été donnés par le Dr. M. Winterhalter (IPBS, Toulouse). La sous-unité B<sub>5</sub> (CTB<sub>5</sub>) de la choléra toxine a été achetée chez Sigma-Aldrich (France).

Les produits utilisés en culture cellulaire : le milieu de culture (Dulbecco's modified Eagle's medium ou DMEM, la glutamine, la pénicilline, la streptomycine et le Sérum de Veau Fœtal (SVF) sont des laboratoires Gibco (France).

Tous les produits chimiques (hexane anhydre, peroxyde d'hydrogène, acétone, dichlorométhane...) sont fournis par Sigma-Aldrich (France).

L'eau utilisée est toujours ultra pure (18,2 MΩ) et a été purifiée par un système MilliQ (Millipore).

## 2. Méthodes

### 2. 1. Modification chimique des surfaces

Dans cette étude, des surfaces de nature différente ont été utilisées. Il s'agit de surfaces de silicium oxydé, de verre, ou de mica. Des protocoles de traitement chimique de ces matériaux sont détaillés par la suite. En fonction du revêtement ou du greffage envisagé, des études différentes sont réalisées. Le choix du matériau est guidé par son utilisation ultérieure recherchée.

#### a. Greffage de silanes.

##### *i. Protocole de silanisation 1*<sup>122,129</sup>.

Le protocole de silanisation 1 a été développé en milieu acide-aqueux par S. Gauthier *et al.*<sup>122</sup>. Les surfaces de silicium ou de verre sont tout d'abord dégraissées par trempages successifs dans du dichlorométhane bouillant pendant 2 min, dans du méthanol bouillant pendant 2 min, puis dans de l'acétone. Ce nettoyage est répété une seconde fois. Les surfaces sont enfin rincées abondamment dans de l'eau et séchées sous flux d'azote. Elles subissent ensuite un traitement thermique de 30 min à 420 °C. L'atmosphère du four à 420 °C est enrichie en O<sub>2</sub> pendant 1 h, pour favoriser la création de sites hydroxyles en surface. La réaction de silanisation est réalisée enfin par introduction des surfaces de silicium dans une solution de molécules de silanes (APTES ou PDMES) à  $1,2 \cdot 10^{-3}$  mol/l dans une solution acide-aqueuse d'acétone/eau (1:5 v/v) à pH=3,5. Ce pH est obtenu par addition d'HCl. Les échantillons sont laissés 6 min dans la solution, à température ambiante, avant d'être rincés dans l'eau, puis séchés.

## **ii. Protocole de silanisation 2<sup>114,129</sup>.**

Les surfaces de silicium ou de verre, avant d'être greffées selon ce second protocole, sont tout d'abord nettoyées par rinçages successifs dans de l'éthanol et de l'acétone. Les pastilles sont ensuite immergées 5 min dans une solution fraîchement préparée d'acide sulfurique et de peroxyde d'hydrogène (1:1 v/v), afin d'éliminer les substances organiques résiduelles. Elles sont ensuite abondamment rincées dans de l'eau.

La totalité du traitement de surface est ensuite réalisée dans une enceinte permettant de travailler sous atmosphère (Argon), température (de l'ambiante à 800 °C) et pression (de la pression atmosphérique à  $10^{-5}$  Torr) contrôlées.

La réaction de silanisation 2 est réalisée en milieu anhydre afin de minimiser toute trace d'eau. Dans le but d'exclure l'hydrolyse des molécules de silanes au cours de la réaction de silanisation, de grandes précautions sont prises pour la manipulation des silanes et des solutions organiques anhydre (hexane anhydre, diméthylformamide anhydre...). Ces solutions ne sont jamais stockées sur de longues périodes et elles sont toujours manipulées dans une enceinte placée sous une atmosphère d'argon « sec ».

La réaction de silanisation comprend trois étapes. D'abord, les surfaces de silicium nettoyées sont dégazées à 150 °C sous vide à  $10^{-5}$  Torr pendant 20 h. Ensuite, elles sont immergées dans une solution de silanes (APTES ou PDMES) à  $1,2 \cdot 10^{-3}$  mol/l dans de l'hexane anhydre pendant 90 min, à température ambiante. Ce greffage devrait permettre aux silanes de réagir directement avec la surface de silicium, avec une quantité limitée d'eau en surface du silicium et dans la solution de greffage. Elles sont ensuite rincées dans de l'hexane anhydre toujours sous la même atmosphère d'argon, et en changeant plusieurs fois la solution d'hexane anhydre. Dans le cas du greffage d'APTES, la topographie de la surface observée par MFA a montré de nombreux agrégats adsorbés. Pour produire des surfaces planes, les agrégats sont éliminés par une extraction soxhlet dans du méthanol à 99,8 % pendant 24 h et par séchage manuel des surfaces avec du papier absorbant de type « kimwipes ». Enfin, les échantillons sont dégazés sous vide (à  $10^{-5}$  Torr) à 100 °C pendant 4 h.

### **b. Greffage de peptides terminés par une cystéine**

Préalablement au greffage de peptides terminés par une cystéine sur une surface, de silicium ou de verre silanisés, terminée par des groupements amines, un agent intermédiaire hétéro-bifonctionnel : le N-hydroxysuccinimidyl-3-maleimido propionate (SMP) est greffé de façon covalente sur ces surfaces. Ces échantillons sont immergés dans une solution de SMP à

une concentration de  $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l dans du diméthylformamide anhydre pendant 30 min sous une atmosphère d'argon. Ils sont ensuite rincés dans du DMF. Puis ils sont plongés dans une solution de peptides à une concentration de  $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l dans du DMF pendant 18 h. Ces surfaces sont ensuite rincées dans du DMF et séchées par chauffage à 35 °C pendant 1h.

### c. Préparation de bicouches supportées lipidiques.

Des vésicules multilamellaires sont obtenues en amenant à sec la solution de chloroforme où ont été dissous les lipides par évaporation sous argon puis par une pompe à vide. Les lipides sont ensuite resuspendus dans un tampon: Tris 10 mM, KCl 1 M, CaCl<sub>2</sub> 2 mM pH 7.4 à la concentration de 1 mg/ml de lipides.

Des vésicules unilamellaires sont produites à partir de la suspension de vésicules multilamellaires par sonication dans un bain à ultrason pendant 15 min, à température ambiante, au dessus de la température de transition de phase du POPC.

100 µl de la solution de vésicules unilamellaires à 1mg/ml ont été déposés sur du mica fraîchement clivé, collé sur un disque métallique avec du scotch double face et incubé 2 h à température ambiante. L'excès de vésicules est éliminé en changeant le tampon recouvrant la surface de mica. Après cette procédure de rinçage, l'échantillon est installé sous le microscope pour l'observation. Les observations sont réalisées dans le même milieu tampon.

CTB<sub>5</sub> a été utilisée pour s'assurer de la présence de la bicouche lipidique supportée<sup>159,169</sup>. Une solution à 25 µg/ml dans un tampon Tris 10 mM, KCl 1 M, CaCl<sub>2</sub> 2 mM pH 7.4 sont injectées dans la cellule liquide du microscope de force atomique.

## 2. 2. Technologie de culture cellulaire

### a. Isolement et culture d'HBMSC.

Les cellules ostéoprogénitrices ont été isolées d'un prélèvement de moelle osseuse humaine (Pr. Durandea, service de traumatologie, CHR Pellegrin), obtenu à partir de la diaphyse fémorale de patients sains subissant des interventions chirurgicales au niveau de la hanche après un traumatisme. Ces cellules ont été cultivées selon la méthode établie par Vilamitjana *et al*<sup>6</sup>. La moelle osseuse est homogénéisée par des passages successifs dans des aiguilles de grosseur décroissante: G-16, G-18, et G-21, puis centrifugée à 800 g pendant 10 min. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 10 ml de milieu DMEM supplémenté avec 10 % de SVF et d'un corticoïde, la dexaméthasone, à  $10^{-8}$  mol/l. Cette

suspension cellulaire est ensemencée à  $4 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> dans ce même milieu, et incubée en atmosphère humide à 5 % de CO<sub>2</sub> et à 37 °C. Le milieu de culture est changé tout les quatre jours, et la dexaméthasone à la même concentration ( $10^{-8}$  mol/l) est ajoutée lors des trois premiers changements de milieu. Les cellules sont à confluence après deux semaines de culture. A ce stade, une suspension de cellules (20 000 cellules par cm<sup>2</sup>) peut être ensemencée et étudiée dans un milieu de culture avec ou sans SVF sur les surfaces d'intérêt.

## b. Stérilisation des surfaces

Tous les matériaux sont stérilisés par exposition à un rayonnement de source pendant 8 h. Ces irradiations ont été réalisées au sein de l'unité 443 - INSERM LBRT qui dispose d'une source au Césium 137 (IBL 337 de Cis Bio International) avec un débit de dose d'environ 3 kGy/h.

## 2. 3. Méthodes de caractérisation chimique des surfaces

### a. Mouillabilité.

Les angles de contact sont mesurés avec de l'eau sur un appareil Digidrop de la société GBX, Scientific Instrumentation (France). Cet instrument comprend un logiciel, appelé Windrop ++ qui permet une mesure automatique des angles de contact. Ils sont mesurés sur deux côtés de la goutte d'eau (Figure 71). Pour chaque matériau, 5 surfaces préparées de façon indépendante sont utilisées. Les angles de contact sont mesurés à partir de 5 gouttes déposées en différents endroits sur chaque échantillon considéré. Les résultats présentés (Tableau 7) correspondent à une moyenne sur l'ensemble de ces mesures.

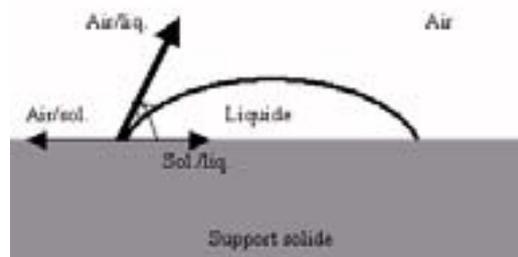


Figure 71. Angle de contact.

A l'interface entre une goutte de liquide et le milieu environnant, s'exercent des forces surfaciques notées ( $\sigma_{air/liq}$ ,  $\sigma_{air/sol}$ ,  $\sigma_{sol/liq}$ ) qui conduisent à la forme d'équilibre de la goutte, avec un angle de contact  $\theta$ . Lorsque cet angle est supérieur à  $90^\circ$ , le liquide ne mouille pas le support ; il le mouille dans le cas contraire

## b. La Microscopie de force atomique (MFA)

Les observations par MFA ont été réalisées sur un MFA de type PicoSPM (Molecular Imaging, Phoenix – USA) équipé d'une céramique piézo-électrique « small scanner » (9  $\mu\text{m}$ ) et contrôlé par un «NSE controller» (Digital Instruments). Le microscope, le levier et l'échantillon sont placés dans une boîte à gants afin de maintenir une atmosphère sèche et ne sont utilisés qu'après avoir atteint un équilibre thermique. Cela assure la reproductibilité et des variations significatives des force de friction en fonction de la température.

Les images sont enregistrées en mode force constante. Les leviers utilisés sont en nitrure de silicium et ont une constante de raideur de 0.12 N/m, comme l'indique le fabricant. La vitesse de balayage utilisée est comprise entre 0,1  $\mu\text{m/s}$  et 20  $\mu\text{m/s}$ , mais généralement, elle est de 4  $\mu\text{m/s}$ . L'angle de balayage est de  $0^\circ$  ou  $90^\circ$ . La force appliquée est minimale. Elle est réglée à partir d'une courbe de force. Pour permettre une meilleure observation des images, elles ont toutes été corrigées ligne par ligne de la valeur moyenne de leur pente.

Afin d'évaluer l'état des surfaces greffées et la stabilité du greffage, des études tribologiques ont été réalisées pour différentes conditions de greffage à deux températures différentes (30  $^\circ\text{C}$  et 100  $^\circ\text{C}$ ). Un cycle de température est réalisé entre 30  $^\circ\text{C}$  et 100  $^\circ\text{C}$  sous une atmosphère sèche. Le contrôleur en température est de type « lakeshore ». L'étalonnage de ce contrôleur et sa réponse à différentes rampes de température a été mis au point par J. Parrel<sup>170</sup>, au cours d'un stage au CPMOH. La vitesse de balayage utilisée est comprise entre 0.075  $\mu\text{m/s}$  et 7.5  $\mu\text{m/s}$ . La force externe appliquée est conservée à 0 N. Les mesures de friction sont faites sans boucle de contrôle. Les réglages du microscope ne sont pas modifiés pendant toute la durée de ces mesures. Les forces de friction sont tout d'abord mesurées en fonction de la vitesse de balayage à 30  $^\circ\text{C}$ . A chaque vitesse, 10 mesures de forces de friction sont relevées et la moyenne est calculée. Cette valeur est reportée sur un graphe des forces de friction en fonction de la vitesse. Puis les échantillons sont chauffés à 100  $^\circ\text{C}$  et des mesures identiques sont prises. Enfin, la température est abaissée à 30  $^\circ\text{C}$  et des données de friction à 30  $^\circ\text{C}$  sont encore relevées. Les forces de friction moyennées sont normées par rapport à la valeur mesurée à la vitesse de 1  $\mu\text{m/s}$ , pour chaque échantillon.

## c. La spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

Les analyses d'XPS ont été réalisées par Christine Labrugère au Centre de Caractérisation des Matériaux Avancés (CeCaMa), ICMCB-CNRS, UPR 9048 à Pessac. Les

spectres ont été obtenus avec un spectromètre VG 220i-XL Escalab. La source Mg K $\alpha$  ( $h\nu = 1253,6$  eV) est monochromatique et de 100 W. Le vide dans la chambre d'analyse est de  $10^{-10}$  Torr. L'acquisition des signaux C1s, O1s, N1s et Si2p est effectuée avec une énergie moyenne constante de 20 eV. La région analysée correspond à une zone de 150  $\mu\text{m}$  de diamètre.

#### d. La spectroscopie différentielle infrarouge par modulation de polarisation (PM-IRRAS)

La caractérisation chimique par spectroscopie infrarouge des surfaces traitées a été réalisée par Bernard Desbat au Laboratoire de Physico-Chimie Moléculaire (LPCM), CNRS, UMR 5803 à Talence.

La base du montage expérimental qui a été utilisé dans cette étude est constitué par un spectromètre à transformée de Fourier NICOLET 740. Un modulateur photo-élastique permet de moduler très rapidement (74 KHz) la polarisation du faisceau infrarouge incident entre les polarisations linéaires parallèle et perpendiculaire au plan d'incidence. L'intensité détectée permet d'obtenir un signal de réflectivité différentiel normalisé.

## 2. 4. Méthodes d'analyse des interactions cellules-surfaces

### a. Attachement cellulaire.

Les essais d'attachement cellulaire sur différentes surfaces ont été effectués selon une méthode adaptée de Majeska *et al.*<sup>74</sup> et de Landegren<sup>75</sup>.

Les cellules sontensemencées à une densité cellulaire de 15 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu dépourvu de SVF et incubées pendant 1 H, 3 H ou 24 H à 37 °C. Après lavage de la couche cellulaire avec du PBS 0,1 M pH 7,4 le nombre de cellules adhérentes est quantifié par le dosage de l'activité de l'enzyme lysosomiale, la N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase. Une solution de substrat: le p-nitrophényl N-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminide 7,5 mM, Na citrate 0,1 M pH 5, Triton X100 5 % (v/v) est respectivement ajouté sur les matériaux. Après incubation pendant 2 h à 37 °C en chambre humide, la réaction est arrêtée par l'ajout de la solution tampon : Glycine 50 mM, EDTA 5 mM, PBS 0,1 M pH 10,4. La quantification de la réaction

est réalisée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 405 nm (Dynex MRX Microplate Reader).

## b. Microscopie électronique à balayage (MEB).

L'observation des surfaces est réalisée à l'aide d'un microscope électronique HITACHI S 2500, sous une tension de 20 kV. Préalablement à leur observation, les surfaces sont fixées.

Elles sont lavées avec du tampon PBS 0,1 M pH 7,4 puis fixées dans une solution de glutaraldéhyde à 2 % (v/v) dans un tampon cacodylate de sodium 0,15 M pH 7,4. Après un lavage dans ce même tampon, les échantillons sont déshydratés par passages successifs de 5 min dans de l'éthanol (de 25 % à 100 %). La déshydratation est menée jusqu'au passage du point critique. Les échantillons sont ensuite métallisés par une couche d'or (pulvérisation cathodique).

## c. Microscopie de Force Atomique (MFA) appliquée à l'observation d'ostéoblastes.

Les observations ont été réalisées sur un MFA de type Nanoscope IIIa-Multimode (Digital Instruments, Santa Barbara, USA) équipé d'une céramique piézo-électrique « J » et contrôlé par un «NSE controller» (Digital Instruments). Les déplacements maximum de cette céramique sont de 130  $\mu\text{m}$  x 130  $\mu\text{m}$  dans le plan XY, et de 5,5  $\mu\text{m}$  dans le plan vertical Z.

Le microscope est utilisé après avoir atteint un équilibre thermique.

Les images sont enregistrées en mode force constant. Les leviers sont en nitrure de silicium et ont une constante de raideur de 0,06 N/m et la pointe présente un angle d'inclinaison de 35 ° par rapport au levier, comme l'indique le fabricant. Dans le cas d'observation de cellules, l'étude est menée en milieu liquide, (milieu de culture cellulaire). La vitesse de balayage maximale utilisée est de 260  $\mu\text{m/s}$ . L'angle de balayage est de 90 °. Au début de l'engagement, le domaine d'observation de la surface est de 10 nm et la fréquence de balayage est de 1 Hz. La zone de contact entre la pointe et la cellule est ainsi minimisée afin de définir la force minimale à appliquer par la pointe sur la cellule au moyen d'une courbe de force ou en mode image, en diminuant la force appliquée jusqu'à ce que la pointe ne soit plus en contact avec la surface et ensuite, en l'augmentant pour restaurer le contact pointe-surface. La taille de la zone balayée est augmentée progressivement afin d'observer une cellule entière. La force appliquée, sauf indication particulière, est gardée la plus basse possible par une estimation et un ajustement de cette force en mode image. Les images obtenues en

« aller » et en « retour » ont été comparées. Pour permettre une meilleure observation des images, elles ont toutes été corrigées ligne par ligne de la valeur moyenne de leur pente. C'est ce qui est appelé « flatten » (en anglais). Les courbes de force sont enregistrées avec des vitesses de déplacement de la céramique en Z comprises entre 2  $\mu\text{m/s}$  et 8  $\mu\text{m/s}$ .

# Annexe 2 : Techniques de caractérisation chimique des surfaces de biomatériaux

Les analyses physico-chimiques s'avèrent, depuis une dizaine d'années, des outils indispensables pour la caractérisation de surface de matériaux en vue de l'élaboration de nouveaux biomatériaux. Cette science a pour objectif de réaliser des surfaces qui seront directement en contact avec les tissus biologiques de l'hôte où sera implanté le biomatériau. Ces surfaces peuvent être anti-adhésives ou au contraire adhésives suivant l'application envisagée du biomatériau. Elles peuvent être considérées comme un réseau bien défini de sites de bio-reconnaissance qui interagiront (ou non) spécifiquement avec des protéines, des lipides, des polysaccharides ou des cellules. Cette interaction dépend de l'arrangement spatial des molécules présentes à l'interface du biomatériau.

De nombreuses études ont été entreprises en vue d'essayer de corréler les caractéristiques physico-chimiques superficielles des matériaux avec les phénomènes observés aux interfaces matériau-tissus. L'échec relatif de ces tentatives semble dû à la difficulté du choix des bons critères de description des surfaces, et surtout en l'absence (ou quasi-absence) de prises en compte de la distribution spatiale des critères retenus. Quelle que soit la propriété considérée, ce n'est jamais son expression locale qui est mesurée (Figure 72) mais son expression moyenne sur une aire de plusieurs mm<sup>2</sup>. Il est donc essentiel de pouvoir décrire la surface d'un biomatériau à l'échelle la plus proche possible de celle des acteurs qui interviennent lors de la confrontation matériau-tissu<sup>171</sup>.

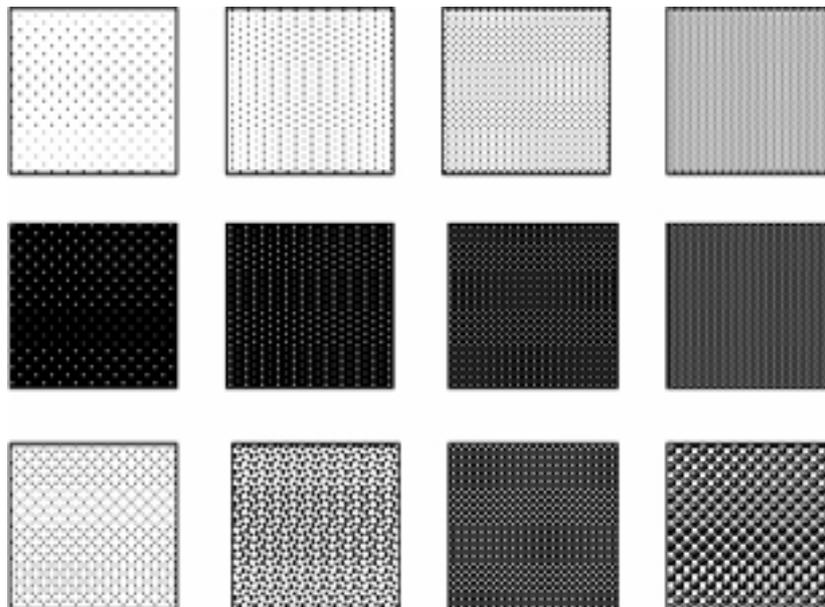


Figure 72. Exemple de cartographie du plan x-y dans le cas de deux espèces chimiques présentes à la surface et notées par des points blancs et noirs.

Parvenir à une cartographie chimique d'une surface la plus précise possible (composition, structure moléculaire, orientation, résolution spatiale des espèces chimiques) permettra donc de mieux comprendre les phénomènes biologiques qui se produisent *in vivo*, après que le biomatériau soit implanté. Les informations recueillies fournissent ensuite de nouvelles pistes pour développer des biomatériaux toujours plus adaptés aux besoins de leurs applications spécifiques.

Le but de ce chapitre est de présenter quelques unes des techniques de caractérisation physico-chimique des surfaces, parmi les nombreuses méthodes disponibles. Seules les techniques qui ont été utilisées dans cette étude et limitées au cadre de la science des surfaces de biomatériaux seront décrites brièvement dans leur principe. Il s'agit de :

- la microscopie de force atomique (MFA)
- la spectroscopie de photoélectrons (XPS)
- la spectroscopie infrarouge (PM-IRRAS)

Le Tableau 10 reprend quelques caractéristiques de ces techniques.

Technique	Acronyme	Zone analysée (Diamètre moyen)	Profondeur analysée	Information
Spectroscopie de photoélectrons	XPS (ou ESCA)	Dizaine de $\mu\text{m}$ à Quelques nm	1 à 5 nm	Analyse chimique
Microscopie de force atomique	MFA	Résolution atomique	Quelques nm	Morphologie ...
Spectroscopie infrarouge	PM-IRRAS	Quelques nm	1-20 nm	Analyse chimique

Tableau 10. Caractéristiques de techniques d'analyse chimique utilisées dans cette étude.

## 3. La microscopie de force atomique

Elle est basée sur une pointe solide qui balaye une surface et est connue sous le nom générique de microscopie à champ proche.

Le principal instrument de caractérisation utilisé au cours de ce travail de thèse est la MFA, appliquée à des études biologiques. L'originalité de cette approche de caractérisation de l'adhésion cellulaire a été détaillée tout au long de ce manuscrit et n'est pas abordée dans cette annexe. Seule l'utilisation de la MFA comme outil de caractérisation chimique des surfaces est présentée par la suite. Il faut souligner que l'utilisation de ce microscope pour cette application a déjà été l'objet de nombreuses publications et thèses<sup>172,173,174,175</sup>, où le lecteur trouvera les notions brièvement présentées par la suite expliquées et détaillées de façon approfondie.

### 3. 1. Principe

La MFA<sup>1,2</sup> fait partie des microscopies à champ proche, et a été développée dès 1986 par Binnig, Quate et Berger à partir de la microscopie à effet tunnel<sup>3</sup> (ou STM, scanning tunneling microscopy). A la différence du STM, qui utilise les variations d'un courant tunnel pour observer une surface, la MFA est basée sur les variations d'interaction entre une sonde et une surface, ce qui permet d'observer des échantillons conducteurs ou isolants. La sonde est constituée d'un levier souple terminé par une pointe très fine, dont l'extrémité, si elle est identifiée à un cône, est de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres (Figure 73).

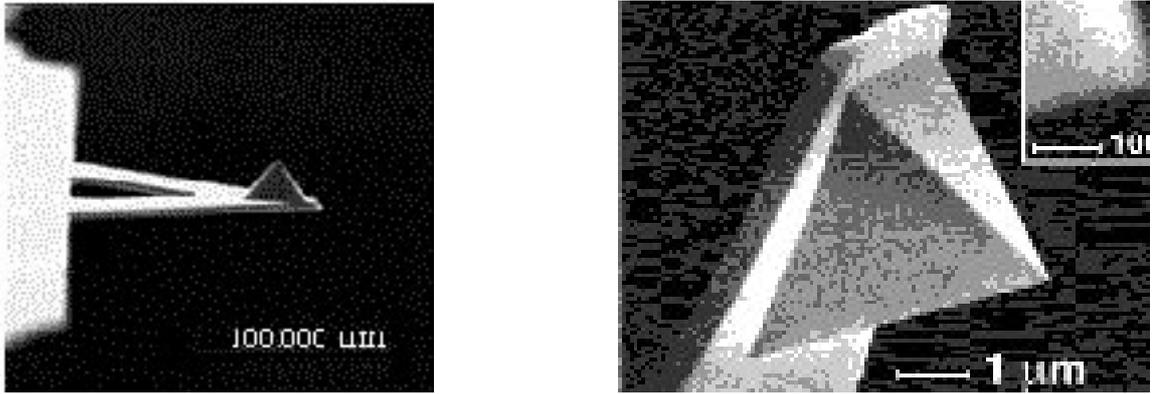


Figure 73. Image d'une sonde de MFA.

Cette sonde contrôle la distance entre la pointe et la surface. Leur interaction est fortement dépendante de cette distance (Figure 74).

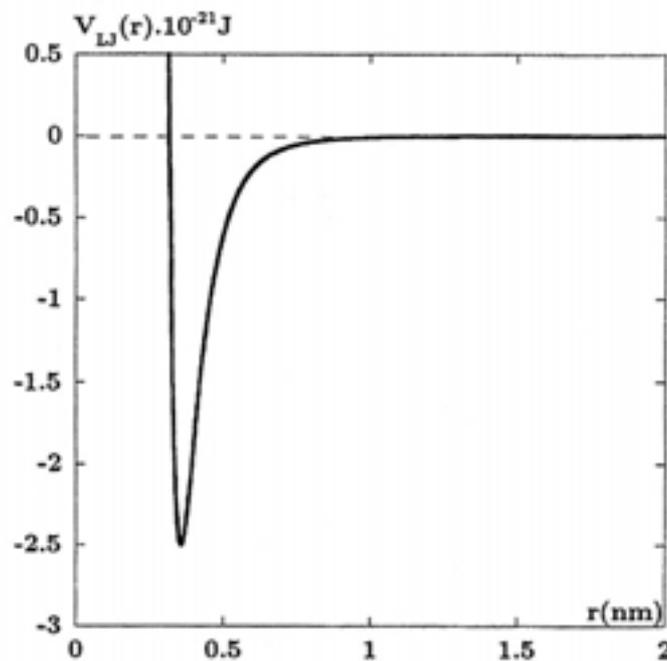


Figure 74. Potentiel de Lennard-Jones<sup>98</sup>.

Les valeurs des coefficients sont  $B=10^{-134} \text{J.m}^{12}$  et  $C_{vdW}=10^{-77} \text{J.m}^6$ .

Lorsque la pointe est approchée de la surface, une force (de quelques nanonewtons) est exercée sur la pointe, ce qui entraîne une déflexion du levier. Cette déviation est enregistrée sur un système de détection optique grâce aux déplacements d'un faisceau laser. Il est focalisé à l'extrémité du levier sur sa face supérieure qui est recouverte d'or puis est réfléchi vers un système de détection optique constitué de photodiodes.

De plus, l'échantillon est déplacé dans le plan x-y par une céramique piézo-électrique, qui autorise des déplacements de quelques dizaines de microns. Ces déplacements sont contrôlés par ordinateur. Le principe du microscope de force atomique est donné sur la Figure 75.

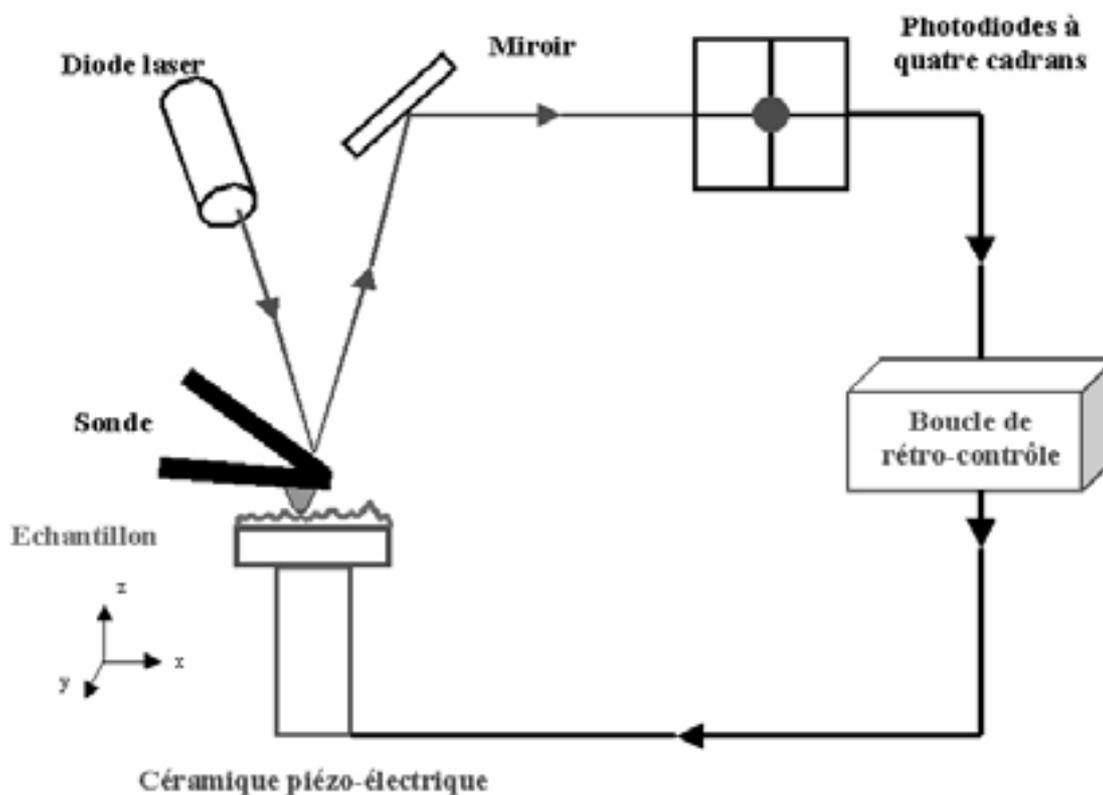


Figure 75. Principe de fonctionnement d'un microscope de force atomique.

Les informations obtenues sont la topographie de la surface. Cette microscopie, comme son nom l'indique, permet aussi de calculer des forces locales comme par exemple, la force d'adhésion, ou la force de friction entre la pointe et la surface.

Il existe plusieurs modes de fonctionnement pour cette microscopie.

En mode contact, la pointe est physiquement constamment au contact de la surface durant le balayage de la surface par la pointe. Des forces de cisaillement s'exercent au contact pointe – surface, lors de ce balayage et l'échantillon peut être endommagé.

Afin de minimiser ces forces, deux autres modes de contact dits intermittents<sup>176,177</sup> ont été développés. La sonde oscille au dessus de la surface de telle sorte que :

- - Dans le mode « tapping », le contact pointe – surface ne soit plus qu'intermittent durant le balayage de l'échantillon sous la pointe. Plus précisément, le levier vibre à une

fréquence proche de sa fréquence de résonance et la pointe balaye la surface de l'échantillon. La surface de l'échantillon est maintenue à une distance de la position d'équilibre du levier telle que l'amplitude des oscillations du levier soit constante et égale à une valeur de consigne. Les amplitudes sont de l'ordre de 20 à 100 nm. Elles changent quand la pointe balaye une surface dont le relief est en bosse ou en creux. Les changements en amplitude et en phase des oscillations à proximité de la surface sont enregistrés.

La topographie de la surface est obtenue en maintenant l'amplitude constante (par analogie, en mode contact, c'est le signal de déflexion qui est maintenue constant). La phase fournit des informations sur les propriétés de l'échantillon comme la densité de charge en surface, l'élasticité ... L'échantillon est moins endommagé dans ce mode, et il permet d'accéder à une plus haute résolution latérale. Cependant, l'observation d'un échantillon nécessite plus de temps que par le mode contact à cause d'une vitesse de balayage lente. A titre indicatif, les forces mesurées en mode contact peuvent être de l'ordre du nN au  $\mu\text{N}$  dans des conditions ambiantes et de 0,1 nN ou même moins en milieu liquide tandis qu'en mode « tapping » elles sont de 200 pN ou moins.

- - Dans le mode « non-contact », la pointe n'entre pas en contact avec la surface mais oscille à une fréquence au-dessus de la fréquence de résonance du levier à une distance plus ou moins proche de la surface. Les oscillations du levier sont inférieures à 10 nm. C'est la fréquence d'oscillation du levier qui est maintenue constante et égale à une valeur de consigne à une distance de la position d'équilibre du levier. L'échantillon n'est pas endommagé par ce mode en non-contact. Mais, la vitesse de balayage est très lente et la résolution latérale est faible. De plus, ce mode peut seulement être utilisé dans le cas d'échantillons hydrophobes.

## 3. 2. Le principe du mode contact

Le mode d'analyse qui figure dans cette étude est le mode contact. Ses différents principes de fonctionnement sont détaillés par la suite.

### a. Analyse topographique

Cette analyse fournit des images des surfaces des échantillons.

En mode contact, la pointe, au contact de la surface de l'échantillon, est soumise à une force répulsive.

En mode contact asservi, elle est maintenue constante grâce à une boucle d'asservissement commandant le déplacement en z de l'échantillon. Le signal de mesure est le déplacement selon z de la céramique piézo-électrique. Le contrôle du déplacement vertical est fait par une boucle de contre-réaction électronique assurant une différence de tension constante entre les photodiodes du haut et du bas. La force appliquée par la pointe sur la surface de l'échantillon est maintenue constante par des déplacements en z de la céramique piézo-électrique. La céramique déplace aussi l'échantillon dans le plan (x,y). Si le levier est défléchi vers le haut ou le bas au delà d'une valeur seuil, la boucle d'asservissement assure que la céramique se déplace verticalement, respectivement vers le haut ou le bas, jusqu'à ce que le levier retrouve une même déflexion. Dans ce mode de mesure, la déflexion du levier est toujours la même. On obtient alors une image iso-force de la surface, qui permet de remonter à la topographie de la surface.

Il est à noter que la boucle d'asservissement perturbe les mesures par le bruit *électronique* qu'elle induit. Il est possible de travailler en mode non asservi, c'est à dire sans déplacement selon z de la céramique piézo-électrique. L'échantillon n'est déplacé que selon (x,y). Le signal de mesure est la déflexion du levier. L'asservissement est cependant indispensable si les échantillons analysés sont très durs avec une rugosité importante ou très mous ; il évite de casser la pointe ou de déformer l'échantillon, respectivement.

## b. Topographie et forces de friction.

Plusieurs forces sont exercées par la pointe sur la surface de l'échantillon. Les forces agissant sur le levier sont :

- $\vec{F}_n$  une force normale appliquée par la pointe sur l'échantillon.
- $\vec{F}_f$  une force de friction issue du déplacement de l'échantillon sous la pointe.
- $\vec{F}_{adh}$  une force d'adhésion de la surface, lorsque les analyses sont réalisées à l'air.

Ainsi, la pointe exerce une charge effective qui est une contribution de la charge normale et de l'adhésion de la surface.

La formation des images dans le plan (x,y) se fait par une succession de balayages aller et retour de la pointe sur la surface dans ce plan.

Il est aussi possible d'effectuer des balayages suivant une ligne x (y fixé). L'enregistrement des déviations du levier durant un cycle de déplacement aller-retour constitue une boucle de frottement (Figure 76).

# Déflexion ou Torsion

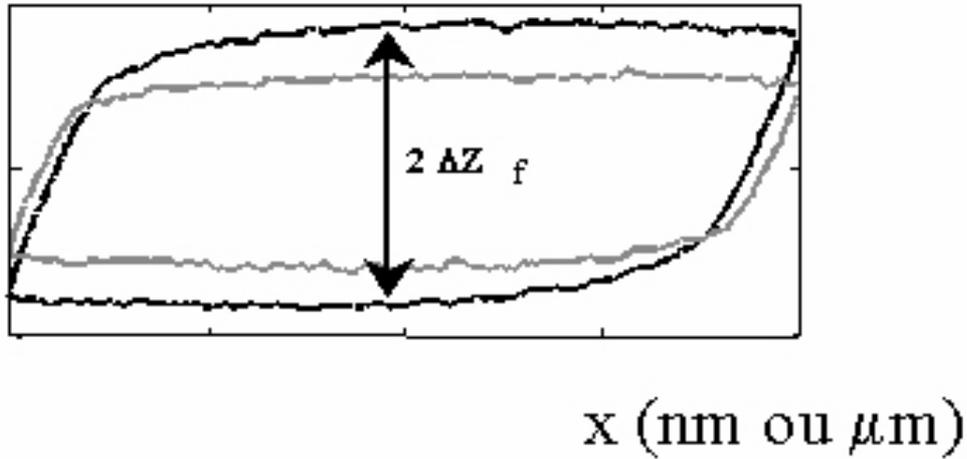


Figure 76. Boucle de frottement obtenue par MFA.

Le système levier-pointe peut balayer la surface suivant l'axe de symétrie du levier ou perpendiculairement à l'axe de symétrie du levier et la déflexion ou la torsion du levier sont mesurées (Ce sont les balayages à  $0^\circ$  et à  $90^\circ$  respectivement, sur un appareil de type Nanoscope. Ces deux types de balayage sont respectivement appelés balayage en déflexion ou en torsion. La déflexion du levier est la résultante de la force effective appliquée par la pointe et de la force de friction (Figure 77). La torsion du levier correspond à la force de friction.

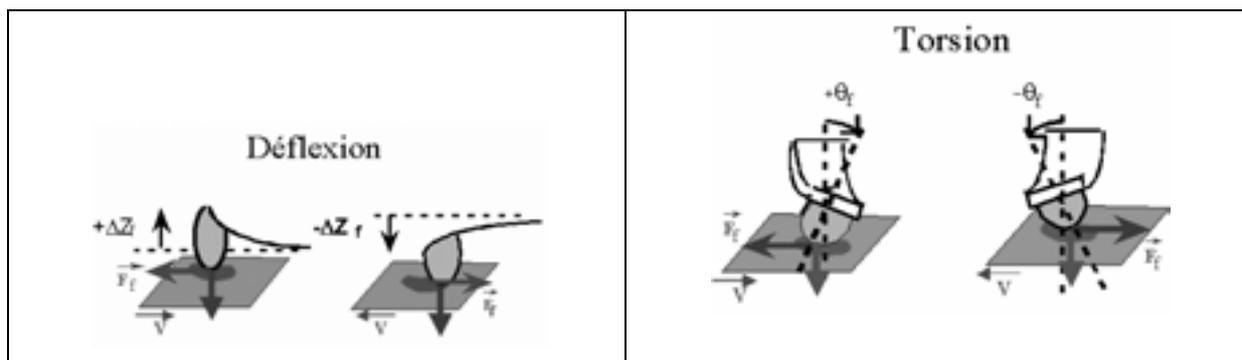


Figure 77. Contribution des forces appliquées sur une sonde de MFA lors de son déplacement en déflexion et en torsion.

Une image intègre la force appliquée par la pointe, l'adhésion de la surface et la forme de la pointe ainsi que la force de friction. Ce n'est pas la seule topographie. Un cycle de balayage aller-retour conduit soit à la topographie soit à la friction de la surface, par le bilan vectoriel suivant :

$$\frac{\text{Aller} + \text{Retour}}{2} = \frac{(\vec{F}_n + \vec{F}_f) + (\vec{F}_n - \vec{F}_f)}{2} = \vec{F}_n$$

$$\frac{\text{Aller} - \text{Retour}}{2} = \frac{(\vec{F}_n + \vec{F}_f) - (\vec{F}_n - \vec{F}_f)}{2} = \vec{F}_f$$

La friction est à l'origine du contraste d'une image. Pour une surface présentant un relief quelconque, le balayage est réalisé perpendiculairement à l'axe du levier et le signal de torsion est enregistré. Cela permet de s'affranchir du relief pour effectuer une mesure de frottement.

### c. Mode force

Il est également possible de mesurer des forces d'interaction à l'aide d'un MFA. Ce mode est indispensable pour calibrer la déflexion du levier en fonction du déplacement de la céramique, lui même préalablement calibré. Il permet d'évaluer rapidement la force de décollement qui est la force à appliquer à la pointe pour la décoller de la surface.

Le principe de cette méthode est expliqué par une courbe de force (Figure 78). La courbe de force est obtenue en enregistrant les déflexions du levier en fonction du déplacement de la céramique piézo-électrique. La pointe ne balaie plus la surface de l'échantillon. Elle sonde la surface en un point (x,y) grâce au déplacement en z de la céramique piézo-électrique.

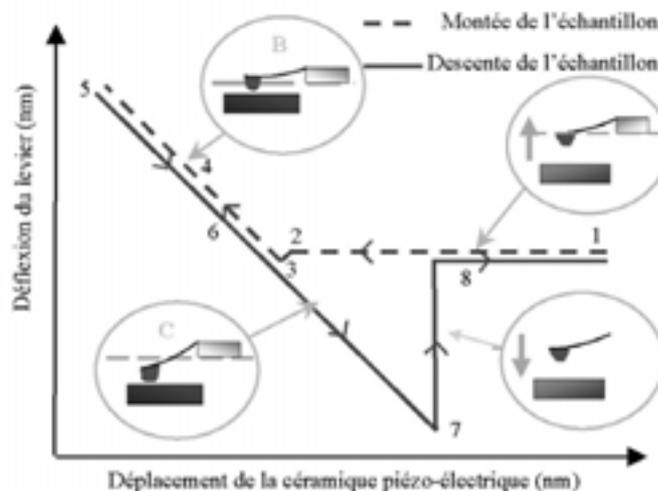


Figure 78. Courbe de force théorique obtenue par MFA.

En partant d'une position éloignée de l'échantillon, la surface est progressivement rapprochée de la pointe. Entre les points 1 et 2, aucune déviation du levier n'est observée, car il n'y a aucune force d'interaction entre la pointe et l'échantillon. Entre les points 2 et 3, la déviation négative observée est due aux forces attractives apparaissant entre la pointe et l'échantillon et qui obligent la pointe à se plier en direction de la surface. La hauteur de cette déviation est proportionnelle à la force attractive. Lorsque la surface entre en contact avec la pointe, le sens de la déviation du levier s'inverse. L'échantillon continue à se déplacer et la déviation augmente linéairement. A partir du point 5, le mouvement de l'échantillon est inversé. Le point 6 correspond à une distance nulle entre l'échantillon et la pointe, pour laquelle le levier n'est pas dévié. Quand l'échantillon continue à s'éloigner, la pointe reste au contact de la surface de l'échantillon grâce aux forces d'adhésion ( $\vec{F}_{adh}$ ) jusqu'au point 7 où la force élastique du levier l'emporte sur la force d'adhésion. Au point 8, le levier est revenu dans un état non dévié. La différence entre les points 7 et 8 donne une mesure des interactions à longue distance et permet, si on connaît la raideur du levier, de calculer une force d'adhésion entre la sonde et la surface.

### 3. 3. L'instrumentation

Un MFA est composé de trois parties distinctes : (Figure 75)

- Une partie sonde comprenant l'ensemble pointe-levier.
- Une partie détection, constituée d'une diode laser, d'un système de guidage du faisceau lumineux et de quatre photodiodes analysant les déflexions du levier.
- Une partie déplacement, comprenant une céramique piézo-électrique qui supporte et déplace l'échantillon dans son plan ou perpendiculairement à son plan.

Les déflexions du levier sont mesurées par un système de photodiodes délivrant une tension électrique proportionnelle à la déflexion.

### 3. 4. Les étapes de l'analyse

Une fois l'échantillon préparé, il est fixé sur un support et mis en place dans le microscope.

### a. Stabilité du microscope

Le microscope est utilisé après avoir atteint un équilibre thermique. Cet équilibre concerne la céramique piézo-électrique, son système électronique, ainsi que la sonde qui lorsqu'elle est placée sous le faisceau laser, va évoluer jusqu'à atteindre un équilibre.

### b. Stabilité du système sonde-échantillon

De plus, la tête du microscope est dans une boîte à gant qui maintient une atmosphère sèche dans le cas d'observation d'échantillons à l'air. En effet, les expériences sont réalisées après un balayage par un flux d'azote dans la boîte à gant qui contient en plus un dessiccateur. L'humidité résiduelle est inférieure ou égale à 0,6 ppm. Il est à noter que le levier du microscope est sensible aux variations d'humidité et de température dans des conditions ambiantes. Un changement de conditions initiales (en humidité ou en température) induit un changement dans la déflexion du levier ; un nouvel équilibre est atteint, mais il n'est pas immédiat. Un état stable est atteint quand plus aucune variation du levier n'est détectée sur les photodiodes. La stabilité du levier est un indicateur de conditions stables et sèches dans la boîte à gant. Toutes les expériences sont réalisées sous une atmosphère sèche. Cela assure la reproductibilité et des variations significatives des force de friction en fonction de la température.

Il a été estimé que l'ensemble « boîte à gants – échantillon - microscope » est stable après un temps d'équilibrage de 24 h.

### c. Réglage du microscope

Une fois l'équilibre atteint, un réglage plus précis du faisceau laser à l'extrémité de la pointe est effectué.

### d. Réglage des photodiodes

Le domaine de réponse linéaire du signal de détection vertical des photodiodes est faible. Une attention particulière devra être portée afin de toujours se placer dans ce domaine (+2V, -2V). Le domaine de charge de la pointe sur la surface est de la même façon faible, à cause de ce système de détection. Pour accéder à d'importantes variations de charge, il faut recentrer les photodiodes.

### e. Début de l'analyse par MFA

L'engagement du début de l'expérience de MFA sur une petite zone (de quelques dizaines de nanomètres) peut être effectué une fois que l'ensemble de ces réglages a été réalisé. La force appliquée juste après l'engagement doit être faible pour éviter d'endommager l'échantillon.

### f. Réglage de la planéité de l'échantillon

Enfin, si la surface de l'échantillon présente une pente (Figure 79), la charge exercée par la pointe évolue. La pente de l'échantillon sera réglée de telle sorte qu'elle soit inférieure à 2 % pour des balayages à 0° et à 90°.

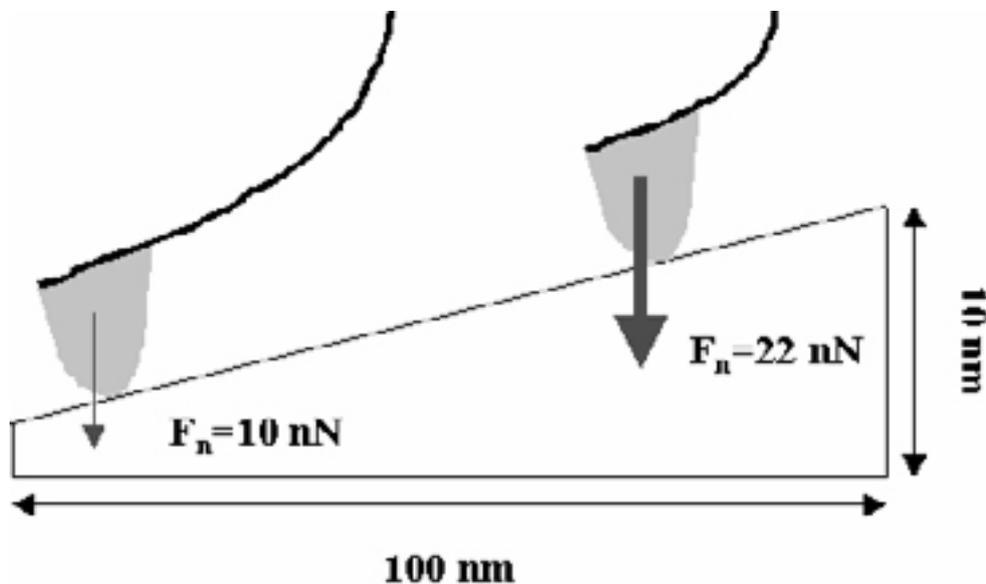


Figure 79. Effet de la pente de l'échantillon sur la force appliquée par la sonde du MFA.

### g. Calibrage de la déflexion du levier

Pour toute nouvelle sonde mise en place, il faut tout d'abord, enregistrer une courbe de force sur un échantillon de référence présentant une surface dure, de façon à pouvoir négliger sa déformation éventuelle. Les échantillons de silice sont habituellement utilisés. En effet, la déflexion du levier doit être correctement calibrée. A un déplacement donné de la céramique piézo-électrique doit correspondre une déflexion donnée identique du levier.

Le déplacement de la céramique est une combinaison du déplacement du levier  $\delta_m$  et de la déformation  $\delta_e$  de l'échantillon, ce qui s'écrit :

$$\Delta = \delta_e + \delta_m$$

La variation de déflexion du levier est donnée par la variation de charge appliquée à la pointe dP et par la raideur du levier  $k_m$  :  $d\delta_m = dP / k_m$ .

D'où :

$$d\Delta = d\delta_m \left(1 + \frac{k_m}{k_e}\right)$$

où  $k_e = dP / d\delta_e$  désigne la raideur effective associée à l'échantillon.

La pente de la courbe sur la partie compression- extension du levier (zone 3 à 6 - Figure 78) est donnée par :

$$p = \frac{1}{\left(1 + \frac{k_m}{k_e}\right)}$$

Si l'échantillon présente une surface dure,  $k_e \gg k_m$ , la pente tend vers 1. La déflexion du levier est correctement évaluée quand la pente de la courbe de force est égale à 1. Le calibrage de la déflexion du levier est correct dans ce cas, et est une condition préalable et indispensable à la réalisation de toute expérience par MFA.

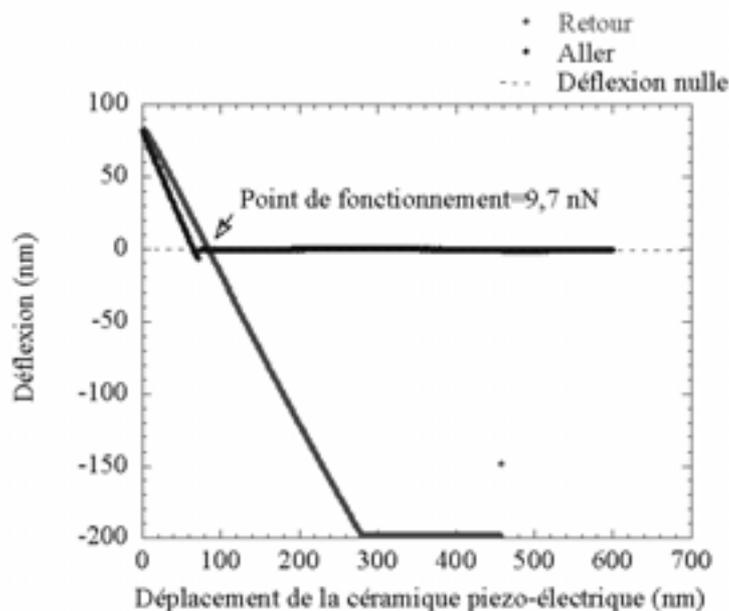


Figure 80. Courbe de force enregistrée sur une surface de silice sous atmosphère sèche et à température ambiante.

La Figure 80 présente une courbe de force typique obtenue sur une surface de silice à l'air et sous atmosphère sèche. Sur cette surface dure et non déformable, la courbe présente un comportement linéaire quand la pointe est au contact de l'échantillon. En effet, la déflexion du levier est proportionnelle au déplacement en z de la céramique piézo-électrique. Pour un levier ayant une raideur de 0,12 N/m, la force externe appliquée pour observer les échantillons est de 9,6 nN. Une déflexion nulle, indiquée par des pointillées sur la figure 12 correspond à la force externe appliquée après l'engagement de la pointe sur la surface de l'échantillon. Dans le cas présenté, cette force est réglée à une valeur nulle par un ajustement des photodiodes à zéro. Le point de fonctionnement du microscope pour observer des images est donc celui de la force d'adhésion et est de 9,6 nN.

## h. Réalisation des analyses par MFA, exemple de déroulement d'une expérience de tribologie.

La surface de l'échantillon peut ensuite être observée ; les forces de décollement à partir de la courbe de force peuvent être évaluées ... Les expériences de tribologie vont être plus précisément détaillées.

Il faut s'assurer, préalablement à ces expériences, que le signal à 0° (dans le cas d'un microscope de type Nanoscope) est uniquement un signal en déflexion et celui à 90° est un signal en torsion. Il peut être parfois nécessaire d'effectuer de nouveaux réglages du faisceau laser à l'extrémité de la pointe.

Chaque expérience est réalisée pour une température donnée, et sous une atmosphère sèche afin d'assurer une bonne reproductibilité de ces expériences. La force externe appliquée est conservée à 0 N et une gamme de vitesse de balayage est choisie. Pour une vitesse de balayage donnée, la force de friction à 0° ou à 90° est relevée. L'asservissement de la céramique piézo-électrique est coupé pour chaque relevé de la force de friction. En effet, le bruit électronique induit par la boucle de contre-réaction électronique et le temps de la mise en place de l'asservissement de la céramique piézo-électrique peut perturber les mesures des forces de friction. De plus, l'asservissement crée des variations brutales d'aire de contact entre la pointe et la surface, au cours de la mesure. Or la force de friction est reliée à l'aire de contact pointe-surface par la relation :

$$F_f = \mu.P$$

où  $F_f$  est la force de friction,  $\mu$  est le coefficient de friction et P la charge appliquée par la pointe sur la surface.

Cette équation a été établie à partir de l'équation phénoménologique, définie par Admonton :

$$F_f = \tau \cdot A$$

où  $F_f$  est la force de friction,  $\tau$  est la contrainte de cisaillement entre un glisseur et une surface et  $A$  est l'aire de contact entre le glisseur et la surface de l'échantillon.

Une variation de cette aire de contact entraîne une fausse mesure de la variation de la force de friction. Seuls les relevés de force de friction enregistrés en mode non asservi sont cohérents. Par contre, balayer une surface sans boucle d'asservissement impose d'avoir une surface la plus plane possible, afin que la charge extérieure ne varie pas lors du balayage. Les expériences de tribologie sont toutes réalisées pour des surfaces présentant des pentes inférieures à 2 %.

Les réglages du microscope ne sont pas modifiés durant toute la durée de ces mesures. A chaque vitesse, 10 mesures de forces de friction sont relevées et la moyenne est calculée. Les forces de friction moyennées sont normées par rapport à la valeur mesurée à la vitesse de 1  $\mu\text{m/s}$ , pour chaque échantillon.

Dans notre étude, les forces de frottement ont été mesurées sous une atmosphère sèche en fonction de la vitesse et de la température dans le but d'évaluer l'état et la stabilité de différents greffages. Le protocole décrit précédemment est appliqué pour chaque température choisie, après s'être assuré de la stabilité du microscope au moyen de courbes de force. L'échantillon est à une température ambiante de 30°C. Cette température est augmentée par pas de 5°C jusqu'à une température de 100°C, et des courbes de force sont enregistrées avec le microscope. Le levier, très proche de la surface défléchit lorsque la température augmente. Cet effet n'est pas lié à une évolution des forces d'interaction à la surface de l'échantillon mais au gradient de température auquel le levier est soumis. En effet, le levier est composé de deux matériaux différents (du nitrure de silicium et une fine couche d'or sur sa partie supérieure) qui subissent des contraintes thermiques. Il défléchit de façon importante puis revient à sa position d'équilibre au bout de 15 min. Il peut aussi être nécessaire de décaler mécaniquement la position des photodiodes au fur et à mesure des changements de position verticale de la céramique piézo-électrique afin d'effectuer les mesures de force de frottement dans la gamme de réponse linéaire des photodiodes. Cette manipulation est assez délicate. Une fois le microscope stable à la température de 100°C, les mesures de force de friction peuvent être réalisées à différentes vitesses. Le même protocole est utilisé lorsque la température est ramené à 30°C.

### 3. 5. Résultats

Dans notre étude, les analyses par MFA ont été réalisées au laboratoire C.P.M.O.H. sur un appareil de type PicoSPM (Molecular Imaging, Phoenix – USA). Divers types d'analyses dont les conditions particulières ont été détaillées dans l'annexe « Matériel et Méthodes » ont été menés et des résultats seront présentés par la suite afin d'illustrer quelques informations fournies par cette technique.

#### a. Mesures de forces d'adhésion sur différentes surfaces et dans différents milieux

L'interaction entre la pointe et la surface varie avec la surface et le milieu dans lequel est immergé le système sonde-échantillon. Les surfaces testées sont le mica et la silice dans les milieux suivant :

- Air
- Eau pure
- Tampon 500 mM NaCl pH7
- Tampon PBS (« Phosphate buffered saline ») : NaCl 8mg/ml – KCl 0.2 mg/ml – Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5mg/ml – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 mg/ml.
- Milieu de culture DMEM
- Solution de polyéthylène glycol (PEG) dans de l'eau.

Les résultats sont présentés dans les Figure 81, Figure 82 et Figure 83.

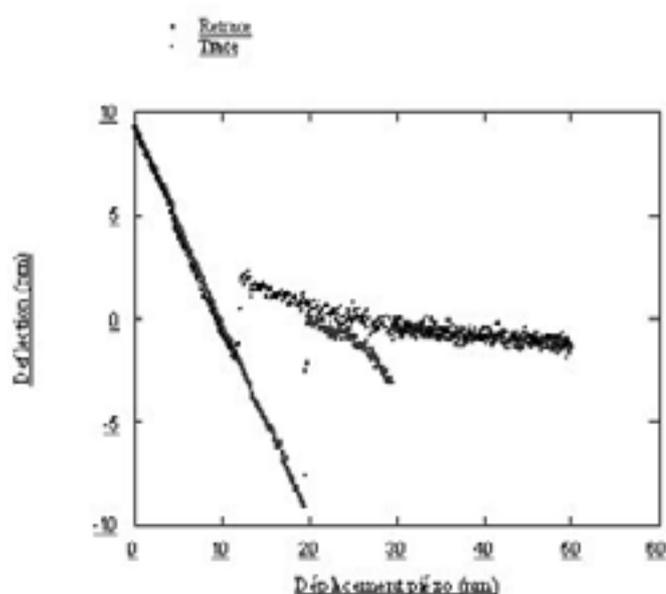
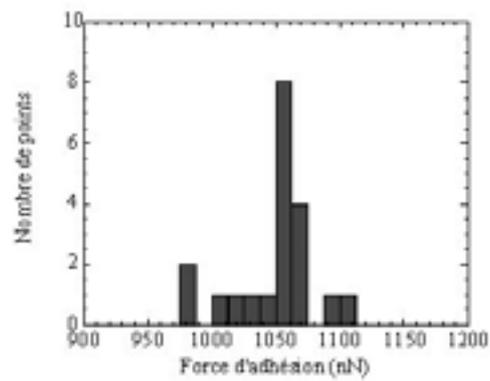
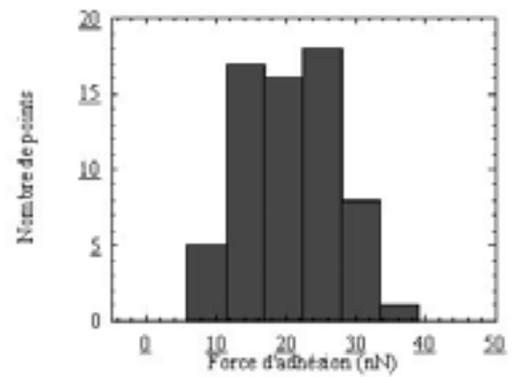


Figure 81. Courbe de force enregistrée sur une surface PEG adsorbé sur du mica dans de l'eau.

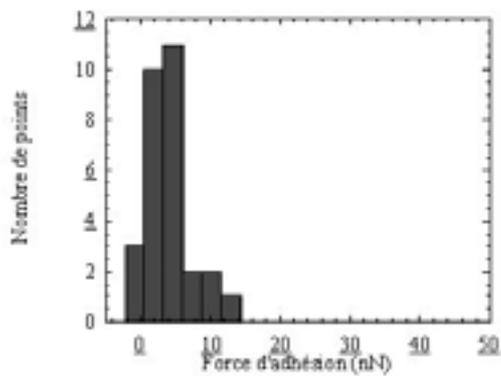
SURFACE DE MICA A L'AIR



SURFACE DE MICA DANS L'EAU



SURFACE DE MICA DANS TAMPON NaCl



SURFACE DE MICA DANS PEG 0.5mg/ml

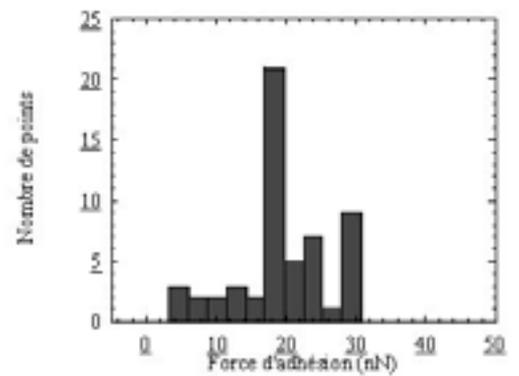


Figure 82. Histogrammes des forces d'adhésion mesurées sur une surface de mica dans différents milieux.

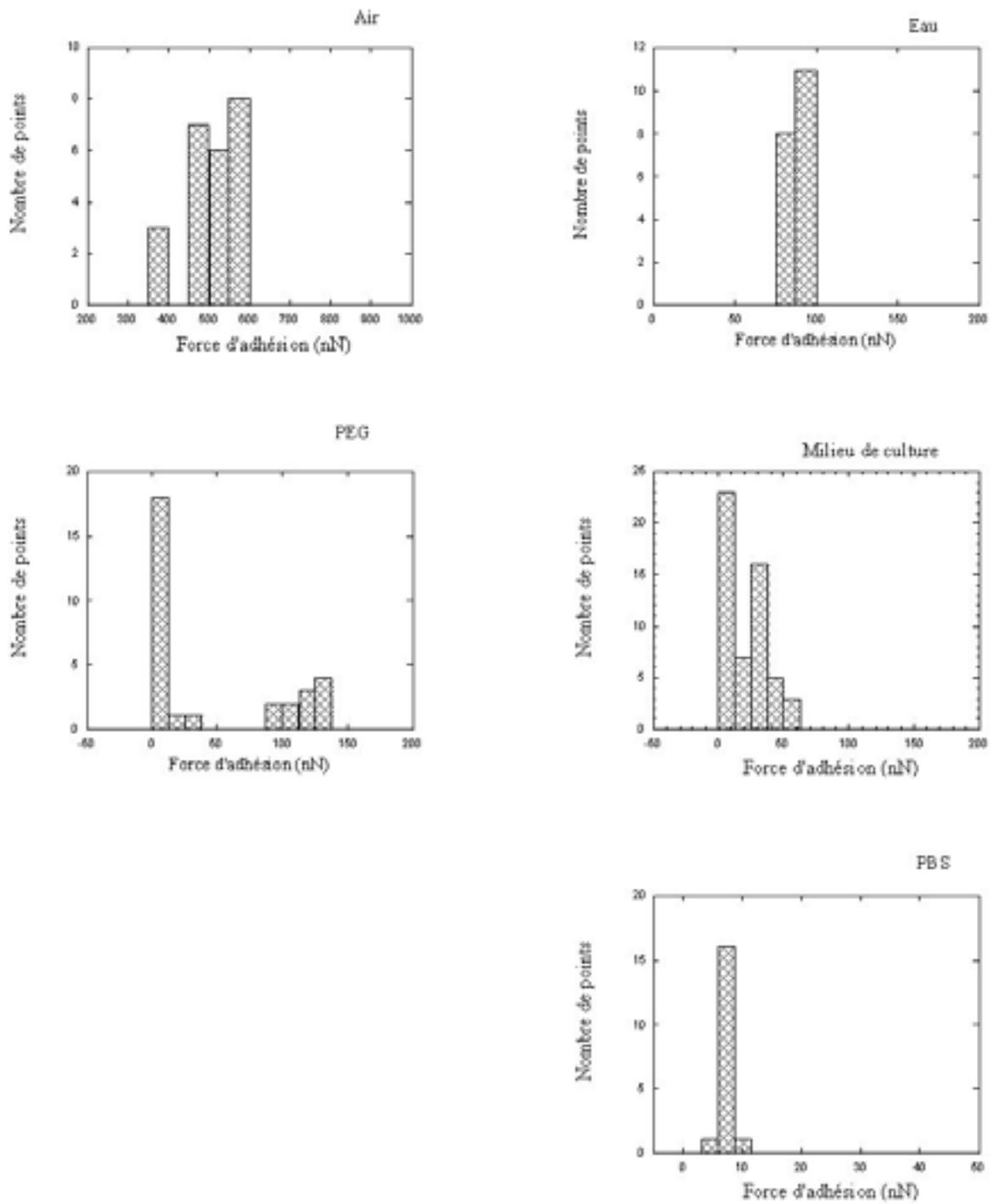


Figure 83. Histogrammes des forces d'adhésion mesurées sur une surface de silice dans différents milieux.

Le Tableau 11 reprend l'ensemble des forces d'adhésion moyennes pour différentes surfaces dans différents milieux testés.

MILIEU	n(mica)	Fadh(mica)	n(SiO <sub>2</sub> )	Fadh(SiO <sub>2</sub> )
AIR	20	1256,3	24	607,1
NaCl	29	4,7	-	-
EAU	65	25,1	19	106,7
PEG	55	23,7	31	51,5
PBS	30	0	18	8,7
MIL.CUL.	-	-	54	26

*n* : nombre de valeurs

*Fadh* en pN, pour 2 pointes avec  $k=0.12\text{N/m}$

Tableau 11. Forces d'adhésion sur différentes surfaces et dans différents milieux.

Les forces d'adhésion sont de l'ordre du nN à l'air, et du pN en milieu liquide. Les forces capillaires et les charges électrostatiques présentes à l'air sont écartées en milieu liquide.

## b. Mesure du bruit d'un microscope de type Molecular Imaging

Le bruit est de l'ordre de 5 pN (Figure 84).

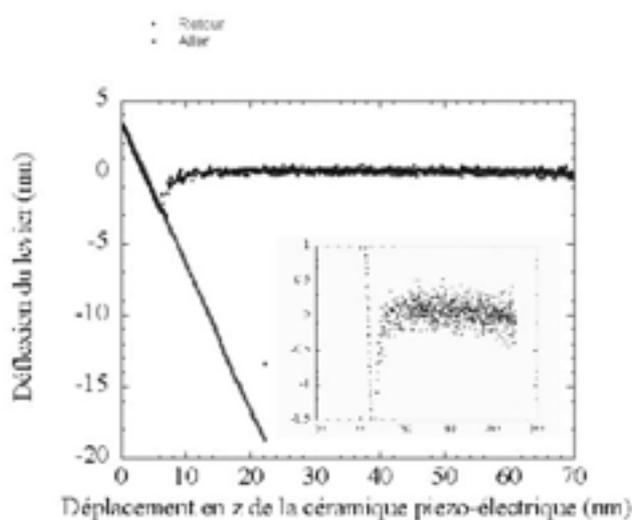


Figure 84. Mesure du bruit thermique à partir d'une courbe de force enregistrée sur une surface de silice dans du milieu de culture DMEM et à température ambiante.

## 4. La spectroscopie de photoélectrons X

Elle est basée sur l'émission de photoélectrons suite à une irradiation de type X<sup>178</sup>.

### 4. 1. Principe

L'irradiation d'une surface solide par un faisceau de photons X excite des électrons du solide d'un état initial occupé vers un état final vide. Si l'énergie de l'état final est suffisante, l'électron peut être émis dans le vide et être détecté dans un analyseur. La distribution énergétique des électrons renseigne alors sur la structure électronique de la surface émettrice. Cette spectroscopie est appelée X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) ou Electron Spectroscopy for Chemical Analysis (ESCA).

Les photoélectrons émis par un matériau soumis à une irradiation photonique sont caractérisés par leur énergie. Les informations obtenues sont :

- la composition des atomes présents en surface sur une profondeur de 10 nm. Presque tous les atomes sont détectés, sauf l'hydrogène.
- l'identification de l'environnement chimique des atomes
- l'analyse semi-quantitative de ces éléments

### 4. 2. Principe de la photoémission

En absorbant un photon, un atome reçoit une quantité d'énergie  $h\nu$ . Il émet alors un électron afin de conserver son état de stabilité initial (Figure 85). L'électron ainsi éjecté prend la totalité de l'énergie du photon incident. Il se libère de l'atome, puis de la matière et se déplace grâce à une énergie cinétique. En XPS, les photons incidents possèdent généralement une énergie de 1 à 2 KeV.

L'énergie relativement élevée du rayonnement incident provoque l'émission d'un électron appartenant à une couche intérieure de l'atome. Après ce type d'émission, il va rester des atomes ayant une vacance sur l'orbitale d'origine du photoélectron. La désexcitation de cet état ionique peut s'effectuer par émission radiative (fluorescence) ou par transition Auger. Le principe de la conservation de l'énergie permet d'écrire le bilan énergétique suivant, lors de l'absorption d'un photon d'énergie  $h\nu$  :

$$h\nu = E_{\text{cinétique}} + E_{\text{liaison}} + \Phi_{\text{travail de sortie}}$$

où  $h\nu$  est l'énergie incidente du faisceau de rayon X,  $E_{cinétique}$  l'énergie cinétique de l'électron à la sortie de l'échantillon,  $E_{liaison}$  l'énergie de liaison de l'électron dans l'atome et  $\Phi_{travail\ de\ sortie}$  l'énergie de travail de sortie de l'électron de la couche inférieure.

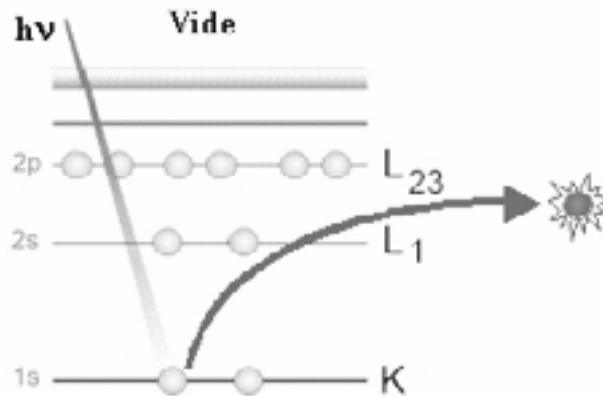


Figure 85. Expulsion d'un électron par un photon incident.

Il est possible de déterminer l'énergie de liaison d'un électron, caractéristique du niveau qu'il occupait dans cette matière à partir de son énergie cinétique mesurée après photoémission à la sortie de l'échantillon. Si le même atome se trouve dans deux sites chimiques non équivalents (notés 1 et 2), l'énergie de liaison d'un électron subit un déplacement :

$$\Delta E_{cinétique} = E_{cinétique}(1) - E_{cinétique}(2)$$

lorsque l'on passe du site 1 au site 2. Ce déplacement est une empreinte de l'environnement chimique et est de l'ordre de quelques dixièmes d'électronvolt à deux ou trois électronvolts. Les photoélectrons donnent des pics relativement étroits dont on peut facilement mesurer des déplacements de l'ordre de quelques dixièmes d'électronvolt, permettant ainsi d'identifier l'environnement chimique de l'atome émetteur.

### 4. 3. Instrumentation

Les expériences de photoémission nécessitent de disposer d'une source de photons et d'un spectromètre d'électrons. L'ensemble est inséré dans une enceinte ultravide.

### a. Source de photons

Les sources X les plus couramment utilisées sont des tubes à rayons X à anode d'aluminium ou de magnésium, qui délivrent des raies intenses  $K_{\alpha}$  à 1486,6 eV (largeur de raie 0,9 eV) et 1253,6 eV (largeur de raie 0,75 eV), respectivement. L'utilisation du rayonnement synchrotron permet de disposer d'une source de photons intense et continue, couvrant un domaine allant de l'UV aux X, avec une résolution de l'ordre de 0,05 eV à 0,5 eV selon le monochromateur utilisé.

Suivant la source X utilisée et la résolution recherchée, les échantillons, particulièrement les plus fragiles comme ceux qui sont biologiques, seront dégradés par l'analyse XPS.

### b. Les spectromètres d'électrons

L'analyseur le plus utilisé actuellement est l'analyseur dispersif de type condensateur hémisphérique à double focalisation à 180° (Figure 86).

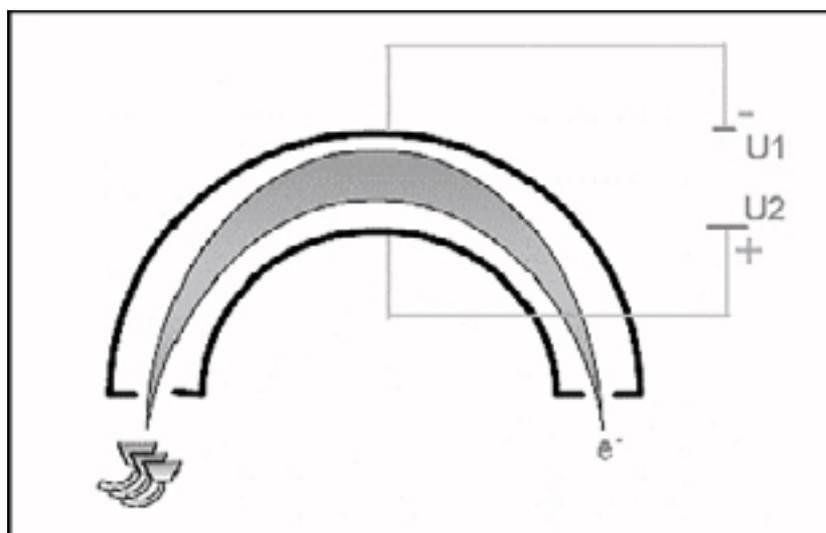


Figure 86. Analyseur hémisphérique.

## 4. 4. Etapes de l'analyse

L'échantillon à analyser est ensuite introduit dans une première enceinte (dite chambre d'entrée). Cette enceinte est mise sous vide grâce à un pompage secondaire, qui permet d'atteindre un vide inférieur à  $10^{-7}$  mbar. Une fois ce vide atteint, l'échantillon est transféré en

chambre d'analyse. Le vide dans cette chambre d'analyse varie de  $10^{-8}$  mbar à  $10^{-11}$  mbar. L'étude XPS peut commencer. Le schéma (Figure 87) résume le principe de l'acquisition d'un spectre XPS.

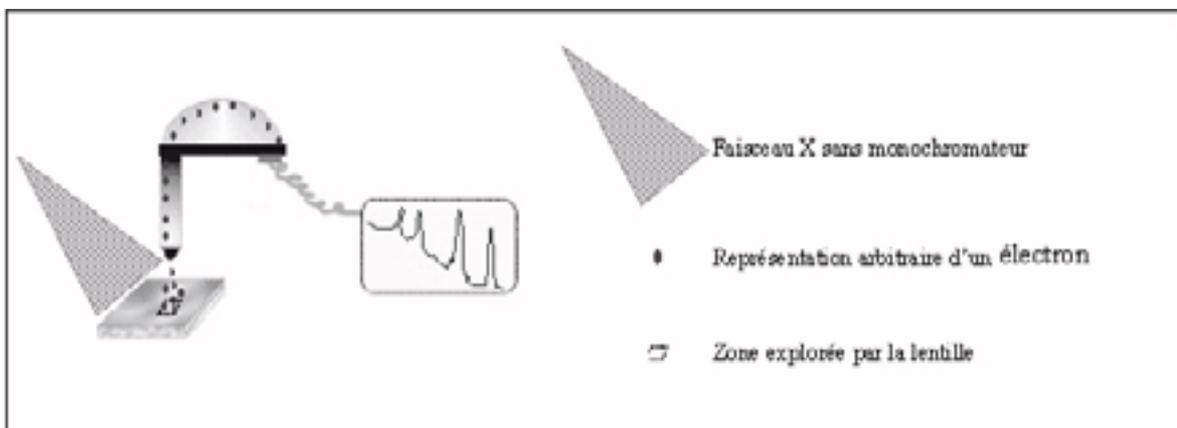


Figure 87. Principe de l'acquisition d'un spectre XPS.

Le photoélectron quand il possède une énergie cinétique suffisante, comme nous l'avons vu, quitte la matière. Pour déterminer l'énergie de liaison qu'il avait dans cette matière, il faut connaître son énergie cinétique à la sortie de l'analyseur. Un système de lentille attire l'électron vers l'analyseur. Cet analyseur est constitué de deux plaques portées à un certain potentiel. L'électron en entrant dans l'analyseur est soumis à un champ électrique qui lui fait décrire une trajectoire d'équation :

$$F = eE = \frac{mv^2}{R}$$

où F est la force, v la vitesse, R le rayon de la trajectoire, E le champ électrique résultant du potentiel U, m et e respectivement la masse et la charge de l'électron. D'après cette équation, à un champ donné et donc à un potentiel U donné correspond une énergie cinétique. Ainsi, pour divers rayons de trajectoire, l'analyseur hémisphérique se comporte comme un filtre d'énergie.

La première étape dans la caractérisation d'un échantillon est l'enregistrement du spectre large bande. Sur le spectre XPS, à chaque raie, correspond une énergie de liaison et des tables permettent de connaître l'orbitale associée à cette énergie de liaison. Il se peut qu'il y ait plusieurs solutions pour une même raie. Or, pour un même élément, le spectre XPS comporte une raie principale et des raies secondaires. Aussi, pour s'assurer de la bonne attribution d'une raie (d'une énergie de liaison) à un élément (une orbitale), on vérifiera les

positions et les intensités de ces raies secondaires. L'acquisition du spectre large bande permet d'identifier les différents composants chimiques de l'échantillon. Pour étudier la nature des liaisons chimiques, il faut définir pour chacune de ces composantes une fenêtre d'acquisition. Dans chacune de ces fenêtres, une nouvelle acquisition est lancée avec un pas de 0,1 eV. Cette résolution permet alors d'étudier, par désomation, les différentes contributions chimiques de chaque élément.

## 4. 5. Résultats

Dans notre étude, les analyses XPS ont été réalisées au sein du Centre de Caractérisation des Matériaux Avancés, ICMCB-CNRS, de l'Université de Bordeaux I par Christine Labrugère. Les conditions de ces analyses ont été détaillées dans l'annexe « Matériel et Méthodes ». La technique XPS permet d'obtenir une information quantitative sur la composition du greffage du peptide. Les résultats sont présentés au Chapitre III. 2 dans la seconde partie.

# 5. La spectroscopie différentielle infrarouge par modulation de polarisation

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques entre deux atomes d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques. Le montage en lumière polarisée sous réflexion rasante et avec modulation de polarisation (PM-IRRAS) est particulièrement bien adapté à la caractérisation des interfaces. Elle apporte à la spectroscopie infrarouge une sensibilité qui permet l'analyse et l'étude de systèmes moléculaires de très faible épaisseur tels que les monocouches peptidiques greffées à une surface.

## 5. 1. Principe

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est une technique d'analyse physico-chimique qui sonde les liaisons entre les noyaux atomiques et leurs arrangements. Cette méthode 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 quantitative. Les spectromètres mesurent les nombres d'onde (en  $\text{cm}^{-1}$ ) 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.

La grande diversité des montages expérimentaux permet la caractérisation de pratiquement tout type d'échantillon, quel que soit son état physique ou de surface. Cependant, dans le cas de couches ultraminces inférieures à 500 Å d'épaisseur, la spectroscopie IRRAS conventionnelle atteint ses limites de sensibilité et de détectivité. On utilise alors une méthode de réflectivité différentielle basée sur la modulation rapide de la polarisation de l'onde électromagnétique qui privilégie les absorptions de surface : la Spectroscopie InfraRouge de Réflexion Absorption par Modulation de Polarisation (PM-IRRAS)<sup>179, 180</sup>. Cette méthode améliore de plusieurs ordres de grandeur la détectivité des absorptions de surface, en distinguant efficacement les absorptions polarisées de surface de celles isotropes provenant de l'environnement de l'échantillon.

La technique PM-IRRAS combine les trois techniques suivantes<sup>181</sup> :

- la réflectivité en lumière polarisée et sous incidence quasi-rasante (IRRAS)
- la modulation rapide de la polarisation du faisceau incident entre les polarisations linéaires p (dans le plan d'incidence) et (normale au plan d'incidence) au moyen d'un modulateur photoélastique
- le filtrage, la démodulation et le traitement mathématique de l'intensité détectée, afin d'obtenir les signaux  $(R_p - R_s)$  et  $(R_p + R_s)$ , puis le signal de réflectivité différentielle normalisé

En plus du gain en détectivité de plusieurs ordres de grandeur et de la normalisation en temps réel réduisant considérablement les effets de dérive et d'instabilités (source, interféromètre, système de purge...) par rapport à l'IRRAS, cette méthode présente les avantages suivants :

- la réalisation d'études *in situ*, le montage optique étant disposé à l'air libre
- l'exaltation à incidence quasi-rasante du champ électrique perpendiculaire à la surface pour la lumière polarisée p dans le cas d'un très bon conducteur
- les règles de sélection de surface impliquant une relation entre l'orientation des moments de transition des modes de vibration et l'intensité et la direction des bandes correspondantes sur les spectres PM-IRRAS.

## 5. 2. Instrumentation

La spectrométrie IRTF est basée sur l'obtention dans le domaine temporel d'un interférogramme à l'aide d'un interféromètre de Michelson. Le spectre désiré est ensuite obtenu par transformée de Fourier de cet interférogramme.

Le dispositif expérimental de la technique PM-IRRAS est constitué d'un spectromètre IRTF Nicolet 740 et du montage optique de modulation de polarisation implanté à l'extérieur du spectromètre (Figure 88).

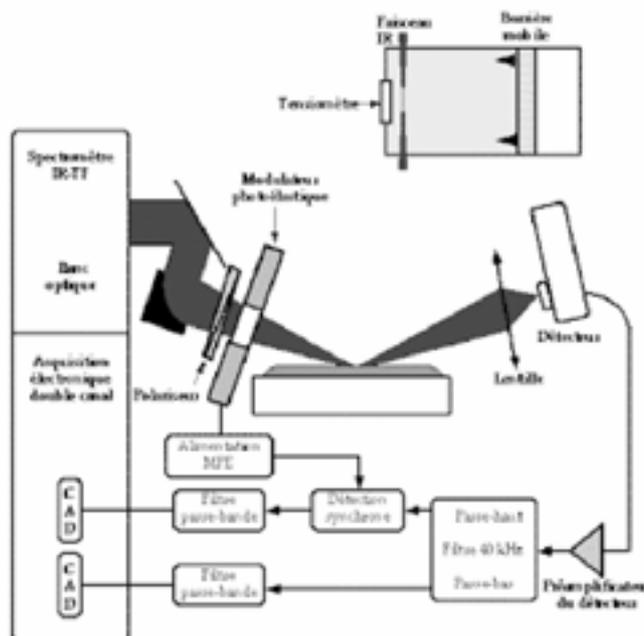


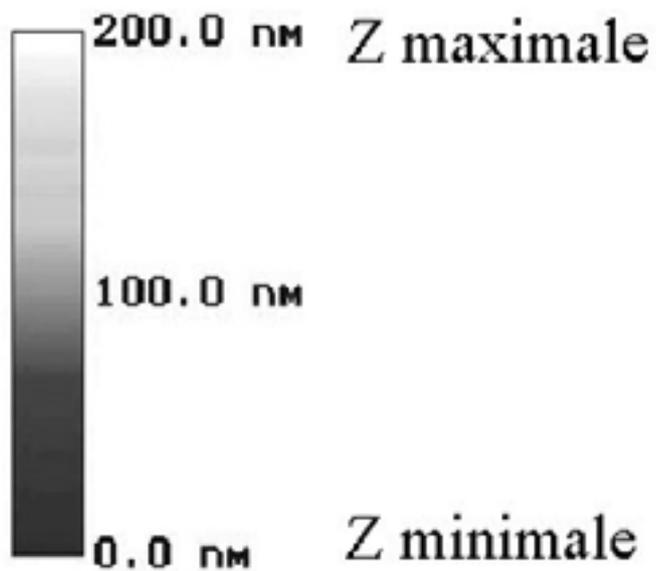
Figure 88. Principe du montage de spectroscopie infrarouge par modulation de polarisation.

Lors d'une utilisation classique du spectromètre, le faisceau parallèle émergent de la séparatrice est focalisé sur l'échantillon puis sur le détecteur. Le spectromètre doit être entièrement purgé à l'air sec de façon à minimiser les absorptions dues à la vapeur d'eau et au dioxyde de carbone.

### 5. 3. Spectre PM-IRRAS

Dans notre étude, les analyses par PM-IRRAS ont été réalisées au LPCM-CNRS, de l'Université de Bordeaux I par Bernard Desbat. Les conditions de ces analyses ont été détaillées dans l'annexe « Matériel et Méthodes ». Les résultats sont présentés dans la partie III au Chapitre III. 3.

# Annexe 3 : Code – couleur des images de MFA



La différence de couleur sur une image, indiquée par l'échelle en Z, représente des différences de hauteur sur l'échantillon. La hauteur maximale est indiquée dans les légendes des figures par la taille des images : XxYxZ.

XxY correspond à la dimension de la zone observée.

# Annexe 4 : Composition de l'os

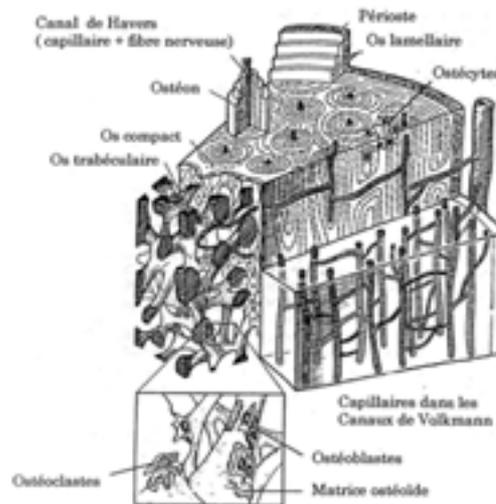
Il faut souligner que l'os fait l'objet de nombreuses études, et thèses<sup>182,183</sup> où le lecteur trouvera des informations détaillées de façon approfondie.

L'os est un tissu osseux conjonctif spécialisé qui participe à l'élaboration du squelette. Ce tissu possède trois propriétés : mécanique (soutien et locomotion), protectrice (organes vitaux), métabolique (homéostasie phosphocalcique). Comme tous les tissus conjonctifs, l'os est constitué de deux composantes : des cellules et une matrice extracellulaire. Cette dernière, très abondante, est composée de fibres de collagène et de protéines non collagéniques, participant à sa calcification.

#### LA STRUCTURE DE L'OS

Il existe plusieurs tissus osseux qui se distinguent les uns des autres par leur composition, leur organisation architecturale, notamment celle de la trame collagénique, et leur fonction. L'os fibreux, caractéristique de l'os foetal et des cals osseux, ne présente aucune organisation apparente des fibres de collagènes. Cet os fibreux est amené à subir un remodelage aboutissant à son remplacement par un os lamellaire. Cet os lamellaire est constitué de couches successives de matrice osseuse au sein desquelles les fibres de collagène sont arrangées parallèlement. L'orientation des fibres se modifie d'une lamelle à l'autre. Entre chaque lamelle se situent les logettes ou « ostéoplastes » abritant le corps cellulaire des ostéocytes.

L'os compact ou os cortical est un tissu dense et très résistant représentant environ 80 % de la masse osseuse totale. Son aspect histologique est caractérisé par la juxtaposition d'unités fonctionnelles élémentaires faites de 4 à 20 lamelles osseuses cylindriques, disposées concentriquement et centrées sur un canal : l'ostéon ou système de Havers. Les canaux de Havers sont reliés entre eux, avec la cavité médullaire et avec la surface de l'os, par des canaux transversaux : les canaux de Volkmann. Entre les ostéons se trouvent des lamelles osseuses, vestiges d'ostéons partiellement résorbés, constituant les systèmes « interstitiels ».



L'os trabéculaire ou spongieux est un tissu moins dense et moins organisé que l'os cortical. Il est composé d'un lavis tridimensionnel de spicules et travées osseuses, ramifiées et anastomosées, délimitant un labyrinthe d'espaces intercommunicants au sein desquels se distribue la moelle osseuse richement vascularisée.

Qu'il soit compact ou spongieux, le tissu osseux de l'adulte est majoritairement de type lamellaire, et ses propriétés mécaniques sont très supérieures à celles de l'os fibreux. Cette structure lamellaire est due au collagène de type I qui représente 90 % des protéines totales de l'os, et qui s'organisent en réseau de fibres orientées dans la même direction servant ainsi de guide aux structures cristallines d'hydroxyapatite. La superposition des lames fibreuses et calcifiées ainsi formées donne à l'os son aspect lamellaire. Cette structure lamellaire peut se disposer à plat (os trabéculaire ou périoste) ou autour d'un canal vasculaire (os haversien).

### LES ELEMENTS CELLULAIRES

L'os est un tissu conjonctif dynamique, comprenant une organisation remarquable entre les différentes populations cellulaires impliquées dans le maintien de la structure, le métabolisme biochimique et l'intégrité mécanique de ce tissu conjonctif minéralisé. Ce tissu subit de perpétuelles modifications, équilibre délicat entre résorption et renouvellement, sous le contrôle de l'activité des cellules osseuses. Les cellules principalement impliquées dans le processus de formation osseuse au sein du squelette sont les cellules stromales ostéoprogénitrices, qui contribuent au maintien de la population ostéoblastique ; les ostéoblastes qui synthétisent la matrice à la surface des structures osseuses en formation ; les

ostéocytes emprisonnés au sein de la matrice osseuse minéralisée et qui font corps avec la structure osseuse ; et les cellules bordantes protégeant la surface osseuse et servant d'interfaces avec les tissus environnants. Les cellules responsables de l'activité de résorption sont les ostéoclastes. Cependant, compte tenu de la richesse de l'environnement cellulaire, on ne peut exclure l'activité d'autres types cellulaires dans le processus de formation et de résorption osseuse. En effet, la conservation structurales et les fonctions métaboliques du tissu osseux nécessitent l'échange de signaux régulateurs élaborés au sein de ces différentes populations cellulaires.





# Références bibliographiques

- <sup>1</sup> Binnig G., Quate C. F., Gerber Ch. (1986). Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56 : 930-933.
- <sup>2</sup> Binnig G. (1992). Force microscopy. *Ultramicroscopy*, 42-44 : 7-15.
- <sup>3</sup> Binnig G., Rohrer H. (1987). Scanning tunneling microscopy – from birth to adolescence. *Rev. Mod. Phys.* 59 : 615-625.
- <sup>4</sup> Shah A. K., Lazatin J., Sinha R. K., Lennox T., Hickok N. J., Tuan R. S. (1999). Mechanism of BMP-2 stimulated adhesion of osteoblastic cells to titanium alloy. *Biol. Cell.*, 91: 131-142.
- <sup>5</sup> Gay C. V., Gilman V. R., Sugiyama T. (2000). Perspectives on osteoblast and osteoclast function. *Poultry Sci.*, 79: 1005-1008.
- <sup>6</sup> Vilamitjana-Amedee J., Bareille R., Rouais F., Caplan A. I., Harmand M. F. (1993). Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. *In vitro cell Dev. Biol.* 29A : 699-707.
- <sup>7</sup> Willemsen O. H., Snel M. M. E., van der Werf K. O., de Grooth B. G., Greeve J., Hinterdorfer P., Gruber H. J., Schindler H., van Kooyk Y., Figdor C. G. (1998). Simultaneous height and adhesion imaging of antibody-antigen interactions by AFM. *Biophys. J.*, 75: 2220-2228.
- <sup>8</sup> Baumgartner W., Hinterdorfer P., Ness W., Raab A., Vestweber D., Schindler H., Drenckhahn D. (2000). Cadherin interaction probed by AFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 4005-4010.

- <sup>9</sup> Hemmerle J., Altmann S. M., Maaloum M., Horber J. K. H., Heinrich L., Voegel J. C., Schaaf P. (1999). Direct observation of the anchoring process during the adsorption of fibrinogen on a solid-surface by force-spectroscopy mode AFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96: 6705-6710.
- <sup>10</sup> Matzke R., Jacobson K., Radmacher M. (2001). Direct, high-resolution measurement of furrow stiffening during division of adherent cells. *Nature Cell Biol.*, 3: 607-610.
- <sup>11</sup> Bongrand P. (1999). Ligand – receptor interactions. *Rep. Prog. Phys.*, 62 : 921-968.
- <sup>12</sup> Hinterdorfer P., Baumgartner W., Gruber H. J., Schilcher K., Schindler H. (1996). Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by AFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 3477-3481.
- <sup>13</sup> Chen A., Moy V. T. (2000). Cross-linking of cell surface receptors enhances cooperativity of molecular adhesion. *Biophys. J.*, 78: 2814-2820.
- <sup>14</sup> Williams D. F. (1987). Definitions in Biomaterials. Progress in Biomedical Engineering. *Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*. Chester, England, March 3-5, 1986. *Elsevier*, New York, Vol. 4.
- <sup>15</sup> Johnson H. J., Northup S. J., Seagraves P. A., Atallah M., Garvin P. J., Lin L., Darby T. D. (1985). Biocompatibility test procedures for materials evaluation *in vitro*. Objective methods of toxicity assessment. *J. Biomed. Mater. Res.*, 19: 489-508.
- <sup>16</sup> Laing P. G., Ferguso A. B., Hodge E. S. (1967). Tissue reactions in rabbit muscle exposed to metallic implants. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1: 135-149.
- <sup>17</sup> Levinson I. J. (1971). Statics and strength of materials. *Prentice-Hall*, Englewood Cliffs, NJ.
- <sup>18</sup> John V. B. (1983). Introduction to Engineering Materials. 2<sup>nd</sup> Ed. *MacMillan Co.* Simon & Schuster, New York.
- <sup>19</sup> Spector M., Cease C., Xia T. L. (1989). The local tissue response to biomaterials. *CRC Crit. Rev. Biocompat.*, 5: 269-295.
- <sup>20</sup> Silver I. A. (1984). The physiology of wound healing. *Wound Healing and Wound Infection*. T. K. Hunt, ed Appleton-century-Crofts, New York. p11.
- <sup>21</sup> Spector M., Shortkroff S., Hsu H. P., Taylor-Zapatka S., Lane N., Sledge C. B., Thornhill T. S. (1992). Synovium-like tissue from loose joint replacement prostheses : comparaison of human material with a canine model. *Semin. Arthr. Rheum.*, 21: 335-344.

- <sup>22</sup> Coleman D. L., King R. N., Andrade J. D. (1974). The foreign body reaction : a chronic inflammatory response. *J. Biomed. Mater. Res.*, 8: 199-211.
- <sup>23</sup> Anderson J. M., Miller K. M. (1984). Biomaterials biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials*, 5: 5-10.
- <sup>24</sup> Passuti N., Delecrin J., Gouin F., Heymann D. (1999). Substituts osseux. *Encycl. Méd. Chir.*, (Elsevier, Paris), Appareil locomoteur, 14-015-B-10, 1-6.
- <sup>25</sup> Gibbons D. F. (1984). Materials for orthopedic implants. *Biocompatibility of orthopedic implants*. Williams D. F. Ed CRC Press, Boca Raton, 1: 112-137.
- <sup>26</sup> Anderson J. M., Cima L. G., Eskin S. G. (1995). Tissue engineering in cardiovascular disease: a report. *J. Biomed. Mater. Res.*, 29: 1473-1475.
- <sup>27</sup> Prime K. L., Whitesides G. M. (1991). Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science*, 252: 1164-1167.
- <sup>28</sup> Ratner B. D. (1993). New ideas in biomaterials science: “a path to engineered biomaterials”. *J. Biomed. Mater. Res.*, 27: 837-850.
- <sup>29</sup> Stark G. R. (1971). Biochemical aspects of reactions on solid supports. *Academic Press*, New York.
- <sup>30</sup> Zaborsky O. (1973). Immobilized enzymes. *CRC Press*, Cleveland.
- <sup>31</sup> Dunlap B. R. (1974). Immobilized biochemicals and affinity chromatography. *Plenum*, New York.
- <sup>32</sup> Groves J. T., Mahal L. K., Bertozzi C. R. (2001). Control of cell adhesion and growth with micropatterned supported lipid membranes. *Langmuir*, 17: 5129-5136.
- <sup>33</sup> Pakalns T., Haverstick K. L., Fields G. B., McCarthy J. B., Mooradian D. L., Tirrell M. (1999). Cellular recognition of synthetic peptide amphiphiles in self-assembled monolayer films. *Biomaterials*, 20: 2265-2279.
- <sup>34</sup> Roberts C., Chen C. S., Mrksich M., Martichonok V., Ingber D. E., Whitesides G. M. (1998). Using mixed self-assembled monolayers presenting RGD and (EG)<sub>3</sub>OH groups to characterize long-term attachment of bovine capillary endothelial cells to surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 6548-6555.
- <sup>35</sup> Houseman B. T., Mrksich M. (2001). The microenvironment of immobilized Arg-Gly-Asp peptides is an important determinant of cell adhesion. *Biomaterials*, 22: 943-955.

- <sup>36</sup> Roessler S., Born R., Scharnweber D., Worch H., Sewing A., Dard M. (2001). Biomimetic coatings functionalized with adhesion peptides for dental implants. *Journal of materials science: materials in medicine*, 12: 871-877.
- <sup>37</sup> Massia S. P., Hubbell J. A. (1992). Immobilized amines and basic amino acids as mimetic heparin-binding domains for cell surface proteoglycan-mediated adhesion. *J. Biol. Chem.*, 267: 10133-10141.
- <sup>38</sup> Kapur R., Rudolph A. S. (1998). Cellular and cytoskeleton morphology and strength of adhesion of cells on self-assembled monolayers of organosilanes. *Experimental cell research*, 244: 275-285.
- <sup>39</sup> Xiao S. -J., Textor M., Spencer N. D., Sigrist H. (1998). Covalent attachment of cell-adhesive (arg-gly-asp) containing peptides to titanium surfaces. *Langmuir*, 14: 5507-5516.
- <sup>40</sup> Xiao S. -J., Textor M., Spencer N. D., Wieland M., Keller B., Sigrist H. (1997). Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *Journal of Materials Science: materials in medicine*, 8: 867-872.
- <sup>41</sup> Pierschbacher M. D., Ruoslahti E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 309: 30-33.
- <sup>42</sup> Pierschbacher M. D., Ruoslahti E. (1984). ???. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 5985-5988.
- <sup>43</sup> Yamada K. M., Kennedy D. W. (1984). ???. *J. Cell. Biol.*, 99: 29-36.
- <sup>44</sup> Ruoslahti E., Pierschbacher M. D. (1987). New perspectives in cell adhesion : RGD and intégrines. *Science*, 238: 491-497.
- <sup>45</sup> Klotz S. A. (1992). Fungal adherence to the vascular compartment : a critical step in the pathogenesis of disseminated candidiasis. *Clin. Infect. Diseases*, 14: 340-347.
- <sup>46</sup> Pauli B. U., Augustin-Voss H. G., El Sabban M. E., Johson R. C., Hammer D. A. (1990). Organ preference of metastasis. The role of endothelial adhesion molecules. *Cancer and metastasis Rev.*, 9: 175-189.
- <sup>47</sup> Ross R. (1996). The pathogenesis of atherosclerosis – an update. *New England J. Med.*, 314: 488-500.
- <sup>48</sup> Goto S., Ikeda Y., Saldivar E., Ruggeri Z. M. (1998). Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J. Clin. Invest.*, 101: 479-486.

- <sup>49</sup> Holland N. B., Qiu Y., Ruegsegger M., Marchant R. E. (1998). Biomimetic engineering of non-adhesive glycocalyx-like surfaces using oligosaccharide surfactant polymers. *Nature*, 392: 799-801.
- <sup>50</sup> Bell G. I. (1978). Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200: 618-627.
- <sup>51</sup> Chen C. S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G. M., Ingber D. E. (1997). Geometric control of cell life and death. *Science*, 276: 1425-1428.
- <sup>52</sup> Folkman J., Moscona A. (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature*, 273: 345-349.
- <sup>53</sup> Cunningham B. A. (1995). Cell adhesion molecules as morphoregulators. *Current Opinion Cell Biol.*, 7: 628-633.
- <sup>54</sup> Bongrand P. (1998). Specific and non specific interactions in cell biology. *J. Dispersion Sci. Technol.*, 19: 963-978.
- <sup>55</sup> Bell G. I., Dembo M., Bongrand P. (1984). Cell adhesion: competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys. J.*, 45: 1051-1064.
- <sup>56</sup> Pasternak C., Elson E. L. (1985). Lymphocyte mechanical response triggered by cross-linking surface receptors. *J. Cell Biol.*, 100: 860-872.
- <sup>57</sup> Pierres A., Benoliel A. M., Bongrand P. (2000). Cell spreading on a surface. *Euradh'2000-5<sup>th</sup> Eur. Adhesion Conf.* 341-347.
- <sup>58</sup> Culp L. A. (1978). Biochemical determinants of cell adhesion. *Current Topics in Membranes and Transport, II: 327-396. Academic Press, New York.*
- <sup>59</sup> Romberger D. J. (1997). Fibronectin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 29: 939-943.
- <sup>60</sup> Hyonchol K., Arakawa H., Osada T., Ikai A. (2002). Quantification of fibronectin and cell surface interactions by AFM. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 25: 33-43.
- <sup>61</sup> Chothia C., Jones E. Y. (1997). The molecular structure of cell adhesion molecules. *Ann. Rev. Biochem.*, 66: 823-862.
- <sup>62</sup> Buck C. A., Horwitz A. F. (1987). Integrin, a transmembrane glycoprotein complex mediating cell-substratum adhesion. *J. Cell Sci. Suppl.*, 8: 231-250.
- <sup>63</sup> Hynes R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69: 11-25.
- <sup>64</sup> Horton M. A. (1997). The  $\alpha_v\beta_3$  integrin "vitronectin receptor". *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29: 721-725.

- <sup>65</sup> Humphries M. J., Newham P. (1998). The structure of cell-adhesion molecules. *Trends in cell biology*, 8: 78-83.
- <sup>66</sup> Pierres A., Benoliel A. M., Bongrand P. (2000). Cell-cell interactions. In Physical chemistry of biological interfaces. Eds Baszkin A. and Norde W. Dekker M. New York.
- <sup>67</sup> Hughes P. E., Pfaff M. (1998). Integrin affinity modulation. *Trends in cell biology*, 8: 359-364.
- <sup>68</sup> Miyamoto S., Katz B. -Z., Lafrenie R. M., Yamada K. M. (1998). Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling and morphogenesis. *Annals New York Academy of sciences*, 857:119-129.
- <sup>69</sup> Thoumine O. (1996). Control of cellular morphology by mechanical factors. *J. Phys. III*, 6: 1555-1566.
- <sup>70</sup> Ruoslahti E. (1997). Stretching is good for a cell. *Science*, 276: 1345-1346.
- <sup>71</sup> Gille J., Swerlick R. A. (1996). Integrins : role in cell adhesion and communication. *Annals NY Academy of Sciences*, 797: 93-106.
- <sup>72</sup> Benoliel A. M., Capo C., Mège J. L., Bongrand P. (1994). Measurement of the strength of cell-cell and cell-substratum adhesion with simple methods. In Bongrand P., Curtis A. Studying cell adhesion. Heidelberg, Springer, 81-92.
- <sup>73</sup> Usson Y., Guignandon A., Laroche N., Lafage-Proust M. H., Vico L. (1997). Quantification of cell-matrix adhesion using confocal image analysis of focal contact associated proteins and interference reflection microscopy. *Cytometry*, 28: 298-304.
- <sup>74</sup> Majeska R. J., Port M., Einhorn T. A. (1993). Attachment to extracellular matrix molecules by cells differing in the expression of osteoblastic traits. *J. Bone Miner. Res.*, 8: 277-289.
- <sup>75</sup> Landegren U. (1984). Measurement of cell numbers by means of the endogeneous enzyme exosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *Journal of immunological methods*, 67: 379-388.
- <sup>76</sup> Fredriksson C., Kihlman S., Rodhal M., Kasemo B. (1998). The piezoelectric quartz crystal mass and dissipation sensor : a means of studying cell adhesion. *Langmuir*, 14: 248-251.
- <sup>77</sup> Kaplanski G., Farnarier C., Tissot O., Pierres A., Benoliel A. M., Alessi M. C., Kaplanski S., Bongrand P. (1993). Granulocyte-endothelium initial adhesion. Analysis of transient binding events mediated by E-selectin in a laminar shear flow. *Biophys. J.*, 64: 1922-1933.
- <sup>78</sup> Tha S. P., Shuster J., Goldsmit H. L. (1986). Interaction forces between red cells agglutinated by antibody. II-measurement of hydrodynamic forces of breakup. *Biophys. J.*, 50: 1117-1126.

- <sup>79</sup> Drury J. L., Dembo M. (2001). Aspiration of human neutrophils: effects of shear thinning and cortical dissipation. *Biophysical Journal*, 81: 3166-3177.
- <sup>80</sup> Fischer T. M., Haest C. W., Stohr-Liesen M., Schmid-Schonbein H., Skalak R. (1981). The stress-free shape of the red blood cell membrane. *Biophysical Journal*, 34: 409-422.
- <sup>81</sup> Yeung A., Evans E. (1989). Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets. *Biophysical Journal*, 56: 139-149.
- <sup>82</sup> Evans E., Berk D., Leun A. (1991). Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. I- Forces to rupture molecular point attachments. *Biophys. J.*, 59: 838-848.
- <sup>83</sup> Merkel R., Nassoy P., Leung A., Ritchie K., Evans E. (1999). Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 397: 50-53.
- <sup>84</sup> Heinrich V., Ritchie K., Mohandas N., Evans E. (2001). Elastic thickness compressibility of the red cell membrane. *Biophys. J.*, 81: 1452-1463.
- <sup>85</sup> Hoh J. H., Hansma P. K. (1992). Atomic force microscopy for high-resolution imaging in cell biology. *Trends Cell Biol.* 2: 208-213.
- <sup>86</sup> Henderson E. (1994). Imaging of living cells by atomic force microscopy. *Prog. Surf. Sci.* 46: 39-60.
- <sup>87</sup> Lal R., John S. A. (1994). Biological applications of atomic force microscopy. *Am. J. Physiol.* 266 : C1-C21.
- <sup>88</sup> Sagvolden G., Giaever I., Pettersen E. O., Feder J. (1999). Cell adhesion force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96: 471-476.
- <sup>89</sup> A-Hassan E., Heinz W. F., Antonik M. D., D'Costa N. P., Nageswaran S., Schoenenberger C. A., Hoh J. H. (1998). Relative microelastic mapping of living cells by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.*, 74: 1564-1578.
- <sup>90</sup> Hyoncol K., Arakawa H., Osada T., Ikai A. (2002). Quantification of fibronectin and cell surface interactions by AFM. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 25: 33-43.
- <sup>91</sup> Kawabata K., Nagayama M., Haga H., Sambongi T. (2001). Mechanical effects on collective phenomena of biological systems: cell locomotion. *Current Applied Physics*, 1: 66-71.
- <sup>92</sup> Le Grimellec C., Lesniewska E., Giocondi M. C., Finot E., Vié V., Goudonnet J. P. (1998). Imaging of the surface of living cells by low-force contact-mode Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.*, 75: 695-703.

- <sup>93</sup> Putman C. A. J., Van der Werf K. O., de Grooth B. G., Van Hulst N. F., Greve J. (1994). Viscoelasticity of living cells allows high resolution imaging by tapping mode Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.*, 67: 1749-1753.
- <sup>94</sup> Domke J., Dannöhl S., Parak W. J., Müller O., Aicher W. K., Radmacher M. (2000). Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 19: 367-379.
- <sup>95</sup> Hertz H. (1882). *Reine Angew. J. Math.* 92, 156
- <sup>96</sup> Rotsch C., Radmacher M. (2000). Drug-Induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an Atomic Force Microscopy study. *Biophys. J.*, 78: 520-535.
- <sup>97</sup> Haga H., Sasaki S., Kawabata K., Ito E., Ushiki T., Sambongi T. (2000). Elasticity mapping of living fibroblasts by AFM and immunofluorescence observation of the cytoskeleton. *Ultramicroscopy*, 82: 253-258.
- <sup>98</sup> Israelachvili J. N. (1992). Intermolecular and surface forces. Academic Press, New York, 2<sup>nd</sup> edition.
- <sup>99</sup> Johnson K., Kendall K., Roberts A.D. (1971). *Proc. Roy. Soc. Lond. A*, 324:301-313.
- <sup>100</sup> Fermigier M. (2000) Hydrodynamique physique, Dunod.
- <sup>101</sup> Van Wachem P. B., Mallens B. W. L., Dekker A., Beugeling T., Feijen J., Bantjes A., Detmers J. P., Van Aken W. G. (1987). Adsorption of fibronectin derived from serum and from human endothelial cells onto tissue culture polystyrene. *J. Biomed. Mater. Res.*, 21: 1317-1327.
- <sup>102</sup> Schaus S. S., Henderson E. R. (1997). Cell viability and probe-cell membrane interactions of XR1 glial cells imaged by atomic force microscopy. *Biophys. J.*, 73: 1205-1214.
- <sup>103</sup> Schoenenberger C.-A., Hoh J. H. (1994). Slow cellular dynamics in MDCK and R5 cells monitored by time-lapse atomic force microscopy. *Biophys. J.*, 67: 929-936.
- <sup>104</sup> Butt H. J., Wolf E. K., Gould S. A. C., Hansma P. K. (1991). Imaging cells with the atomic force microscope. *J. Struct. Biol.*, 105: 54-61.
- <sup>105</sup> Henderson E., Haydon P. G., Sakaguchi D. S. (1992). Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science*, 257: 1944-1946.
- <sup>106</sup> Hoh J. H., Schoenenberger C.-A. (1994). Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy. *J. Cell. Sci.*, 107: 1105-1114.

- <sup>107</sup> Haydon P. G., Lartius R., Parpura V., Marchese-Ragona S. P. (1996). Membrane deformation of living glial cells using atomic force microscopy. *J. Microsc.*, 182: 114-120.
- <sup>108</sup> Andrade J. D., Hlady V. (1986). Protein adsorption and materials biocompatibility: a tutorial review and suggested hypotheses. *Advances in polymer Science* 79: 1-63.
- <sup>109</sup> Van Wachem P. B., Hogt A. H., Beugeling T., Feijen J., Bantjes A., Detmers J. P., Van Aken W. G. (1987). Adhesion of cultures human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge. *Biomaterials*, 8: 323-329.
- <sup>110</sup> Schakenraad J. M., Arends J., Busscher H. J., Dijk F., Van Wachem P. B., Wildevuur C. R. H. (1989). Kinetics of cell spreading on protein precoated substrata: a study of interfacial aspects. *Biomaterials*, 10: 43-50.
- <sup>111</sup> Horbertt T. A. (1993). Principles underlying the role of adsorbed plasma proteins in blood intercatations with foreigners materials. *Cardiovascular Pathology*, 2: 137S-148S.
- <sup>112</sup> Verrier S., Pallu S., Bareille R., Jonczyk A., Meyer J., Dard M., Amédée J. (2002). Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process. *Biomaterials*, 23: 585-596.
- <sup>113</sup> Nanci A., Wuest J. D., Peru L., Brunet P., Sharma V., Zalzal S., McKee M. D. (1998). Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J. Biomed. Mater. Res.*, 40: 324-335.
- <sup>114</sup> Porté-Durrieu M. C., Labrugère C., Villars F., Lefevre F., Dutoya S., Guette A., Bordenave L., Baquey C. (1999). Development of RGD peptides grafted onto silica surfaces XPS characterization and human endothelial cell interactions. *J. Biomed. Mater. Res.*, 46: 368-375.
- <sup>115</sup> Maheshwari G., Brown G. L., Lauffenburger D. A., Wells A., Griffith L. G. (2000). Cell adhesion and mobility depend on nanoscale RGD clustering. *J. Cell Sci.*, 113: 1677-1686.
- <sup>116</sup> Carr P. W., Bowers L. D. (1980). Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry: fundamentals and applications. *Wiley*, p172-173.
- <sup>117</sup> Hoffman A. S. (1987). Modification of material surfaces to affect how they intercat with blood. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 516: 96-101.
- <sup>118</sup> Shriver-Lake L. C., Donner B., Edelstein R., Breslin K., Bhatia S. K., Ligler F. S. (1997). Antibody immobilization using heterobifunctional crosslinkers. *Biosensors and bioelectronics*, 12: 1101-1106.
- <sup>119</sup> Plueddemann E. P. (1982). Silane Coupling Agents. Plenum Press: New York.

- <sup>120</sup> Boehme P., Vedantham G., Przybycien T., Belfort G. (1999). Self-Assembled Monolayers on Polymer Surfaces: Kinetics, Functionalization, and Photopatterning. *Langmuir*, 15: 5323-5328.
- <sup>121</sup> Kahn F. J. (1973). Orientation of liquid crystals by surface coupling agents. *Appl. Phys. Lett.*, 22: 386-388.
- <sup>122</sup> Gauthier S., Aime J. P., Bouhacina T., Attias A. J., Desbat B. (1996). Study of Grafted Silane Molecules on Silica Surface with an Atomic Force Microscope. *Langmuir*, 12: 5126-5137.
- <sup>123</sup> Azzopardi M. J. (1994). PhD thesis, Universite Paris VI.
- <sup>124</sup> Brandow S. L., Chen M. S., Aggarwal R., Dulcey C. S., Calvert J. M., Dressick W. J. (1999) Fabrication of Patterned Amine Reactivity Templates Using 4-Chloromethylphenylsiloxane Self-Assembled Monolayer Films. *Langmuir*, 15: 5429-5432.
- <sup>125</sup> McGovern M. E., Kallury K. M. R., Thompson M. (1994). Role of Solvent on the Silanization of Glass with Octadecyltrichlorosilane. *Langmuir*, 10: 3607-3614.
- <sup>126</sup> Rondelez F., Azouz I. B., Allara D. L., Parikh A. N. (1994). *J. Phys. Chem.*, 98: 7577-7590.
- <sup>127</sup> Waddell T. G., Leyden D. E., DeBello M. T. (1981). The nature of organosilane to silica-surface bonding. *J. Am. Chem. Soc.*, 103: 5303-5307.
- <sup>128</sup> Silberzan P., Leger L., Ausserre D., Benattar J. (1991). Silanation of silica surfaces. A new method of constructing pure or mixed monolayers. *Langmuir*, 7: 1647-1751.
- <sup>129</sup> Simon A., Cohen-Bouhacina T., Porté M. C., Aimé J. P., Baquey C. (2002). Study of two grafting methods for obtaining a 3-aminopropyltriethoxysilane monolayer on silica surface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 251: 278-283.
- <sup>130</sup> Tripp C. P., Hair M. L. (1992). An infrared study of the reaction of octadecyltrichlorosilane with silica. *Langmuir*, 8: 1120-1126.
- <sup>131</sup> Finklea H. O., Robinson L. R., Blackburn A., Richter B., Allara D., Bright T. (1986). Formation of an organized monolayer by solution adsorption of octadecyltrichlorosilane on gold: electrochemical properties and structural characterization. *Langmuir*, 2: 239-244.
- <sup>132</sup> Bunker B.C., Haaland D. M., Michalske T. E., Smith W. L. (1989). *Surf. Sci.*, 222: 95-118.
- <sup>133</sup> Morrow B. A. (1990) *Studies in Surface Science and Catalysis*, 161-224.

- <sup>134</sup> Bouhacina T., Desbat B., Aimé J. P. (2000). FTIR spectroscopy and nanotribological comparative studies: influence of the adsorbed water layers on the tribological behaviour. *Tribol. Lett.*, 9: 111-117.
- <sup>135</sup> Scott R. P. W., Traiman S. (1980). Solute-solvent interactions on the surface of silica gel ; III. Multilayer adsorption of water on the surface of silica gel. *J. Chromatography*, 196: 193-205.
- <sup>136</sup> Guillemot F., M.C. Porté M. C., Labrugère C., Baquey Ch. (2002). Ti<sup>4+</sup> to Ti<sup>3+</sup> conversion of TiO<sub>2</sub> uppermost layer by low temperature vacuum annealing: interest for titanium biomedical applications. Soumis à Journal of Colloid and Interface Science.
- <sup>137</sup> Kallury K. M. R., MacDonald P. M., Thompson M. (1994). Effect of Surface Water and Base Catalysis on the Silanization of Silica by (Aminopropyl)alkoxysilanes Studied by X-ray Photoelectron Spectroscopy and <sup>13</sup>C Cross-Polarization/Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance. *Langmuir*, 10: 492-499.
- <sup>138</sup> Unger K. K. (1979). Porous silica. *Elsevier*, Amsterdam.
- <sup>139</sup> Chaimberg M., Cohen Y. (1990). Note on the silylation of inorganic oxide supports. *J. Colloid. Interface Science*, 134: 576-579.
- <sup>140</sup> Trens P., Denoyel R., Rouquerol J. (1995). Adsorption of (γ-aminopropyl)triethoxysilane on silica from aqueous solution : a microcalorimetric study. *Langmuir*, 11: 551-554.
- <sup>141</sup> Nony L. (2001). Thèse d'université. Université de Bordeaux I.
- <sup>142</sup> Ratner B. D., Castner D. G., Horbett T. A., Lenk T. J., Lewis K. B., Rapoza R. J. (1990). Biomolecules and surfaces. *J. Vac. Sci. Technol. A*, 8: 2306-2316.
- <sup>143</sup> Healy K. E., Thomas C. H., Rezania A., Kim J. E., McKeown P. J., Lom B., Hockberger P. E. (1996). Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry. *Biomaterials*, 17: 195-208.
- <sup>144</sup> Vandenberg E. T., Bertilsson L., Liedberg B., Uvdal K., Erlandsson R., Elwing H., Lundström I. (1991). Structure of 3-aminopropyl triethoxy silane on silicon oxide. *Journal of Colloid and Interface science*, 147: 103-118.
- <sup>145</sup> Massia S. P., Hubbell J. A. (1991). An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin α<sub>v</sub>β<sub>3</sub> – mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *The Journal of Cell Biology*, 114: 1089-1100.
- <sup>146</sup> Schaffner P., Meyer J., Dard M., Wenz R., Nies B., Verrier S., Kessler H., Kantlehner M. (1999). Induced tissue integration of bone implants by coating with bone selective RGD-

peptides *in vitro* and *in vivo* studies. *Journal of materials science: Materials in medicine*, 10: 837-839.

<sup>147</sup> Kantlehner M., Schaffner P., Finsinger D., Meyer J., Jonczyk A., Diefenbach B., Nies B., Holzemann G., Goodman S. L., Kessler H. (2000). Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *ChemBiochem.*, 1: 107-114.

<sup>148</sup> M.C. Porté-Durrieu, F. Guillemot, S. Pallu, C. Labrugère, B. Brouillaud, J. Amédée, N. Barthe, M.Dard, Ch. Baquey. (2002). Cyclo - (DfKRG) Peptide Grafting Onto Ti – 6Al – 4V: Physical Characterization And Interest Towards Human Osteoprogenitor Cells Adhesion. Soumis à *J. Biomed. Mater. Res.*

<sup>149</sup> Kyte, Doolittle. *J. Mol. Biol.*, 157: 105-132.

<sup>150</sup> Van Wachem P. B., Schakenraad J. M., Feijen J., Beugeling T., Van Aken W. G., Blaauw E. H., Nieuwenhuis P., Molenaar I. (1989). Adhesion and spreading of cultured endothelial cells on modified and unmodified poly(ethylene terephthalate): a morphological study. *Biomaterials*, 10: 532-539.

<sup>151</sup> Dee K. C., Andersen T. T., Bizios R. (1999). Osteoblast population migration characteristics on substrates modified with immobilized adhesive peptides. *Biomaterials*, 20: 221-227.

<sup>152</sup> Curtis A. S. G., Wilkinson C. D. W. (1998). Reactions of cells to topography. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 9: 1313-1329.

<sup>153</sup> Abercrombie M., Harris E. J. (1958). Interference microscopy studies of cell contacts in tissue culture. *Exp. Cell Res.*, 15: 332-345.

<sup>154</sup> Abercrombie M., Heaysman J. E. M., Pegrum S. M. (1971). The locomotion of fibroblasts in culture. *Experimental Cell Research*, 67: 359-367.

<sup>155</sup> Huttenlocher A., Sandborg R. R., Horwitz A. F. (1995). Adhesion in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 7: 697-706.

<sup>156</sup> Gumbiner B. M., Yamada K. M. (1995). Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology*, 7: 615-618.

<sup>157</sup> Radmacher M. (1997). Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM. *IEEE Medicine and Engineering Biology*, 16: 47-57.

<sup>158</sup> Vinckier A., Semenza G. (1998). Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *FEBS Lett.*, 430: 12-16.

- <sup>159</sup> Mou J., Yang J., Shao Z. (1995). Atomic force microscopy of cholera toxin B-oligomers bound to bilayers of biologically relevant lipids. *J. Mol. Biol.*, 248: 507-512.
- <sup>160</sup> Bouhacina T., Aimé J. P. (1999). Grafting processes studied with a nanotip : silane molecules and polymers grafted on silica and silanized silica surface. *Fundamental and applied aspects of chemically modified surfaces*. Royal Society of Chemistry, J. P. Blitz and C. B. Little.
- <sup>161</sup> Rotsch C., Jacobson K., Radmacher M. (1999). Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96: 921-926.
- <sup>162</sup> Radmacher M., Fritz M., Kacher M., Cleveland J. P., Hansma P. K. (1996). Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscopy. *Biophys. J.*, 70: 55-567.
- <sup>163</sup> Mathur A. B., Truskey G. A., Reichert W. M. (2000). Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells. *Biophys. J.*, 78: 1725-1735.
- <sup>164</sup> Braet F., Rotsch C., Wisse E., Radmacher M. (1998). Comparaison of fixed and living liver endothelial cells by atomic force microscopy. *Appl. Phys. A*, 66: S575-578.
- <sup>165</sup> Rees D. A., Lloyd C. W., Thom D. (1977). Control of grip and stick in cell adhesion through lateral relationships of membrane glycoproteins. *Nature*, 267: 124-128.
- <sup>166</sup> Bogdanowich-Knipp S. J., Jois D. S. S., Siahaan T. J. (1999). The effect of conformation on the solution stability of linear vs. cyclic RGD peptides. *J. Peptide Res.* 53: 523-529.
- <sup>167</sup> Bogdanowich-Knipp S. J., Chakrabarti S., Williams T. D., Dillman R. K., Siahaan T. J. (1999). Solution stability of linear vs. cyclic RGD peptides. *J. Peptide Res.*, 53: 530-541.
- <sup>168</sup> Wang Y., Goh S.-Y., Kuczera K. (1999). Molecular dynamics study of disulfide bond influence on properties of an RGD peptide. *J. Peptide Res.*, 53: 188-200.
- <sup>169</sup> Zhang R. G., Westbrook M. L., Westbrook E. M., Scott D. L., Otwinowski Z., Maulik P. R., Reed R. A., Shipley G. G. (1995). The 2.4 Å crystal structure of cholera toxin B subunit pentamer : cholera toxin B subunit pentamer : cholera toxin B subunit pentamer. *J. Mol. Biol.* 251 : 550-562.
- <sup>170</sup> Parrel J. (1998). Rapport du DEA d'instrumentation et mesures. Université de Bordeaux I.
- <sup>171</sup> Baquey C. (2002). Communication à l'Ecole de Science des Surfaces de Porquerolles, à Hyères (France). Ecole d'été du CNRS.
- <sup>172</sup> Elkaakour Z. (1996). Thèse d'université. Université de Bordeaux I.

- <sup>173</sup> Gauthier S. (1996). Thèse d'université. Université de Bordeaux I.
- <sup>174</sup> Michel D. (1997). Thèse d'université. Université de Bordeaux I.
- <sup>175</sup> Nony L. (2001). Thèse d'université. Université de Bordeaux I.
- <sup>176</sup> Prater C. B. (1994). Vibrating probe (AC) methods in atomic force microscopy. Atomic Force/Scanning Tunneling Microscopy. Cohen S. H. Plenum Press, New York.
- <sup>177</sup> Hansma P. K., Cleveland J. P., Radmacher M., Walters D. A., Hillner P. E., Bezanilla M., Fritz M., Vie D., Hansma H. G., Prater C. B., Massie J., Fukunaga L., Gurley J., Elings V. (1994). Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Appl. Phys. Lett.* 64: 1738-1740.
- <sup>178</sup> Siegbahn K., Hammond D., Fellner-Feldegg H., Barnett E. F. (1972). Electron spectroscopy with monochromatized x-rays. *Science*, 176 (32) : 245-252 .
- <sup>179</sup> Buffeteau T., Desbat B., Turlet J. M. (1991). Polarization modulation FTIR spectroscopy of surfaces and ultra-thin films : experimental procedure and quantitative analysis. *Applied Spectroscopy*, 45 : 380-389.
- <sup>180</sup> Blaudez D., Buffeteau T., Cornut J. C., Desbat B., Escafre N., Pezolet M., Turlet J. M. (1993). Polarization modulation FT-IR spectroscopy of a spread monolayer at the air/water interface. *Applied Spectroscopy*, 47 : 869-874.
- <sup>181</sup> Ferraro J. R., Basile L. J. (1982). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Nafie L. A., Vidrine Eds D. W. 3 : 83. Academic Press, New York.
- <sup>182</sup> Verrier S. (1999). Thèse d'université. Université Bordeaux 2.
- <sup>183</sup> Villars F. (2001). Thèse d'université. Université Bordeaux 2.

## Résumé

Cette étude se situe dans le contexte de la conception de biomatériaux biofonctionnalisés. Elle s'inscrit dans la stratégie d'amélioration de la bio-intégration de prothèses osseuses par le contrôle de l'interface implant/os. La bioadhésion est basée sur un processus de reconnaissance moléculaire entre une protéine (l'intégrine) portée par les cellules et une séquence Arg-Gly-Asp (RGD) portée par des protéines qui constituent la matrice. La séquence RGD greffée sur une surface de silice, choisie comme surface modèle, pourrait mimer une surface biologique et jouer un rôle de ligands pour les intégrines présentes à la surface de la membrane cellulaire. Ce greffage favoriserait ainsi une forte interaction entre les cellules et la surface traitée. Nous proposons ici de développer de telles surfaces par le greffage d'une monocouche de peptides d'adhésion de type RGD. Le greffage du peptide est ainsi bien établi et caractérisé par mouillabilité, XPS, PM-IRRAS, et MFA. La seconde stratégie consiste à adsorber des protéines adhésives sur des surfaces de silice silanisée. La MFA montre ensuite sa potentialité dans l'étude de cellules vivantes, dans leur milieu de culture. A partir de la forme, de l'étalement et de la présence d'un cytosquelette plus ou moins développé, différents états d'adhésion de ces cellules sont établis suivant la surface de dépôt. La perte d'adhérence est testée pour chaque condition envisagée, en appliquant une force extérieure avec la sonde du MFA. L'évolution du comportement dynamique des cellules est ensuite suivie. Nous présentons enfin une nouvelle approche pour corrélérer les propriétés mécaniques des cellules osseuses à leur état d'adhésion, à partir de l'analyse d'images obtenues par MFA. Les variations d'indentation en fonction de la structure locale de la cellule à force constante montrent des différences significatives suivant l'état d'adhésion des cellules.

## Mots clefs

Adhésion cellulaire. Biofonctionnalisation de matériaux. Silanisation. Greffage de peptides. Adsorption de protéines. Microscopie de Force Atomique en milieu liquide. Propriétés mécaniques d'ostéoblastes. Cytosquelette. Indentation.

## Abstract

Cellular adhesion results from a complex mechanism which is highly and quickly regulated by the cell itself in response to its environment. In this work, two methods were used to graft the peptide Arg-Gly-Asp (RGD) onto an APTES grafted silica surface or to adsorb serum adhesive proteins onto an APTES grafted silica surface. It could serve as a ligand for cell adhesion and could mimic biological surfaces for fabricating biocompatible materials. The grafting were characterized by different techniques (wettability, XPS, AFM, PM-IRRAS). This study evaluates osteoblast adhesion by Atomic Force Microscopy (AFM). Human Bone Marrow Stromal Cells were cultured on these types of surface inducing a weak and a strong cellular adhesion. AFM can be used to visualize the cell morphology in an aqueous environment and in real time. It also offers the possibility of investigating mechanical properties such as cell compliance as a function of cell attachment. Cells were considered adherent if they had a flattened and lengthened shape and a cytoskeletal organization in the submembrane cytosolic region. Cell detachment by AFM allowed different adhesion states between adherent cells to be distinguished. The stability of the cytoskeletal fibers indicated that cells were adherent. A relationship may be deduced between on the one hand, the elasticity of living cells as evidenced by cytoskeletal organization and on the other hand, the state of cell adhesion. The elastic modulus was estimated by two complementary approaches. The technique could be used to determine the adhesion state of an adherent osteoblast observed under AFM.

## Key words

Cellular adhesion. Grafting methods of silanes and peptides. Proteins adsorption. Atomic Force Microscopy in liquid cell. Mechanical osteoblast properties. Cytoskeletal. Indentation.