



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE EN COTUTELLE

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

L'Université de Lorraine

École doctorale Chimie Mécanique Matériaux Physique C2MP

et

L'Université Libanaise

École Doctorale des Sciences et Technologie EDST

Spécialité : Science des Matériaux : Science et ingénierie des Matériaux et Métallurgie

**Assemblages et études de la différenciation cellulaire des cellules souches sur
des surfaces de géométrie et chimie contrôlées**

Présentée et soutenue publiquement par

HAMIEH Batoul

06 décembre 2018

Membre du Jury

Mr. Ali TRABOLSI , Professeur (New York University of Abu Dhabi)	Rapporteur
Mme Halima KERDJOU DJ , MCF-HDR (Université de Reims)	Rapporteur
Mr. Assem EL KAK , Doyen de la faculté de pharmacie (Université Libanaise)	Examineur
Mr. Maher KODEIH , Professeur (Université Islamique)	Examineur
Mr. Tayssir HAMIEH , Professeur (Université Libanaise)	Directeur
Mr. François MONTAIGNE , Professeur (Université de Lorraine)	Directeur
Mme. Halima ALEM-MARCHAND , MCF-HDR (Université de Lorraine)	Co-directeur

Dédicace

A mes très chers parents
A mon cher mari
A mes princesses Mira et Sara

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous ce que vous avez fait pour moi. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi.

Je vous dédie ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.

Remerciements

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mes directeurs de thèse, Pr. Tayssir HAMIEH, Pr. François MONTAIGNE, et ma co-directrice Dr. Halima ALEM-MARCHAND. Votre compétence, votre rigueur scientifique et votre clairvoyance m'ont beaucoup appris.

J'exprime tous mes remerciements à Pr. Ali TRABOLSI et Dr. Halima KERDJOUDJ pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit et de participer au jury de ma soutenance.

Je remercie également Pr. Assem EL KAK, le doyen de la faculté de pharmacie de l'Université Libanaise et Pr. Maher KODEIH pour avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Je tiens également à remercier Pr. Joumana Toufaily d'avoir suivi ce travail durant toutes ces années.

Je voudrais dire un grand merci à tous les membres des équipes IJL et MCEMA pour leur accueil et leur sympathie et à toutes les personnes qui m'ont côtoyée et supportée pendant cette thèse. Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec chacun m'ont beaucoup apporté.

J'adresse mon affection à mes chers ami(e)s : Drs Nadine, Zahraa, Enaam, Hawraa, Malak, elles ont cru en moi et m'ont toujours encouragé au cours de ces quatre années. Puisque, ce n'est pas tant l'aide de nos amis qui nous aide que notre confiance dans cette aide. Je garde d'excellents souvenirs de nos sorties et des jours passées avec vous surtout à Nancy. Et merci à mes co-bureaux surtout Zied et Cristina pour leur gentillesse et leur humour. Grand merci pour ma seconde famille, la famille charmante de mon mari et surtout Abbass, le plus beau cœur.

Les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute ma gratitude à ma famille qui m'a appris que les problèmes pourraient se résoudre si on a la foi et si on est entouré des gens qui croient en nous et nous aime. Je remercie la patience de mon père et ma mère, je

vous dédie ce succès. Je remercie mes frères : Aly, mouhamad et houssein, merci pour votre soutien et amour inconditionnel.

*Enfin, je tiens à remercier la seule personne sans qui rien n'aurait été possible : tu m'as toujours soutenue depuis que je te connais, dans les bons comme les mauvais moments, même quand je suis partie en France et même au-delà. Sans toi pour garder les enfants, même dans mon séjour en France, et pour me reconforter dans les moments difficiles, cette thèse n'aurait jamais été terminée et pour ça, je te remercie de tout cœur...**Hammoud...***

Merci aussi et aussi et aussi... Sans tes sacrifices, je n'ai pu voir arriver dans la même période de la thèse nos deux plus beaux cadeaux du monde MIRA et SARA...

Table des matières

Dédicace	I
Liste des figures	XI
Liste des tableaux	XV
Liste des abréviations	XVI
 Introduction générale.....	 1
 Chapitre 1 : Bibliographie	 8
Enjeux de la médecine régénérative	10
I- Ingénierie tissulaire	10
I.1- Concept de l'ingénierie tissulaire.....	11
I.2- Nouvelle visibilité des applications de l'ingénierie tissulaire	14
II- Membrane extracellulaire	16
II.1- Description de la membrane extracellulaire	16
II.1.1- Les protéines fibreuses	19
II.1.2- Les polysaccharides matriciels : glycosaminoglycanes et protéoglycanes.....	21
II.1.3- Les glycoprotéines de structure.....	23
II.1.4- Les protéines associées à la matrice	25
II.2- Interactions entre la membrane extracellulaire et les cellules	26
II.3- Intérêt des cellules souches mésenchymateuses en médecine régénérative.....	29
II.3.1- Historique des CSM	30
II.3.2- Définition et localisation des CSM :	30
II.3.3- Spécificités et intérêt des CSMs en médecine régénérative	34
II.3.3.1- La multipotence/différenciation.....	36
II.3.3.2- La migration	38

II.3.3.3- L'immunomodulation	38
II.3.3.4- L'activité paracrine	42
III- Développement des biomatériaux	45
III.1- Propriétés des biomatériaux	47
III.2- Biomatériaux artificielles	52
III.3- Biomatériaux naturelles (biologiques)	54
IV- Modifications de surface.....	57
IV.1- Modifications chimiques	59
IV.1.1- Surfaces à chimie contrôlées	59
IV.1.1.1- Modification par assemblage multicouches de polyelectrolytes.....	60
IV.1.1.2- Silanisation en phase gazeuse	62
IV.1.2- Impact des modifications chimiques.....	64
IV.2- Modifications géométriques	70
IV.2.1- Surfaces à géométrie contrôlées : lithographie électronique.....	71
IV.2.2- Impact des modifications géométriques.....	74
IV.3- Modifications biologiques	79
IV.3.1- Mécanismes cellulaires essentiels de contrôle de la réponse cellulaire	80
IV.3.2- Protéines de la matrice extracellulaire	84
IV.3.3- Impact des modifications biologiques.....	88
V- Adhésion bactérienne et propriétés de surface	92
V.1- Généralités concernant les bactéries : l'espèce E.coli	92
V.2- Etapes d'adhésion bactérienne	93
V.3- Formation du biofilm.....	95
V.4- impact des propriétés de surface sur l'adhésion bactérienne	96
V.4.1- impact des propriétés mécaniques de surface.....	96
V.4.2- impact de la chimie de surface.....	97
V.4.3- impact de la topographie de surface	99

Chapitre 2 : Fonctionnalisation et développement des cellules souches mesenchymateuses sur des surfaces homogènes naturelles et artificielles	103
I- Introduction.....	103
II- Section expérimentale	105
II.1- Préparation des surfaces homogènes	105
II.1.1- Préparation des surfaces homogènes naturelles	105
II.1.1.1- Silanisation en phase gazeuse :	105
II.1.1.2- Préparation des échantillons	106
II.1.1.3- Hydrolyse de l'ester	107
II.1.1.4- Greffage de la fibronectine et du RGD cyclique	107
II.1.2- Préparation des surfaces homogènes artificielles.....	111
II.2- culture cellulaire	112
II.3- Estimation du taux de confluence	113
II.4- Fixation et colorations.....	113
III- Résultats et discussions	114
III.1- Caractérisation de surface	114
III.1.1- Angle de contact	114
III.1.2- XRR (Specular X-ray Reflectivity).....	117
III.1.3- XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy)	118
III.1.4- AFM (Atomic Force Microscopy)	120
III.2- Etude biologique.....	121
III.2.1- Mise à l'épreuve du protocole expérimental	121
III.2.2- Estimation de la confluence cellulaire	122
III.2.3- Comparaison morphologique.....	123
III.2.4- Test de différenciation.....	124
III.3- Discussions et perspectives	126
IV- Conclusion et perspective	128

Chapitre 3 : fonctionnalisation et assemblage des bactéries sur des surfaces bifonctionnelles naturelles	132
I- Introduction.....	132
II- Section expérimentale	134
II.1- Préparation des surfaces naturelles patternées et homogènes	134
II.1.1- Préparation des surfaces patternés naturelles.....	134
II.1.1.1- Lithographie électronique.....	134
II.1.1.2- Silanisation en phase gazeuse et greffage des molécules naturelles.....	137
II.1.2- Préparation des surfaces homogènes naturelles	139
II.2- culture bactérienne	139
II.2.1- Souche bactérienne	139
II.2.2- Préservation et culture : en général	140
II.2.3- Elaboration du biofilm bactérien.....	140
II.3- Coloration des bactéries : Marquage au backlight.....	141
II.4- Estimation du taux de recouvrement et de la taille des bactéries	142
III- Résultats et discussions	143
III.1- Caractérisation de surface	143
III.2- Etude biologique.....	143
III.2.1- Estimation du taux de recouvrement et de la taille des bactéries	143
III.2.2- Comparaison morphologique.....	145
III.3- Discussions et perspectives	148
IV- Conclusion et perspective	149
 Conclusions et perspectives	 150
Références bibliographiques	154
Résumé	186

Liste des figures

Figure 1: Comparaison de plusieurs objets biologiques par taille	3
Figure 2: La médecine régénératrice : l'ingénierie tissulaire, la thérapie cellulaire et la combinaison des deux.	10
Figure 3: Concept de l'ingénierie tissulaire	12
Figure 4: Stratégie générale de l'ingénierie tissulaire.	13
Figure 5: Champs d'application du concept d'ingénierie tissulaire chez l'homme	15
Figure 6: Le réseau bidimensionnel de la lame basale de la MEC.	18
Figure 7: Composition des fibres de collagènes	20
Figure 8: Représentation des lames élastiques de la matrice extracellulaire de l'aorte	21
Figure 9: Représentation des motifs disaccharidiques composant les glycosaminoglycanes.	22
Figure 10: Exemples de glycoprotéines de structure de la MEC	25
Figure 11: Schéma de la classification et les récepteurs des intégrines.	27
Figure 12: Schéma représentative des interactions cellule-MEC, cellule-cellule	27
Figure 13: Schéma représentative des structures d'adhérence.	28
Figure 14: Image des différents types de structure d'adhérence par microscopie à fluorescence	29
Figure 15: Apparence fibroblastique des CSM en culture observées en microscope	31
Figure 16: La multipotence des CSM	31
Figure 17: Principales sources adultes de CSMs	33
Figure 18: Schéma représentant la niche des cellules souches mésenchymateuses	35
Figure 19: Caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses: l'autorenouvellement/ prolifération et différenciation	37
Figure 20: Schéma représentant un modèle de certains potentiels de transdifférenciation de CSM	37
Figure 21: L'activité immunosuppressive des CSM induit par des cytokines proinflammatoires et la migration des mêmes cellules T à proximité de CSM induite par les cytokines inflammatoires	39
Figure 22: Propriétés immunosuppressives des CSM de système immunitaire inné et adaptatif	42
Figure 23: Images d'ulcères de la plaie des patients ayant reçu une injection intramusculaire des CSM d'origine adipeuse	44
Figure 24: Image montrant la capacité des CSM de stimuler (+) ou d'inhiber (-) certaines cellules neuronales	45
Figure 25: Biomatériaux dans le corps humain	46
Figure 26: Réponse cellulaire au microenvironnement biophysique	52
Figure 27: Schéma montrant le contrôle du destin des cellules souches	54
Figure 28: Différents exemples de modifications de surface: physiques, chimiques et biologiques contribuant à l'amélioration de l'endothélialisation	57

Figure 29: Principe de dépôt couche par couche utilisé dans la technique de modification des surfaces par assemblage multicouches de polyélectrolytes (PEMs).	60
Figure 30: Groupe de SAM composé d'une tête, d'une queue et un groupe terminal fonctionnel.	62
Figure 31: Utilisation des SAM pour l'étude de l'influence des protéines adsorbés sur le comportement cellulaire, comme l'adhésion, la prolifération et la différenciation.	64
Figure 32: Images à contraste de phase de cellules cultivées sur des multicouches d'héparine préparées à des conditions différentes de pH.	66
Figure 33: Images à contraste de phase de cellules cultivées sur des multicouches terminées soit par le chitosan, soit par l'héparine à des différentes conditions de pH.	67
Figure 34: La biocompatibilité des substrats formés par les multicouches PAH / PAA réticulés pour l'ostéogenèse et la biominéralisation des CSM.	68
Figure 35: Corrélation entre la taille de la topographie du substrat et les organites de détection cellulaire.	70
Figure 36: Influence des propriétés mécaniques et physiques de la MEC sur le comportement cellulaire.	72
Figure 37: Schéma représentant la lithographie électronique.	74
Figure 38: Micrographies optiques et images de fluorescence respectivement sur le support présentant les sillons et le support présentant les îlots montrant la différence de forme des cellules.	75
Figure 39: Combinaison de caractéristiques géométriques et de ligands d'adhésion orientant la différenciation vers des lignées adipocytaires et neuronales.	76
Figure 40: L'étalement cellulaire affecte le degré de spécification de la lignée adipogénique et neurogénique.	77
Figure 41: (A) Pourcentage de cellules en forme rectangulaire et de ratio croissant différenciées en ostéoblastes ou adipocytes. (B) Pourcentage de cellules en forme de fleur, forme pentagonale et forme d'étoile différenciées en l'un ou l'autre des deux lignées.	78
Figure 42: Destin de différenciation cellulaire selon la contractilité des cellules.	79
Figure 43: Schéma représentant les différents aspects du microenvironnement cellulaire.	81
Figure 44: Les voies de signalisation induites lors de la mécanotransduction qui participent à la régulation du destin cellulaire.	82
Figure 45: Activation des intégrines.	83
Figure 46: (A) Schéma représentant la structure d'un monomère de la fibronectine. (B) schéma représentant les séquences d'interaction cellules-fibronectine.	86
Figure 47: Schéma représentative des protéines impliquées dans la constitution des adhésions focales.	88
Figure 48: L'impact du nature du ligand (Fn: fibronectine, Ln: laminine, Cn: collagène) sur le comportement cellulaire (adipogenèse ou neurogenèse) sur des géométries circulaires ou étalé.	89
Figure 49: Les molécules d'adhésion et leur affinité de favorisation de l'ostéogenèse des CSM.	91

Figure 50:Schéma représentant le développement d'un biofilm en se basant sur quatre étapes	95
Figure 51:La colonisation bactérienne d'un même groupe bactérien ayant une chimie semblable sur une surface lisse (à gauche) et sur une surface poreuse (à droite). Les images sont prises par microscopie électronique à balayage (MEB)	99
Figure 52:Image du réacteur de salinisation en phase gazeuse utilisé dans notre laboratoire.	106
Figure 53:La formule chimique de silane utilisé.	107
Figure 54:Structures chimiques de la fibronectine, de RGDcyclique, de 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) et de 3- (Maleimido) propionique N-ydroxysuccinimide ester (NHS) utilisés lors du greffage des surfaces silanisées.	108
Figure 55:Schéma représentant la silanisation des surfaces de silicium, l'hydrolyse et l'activation de surface avec le couple EDC / NHS en solution aqueuse pour le greffage de fibronectine ou de RGD cyclique.....	110
Figure 56:Schéma représentant le protocole de multicouches de polyélectrolytes.	111
Figure 57:Structures chimiques du chitosane, d'acide polyacrylique (PAA), de poly(sodium 4-styrènesulfonate) (PSS) avec leurs groupements fonctionnels (en rouge).	112
Figure 58:Epaisseur des monocouches de silane mises en place par la silanisation en phase gazeuse mesurée par XRR.	118
Figure 59:Les spectres C1s des surfaces silane – ester (échantillon 1) et des surfaces silane – acide carboxylique (échantillon 2).	119
Figure 60:Les spectres N1s des surfaces silane – NHS (échantillon 3), des surfaces après le greffage de RGDcyclique (échantillon 4) et des surfaces après le greffage de la fibronectine (échantillon 5) ..	119
Figure 61:Les spectres C1s des surfaces silane – NHS (échantillon 3), des surfaces après le greffage de RGDcyclique (échantillon 4), des surfaces après le greffage de la fibronectine (échantillon 5)...	120
Figure 62:Images d'AFM montrant les surfaces silanisées et modifiées.....	121
Figure 63:Validation du protocole de culture par les Caco2.....	122
Figure 64:Pourcentage de confluence à 12 jours des CSM de moelle osseuse.	123
Figure 65:Comparaison morphologique des cellules cultivées sur les surfaces aux différents traitements.....	124
Figure 66:Les différents tests de différenciation via la coloration des surfaces traitées à l'Oil Red O, l'Alcian Blue et l'Alizarin Red S.	125
Figure 67:Les différentes étapes de la lithographie électronique des surfaces de silicium.	136
Figure 68:Les différentes étapes de la lithographie électronique des surfaces de mica.....	136
Figure 69:Les différents motifs obtenus par lithographie électronique et repérés par le microscope électronique.....	137
Figure 70:Une vue schématique du processus suivi pour obtenir les surfaces à motifs et silanisées.	139
Figure 71:Une vue schématique du processus suivi pour obtenir les surfaces homogènes silanisées.....	139

Figure 72:Taux de recouvrement des bactéries E.coli après 24h d'adhésion bactérienne sur des surfaces de mica vierge et des surfaces de mica modifiées.	144
Figure 73:Taille des bactéries E.coli après 24h d'adhésion bactérienne sur des surfaces de mica vierge et des surfaces de mica modifiées.	145
Figure 74:Comparaison morphologique des E.coli cultivées sur les surfaces aux différents traitements.....	146
Figure 75:Comparaison morphologique et l'alignement parallèle des E.coli cultivées sur les surfaces ayant modifiées par lithographique électronique greffées par le RGD cyclique (A) ou la fibronectine (B).	147

Liste des tableaux

Tableau 1: Les protéoglycanes matriciels.....	23
Tableau 2: Exemples des glycoprotéines solubles et matricielles.....	24
Tableau 3: Marqueurs des CSM en cytométrie de flux	32
Tableau 4: Molécules essentielles sécrétées par les CSMs ayant comme cellules cibles les cellules de l'immunité innée et adaptative	40
Tableau 5: Domaines d'application des biomatériaux.....	47
Tableau 6: Différents types de biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage	48
Tableau 7: Quelques propriétés et définitions des biomatériaux.....	49
Tableau 8: Résumé des avantages et des inconvénients des matériaux naturels et synthétiques	51
Tableau 9: Exemples de biomatériaux d'origine végétale et leurs utilisations	55
Tableau 10: Exemples de biomatériaux d'origine animale et leurs utilisations.	55
Tableau 11: Différentes techniques utilisées pour modifier les biomatériaux (post-polymérisation) pour l'amélioration des interactions avec les cellules	58
Tableau 12: Tableau montrant des avantages et des propriétés fournis par SAMs à une surface une fois greffée par ces monocouches	63
Tableau 13: Quelques séquences peptidiques capables de promouvoir l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire.....	80
Tableau 14: Valeurs des angles de contact des surfaces silanisées	115
Tableau 15: Valeurs des angles de contact des surfaces à dépôt de polyélectrolytes de différents cycles.	116

Liste des abréviations

AAF : Aérobie-anaérobie facultatif
ABP : Protéines liées à l'actine
ADAMs : A disintegrin and metalloproteinase
ADAMTs : A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
AH : Acide hyaluronique
Amp : Ampicilline
Ang-1 : Angiopoïétine-1
AP : Alkaline phosphatase
Arp2/3 : Actin-Related Proteins
BDNF : Brain-derived neurotrophic factor
bFGF : Basic Fibroblast Growth Factor
CAM : Cell adhesion molecules
CCL2 : chemokine (C-C motif) ligand 2
CD : Cellules dendritiques
CFU-F : Colony Forming Unit-fibroblasts
CMLVs : Cellules musculaires lisses vasculaires
CNTF : Ciliary neurotrophic factor
CS : Cellules souches
CS : Chondroïtine-sulfate
CSH : Cellules souches hématopoïétiques
CSMs : Cellules souches mésenchymateuses
CTGF : Protein le connective tissue growth factor
CXCL-12 : C-X-C motif chemokine 12
Cyr61 : Cysteine-rich angiogenic inducer 61
DS : Dermatan-sulfate
E. coli : Escherichia coli
EGF : Epithelial Growth Factor
EPS : Extracellular Polymeric Substances
FAK : focal adhesion kinase
FGF : Fibroblast Growth Factor
FGF-2 : basic fibroblast growth factor
FN : Fibronectine
GAGs : Glycosaminoglycans
G-CSF : Granulocyte-colony stimulating factor
GDNF : Glial cell-derived neurotrophic factor
GFP : Green fluorescent Protein
GPI : glycosylphosphatidylinositol
GvHD : Greffon contre l'hôte
HAP : Hydroxyapatite
HGF : Hepatocyte growth factor
HS : Héparane-sulfate
IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase

IFN- γ : Interféron - γ
Ig : Intégrine
IGF1 : Insulin-like growth factor 1
IL : Interleukin
IPA : Isopropyl Alcohol
ISCT : Société Internationale de thérapie cellulaire
IT : Ingénierie tissulaire
Km : Kanamycin
KS : Kératane-sulfate
LAP2 : Lamina-associated polypeptide 2
LB : Luria-Bertani
LINC : Linkers of Nucleoskeleton and Cytoskeleton
LOX : Lysyloxidase
MAGP : Microfibril-associated glycoproteins
MAP Kinases : Mitogen-activated protein kinases
MB : Membrane basale
MBA : Molécules biologiquement actives
MEC : Matrice extracellulaire
MEMS : Systèmes microélectromécaniques
MIBK : Methyl isobutyl ketone
MLC : Chaîne légère de la myosine II
MLCK : Myosin II Light Chain Kinase
MO : moelle osseuse
MR : Médecine régénérative
NEMS : Systèmes nanoélectromécaniques
NGF : Nerve growth factor
NK : Natural killer
NOV : Nephroblastoma overex-pressed
PAA : Polyacrylic acid
PAAm : Polyacrylamide
PAH : Poly(allylamine hydrochloride)
PAI-1 : Plasminoggen activator inhibitor-1
PBS : Phosphate-buffered saline
PCL : Polycaprolactone
PE : Polyélectrolytes
PEM : Assemblage multicouches de polyélectrolytes
PEO : Polyethylene Oxide
PGA : Acide polyglycolique
PGE2 : Protaglandine E2
PGs : Protéoglycanes
PI : Iodure de propidium
PLA : Acide polylactiques
PLGA : Acide poly DL-lactique
PLGF : Placenta growth factor

PLLA : Acide poly L lactique
PLLC : Poly L-lactide-co-caprolactone
PMMA : poly (méthacrylate de méthyle)
PSS : Poly(styrène-4-sulfonate)
PTFE : Polytetrafluoroethylene
ROCK : Rho Associated Protein Kinase
SAM : Self-Assembled Monolayers
SDF-1 : stromal cell-derived factor 1
SUN : Sad1 and UNC-84
TCPS : Tissue culture polystyrene
TGase : Transglutaminase
TGF α : Tissu Growth Factor α
TGF β : Tissue Growth Factor β
TLR : Toll-Like receptor
TLRs : Toll Like Receptors
TNF : Tumor necrosis factor
TNF- α : tumor necrosis factor alpha
TRKC : Tropomyosin receptor kinase C
TSG-6 : TNF- α -stimulated gene/protein 6
VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF : Vascular endothelial growth factor

Introduction générale

Introduction générale

Porté par le vieillissement de la population, La biomédecine moderne associée à l'utilisation des dispositifs médicaux et des biomatériaux pour réparer, régénérer, reconstruire l'humain est en croissance. Le groupement de recherche « Réparer l'humain » (GDR) est une première étape et a été labélisé fin 2017 par le CNRS et l'Inserm. Ce groupe souhaite porter en France une démarche innovante interdisciplinaire, multi-instituts et inter-organismes dans le domaine de la médecine réparatrice, et y associer les acteurs académiques, cliniques, industriels, et le monde associatif. La médecine réparatrice doit permettre de remplacer le tissu ou l'organe déficient, mais aussi aider le corps à réparer par lui-même le tissu cible, grâce à un guidage de ses propres capacités de régénération. Cette approche très intégrative fait appel aux caractéristiques structurelles et mécaniques relatives aux tissus et aux supports, à la fonctionnalisation des biomatériaux, la vectorisation des molécules effectrices et l'apport de cellules multi/totipotentes.

Les demandes actuelles de transplantation dépassent largement la réserve. Pour surmonter cette pénurie d'organes, des traitements alternatifs ont été développés, en reconsidérant le fait qu'au lieu de transplanter un organe entier, un implant autologue peut être développé et implanté dans le patient en tant qu'organe vivant et fonctionnel. En d'autres termes, le tissu du donneur est récolté et dissocié en cellules individuelles, et les cellules sont attachées et cultivées sur un substrat approprié qui est finalement implanté sur le site souhaité du tissu fonctionnel [1]. Grâce aux progrès des cultures cellulaires, de nombreuses populations cellulaires isolées peuvent être développées in vitro, ce qui nécessite un très petit nombre de cellules donneuses pour préparer de tels implants. Cependant, il a été prouvé que les cellules isolées ne peuvent pas former de nouveaux tissus par elles-mêmes [1,2]. La plupart des cellules d'organes primaires dépendent de processus de l'ancrage et nécessitent des environnements spécifiques qui incluent un support spécifique pour leur développement. Par conséquent, le succès de toute thérapie de transplantation cellulaire repose sur le développement de substrats appropriés pour la culture tissulaire in vitro et in vivo. Actuellement, ces substrats, principalement sous forme d'échafaudages (scaffolds) d'ingénierie tissulaire, s'avèrent moins qu'idéaux pour les applications, non seulement parce qu'ils manquent de résistance mécanique, mais souffrent aussi d'un manque de canaux d'interconnexion, soit l'absence de connaissances et de contrôle parfaits (concernant l'échafaudage artificiel) de l'organisation du groupe chimique à la surface empêchent l'utilisation complète des matériaux actuellement développés.

L'environnement natif des cellules souches est la matrice extracellulaire (MEC); c'est un échafaudage 3D comprenant un agrégat insoluble de plusieurs protéines multifonctionnelles hautement organisées et des glycosaminoglycanes. La réponse physiologique des cellules aux stimuli externes est entièrement guidée par la nature chimique et physique de l'environnement, premièrement ils vont l'intégrer et après l'avoir interprétée, ils vont générer une réponse physiologique à l'environnement externe [2,3]. Il est alors évident que la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose de la cellule dépendent entièrement de leur environnement, et de l'influence combinée du milieu liquide et de la structure de la MEC (en termes de géométrie et de chimie).

Le concept initial de l'étude des matériaux et des systèmes biologiques à l'échelle micro et nanométrique remonte à 1959, lorsque Richard Feynman a présenté une conférence intitulée «Il y a beaucoup de place au fond». Cette discussion est généralement considérée comme le premier examen de monde de matériaux, d'espèces et de structures à l'échelle nanométrique [4] (figure 1).

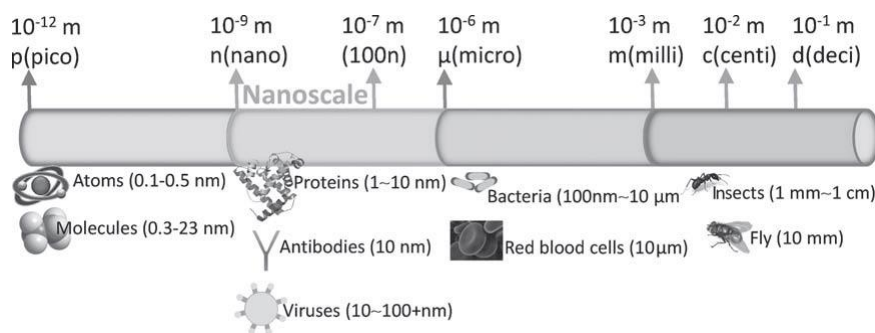


Figure 1: Comparaison de plusieurs objets biologiques par taille [4].

Depuis la fin des années quatre-vingt, de nombreux efforts ont été développés dans le domaine de développement de surfaces pouvant interagir avec des systèmes vivants (bactéries, cellules, cellules souches) [5]. En effet, le développement d'outils pour la nanotechnologie qui a permis la création et la caractérisation de surfaces de l'échelle macrométrique à l'échelle nanométrique a permis de développer de nouvelles investigations pour mieux comprendre les processus de vie à l'échelle nanométrique [6]. Il n'est donc pas étonnant qu'un nouveau domaine de recherche interdisciplinaire ait été développé, ce qu'on appelle la nanobiotechnologie. La combinaison des études, du numérique à l'expérimental, a éclairé que les systèmes vivants montre un comportement fascinant, car ils peuvent intégrer, répondre, communiquer les uns aux autres en réponse à leur environnement. Et même des

changements au niveau nanométrique peuvent induire un changement dans la forme des cellules, le développement et aussi la communication entre les uns et les autres [5,4].

Les cellules souches sont définies comme des cellules biologiques indifférenciées qui, dans certaines conditions, peuvent se différencier en cellules caractéristiques et peuvent également se diviser pour produire davantage de cellules souches. Les cellules retirées peuvent être réalisées à partir de différentes sources, comme le tissu adipeux des cellules lipidiques par liposuccion, du sang ou de la moelle osseuse typiquement du fémur ou de la crête iliaque, ce dernier étant le plus caractérisé et donc le plus commun dans la littérature [7]. L'un des rôles les plus importants des cellules souches est qu'elles sont des réservoirs de capacité de cellules réparatrices, car elles peuvent se différencier et agir en cas de blessure ou de maladie. Cependant, il existe certaines limites pour étudier ce rôle précis dans le tissu réparateur, principalement en raison du manque de marqueurs spécifiques aux cellules utiles. Néanmoins, les cellules souches présentent l'avantage de la facilité de retrait, d'isolement et d'expansion des cultures cellulaires sur plusieurs générations tout en conservant leur capacité à se différencier [8].

De même, et dans le contexte d'interactions des systèmes vivants avec les surfaces, les bactéries occupent une place importante. La souche E.coli qui est découverte pour la première fois dans les selles de nourrissons, elle est un bacille à Gram négatif et une espèce versatile incluant des bactéries pathogènes. Sa température optimale de croissance est 37°C. Elle présente un mode de vie en biofilm qui exige pour son développement l'adhérence des bactéries à la surface. Plusieurs études ont été menées au cours des années passées sur l'interaction bactérie/surface et l'impact de la nature et les propriétés de surface (mécaniques, physico-chimiques et topographiques) sur la colonisation et l'adhérence bactérienne [9].

L'objectif principal de ce travail était d'étudier :

- L'impact de surfaces de chimie contrôlée et de surfaces de géométrie et de chimie contrôlées sur l'adhésion, la prolifération et la différenciation de cellules souches dans un premier temps.
- L'impact de surfaces de chimie contrôlée et de surfaces de géométrie et de chimie contrôlées sur le comportement d'E.coli dans un deuxième temps.

Dans cette thèse, des supports particuliers furent conçus, mettant en avant deux aspects essentiels que sont d'une part la chimie du support et d'autre part la géométrie du support afin d'étudier l'effet de la surface de culture sur le comportement des cellules et des bactéries. Ce

fut l'avènement de la fonctionnalisation de surface appliquée à la biologie cellulaire et bactérienne. Deux types de molécules ont été déposés sur de telles surfaces : les molécules dites naturelles issues de la MEC (la fibronectine) et les molécules dites de synthèse comme des fragments de molécules d'adhésion (peptide RGD cyclique) ou d'autres molécules conçues chimiquement (polyélectrolytes) permettant notamment d'étudier l'adhésion cellulaire.

Ce travail est divisé en trois chapitres :

Le premier chapitre sera l'état d'art sur les enjeux de la médecine régénérative en focalisant sur l'ingénierie tissulaire son concept et ses applications qui ouvrent une nouvelle visibilité dans ce domaine. Ensuite, nous présenterons une description détaillée de la membrane extracellulaire, de l'intérêt des cellules souches mésenchymateuses dans la médecine régénérative, de développement des biomatériaux (principaux acteurs de la médecine régénérative) et de différents types de modifications de surface : chimiques, géométriques et biologiques. La dernière partie du chapitre présentera une brève description de l'adhésion bactérienne (*E.coli*) et les propriétés de surface affectant la colonisation bactérienne.

Le deuxième chapitre porte sur le développement des cellules souches sur des surfaces homogènes naturelles et artificielles. Cette étude comporte le développement d'un processus de fonctionnalisation chimique de surface afin de permettre le greffage de molécules naturelles (la fibronectine, RGD cyclique) en utilisant l'auto-assemblage d'une monocouche de silane (silanisation en phase gazeuse). Ensuite, l'assemblage de cellules souches sera effectué sur des surfaces homogènes greffées par des molécules naturelles (fibronectine et RGD cyclique) et sur des surfaces homogènes fonctionnalisées par des polyélectrolytes (chitosan/PSS ou chitosan/PAA). Cette étude comporte encore une caractérisation physicochimique des surfaces modifiées qui était nécessaire avant d'étudier l'effet des surfaces sur le comportement des cellules souches. La transposition de ces procédés exécutés sur des surfaces homogènes dans ce chapitre vers des surfaces patternées était parmi nos buts mais ce but n'a pas été effectué au cours de ce travail.

Le troisième chapitre est consacré à l'élaboration à côté des surfaces homogènes silanisées, des surfaces boifonctionnelles, des micro-surfaces greffées par la monocouche de silane, en combinant la lithographie électronique et la silanisation en phase gazeuse. Après, nous discuterons l'impact de la modification des surfaces sur le comportement des bactéries *E.coli*.

Références

- [1] R. P. Lanza, R. S. Langer, et J. Vacanti, Éd., *Principles of tissue engineering*, Fourth edition. Amsterdam: Academic Press, an imprint of Elsevier, 2014.
- [2] C. A. Parent, « A Cell's Sense of Direction », *Science*, vol. 284, n° 5415, p. 765-770, avr. 1999.
- [3] P. P. Girard, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Kemkemer, et J. P. Spatz, « Cellular chemomechanics at interfaces: sensing, integration and response », *Soft Matter*, vol. 3, n° 3, p. 307, 2007.
- [4] N. M. Alves, I. Pashkuleva, R. L. Reis, et J. F. Mano, « Controlling Cell Behavior Through the Design of Polymer Surfaces », *Small*, vol. 6, n° 20, p. 2208-2220, oct. 2010.
- [5] C. A. Custódio et J. F. Mano, « Cell Surface Engineering to Control Cellular Interactions », *ChemNanoMat*, vol. 2, n° 5, p. 376-384, mai 2016.
- [6] A. C. Lima et J. F. Mano, « Micro-/nano-structured superhydrophobic surfaces in the biomedical field: part I: basic concepts and biomimetic approaches », *Nanomed.*, vol. 10, n° 1, p. 103-119, janv. 2015.
- [7] A. Uccelli, L. Moretta, et V. Pistoia, « Mesenchymal stem cells in health and disease », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, n° 9, p. 726-736, sept. 2008.
- [8] F. P. Barry et J. M. Murphy, « Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 36, n° 4, p. 568-584, avr. 2004.
- [9] L. Ploux, A. Ponche, et K. Anselme, « Bacteria/Material Interfaces: Role of the Material and Cell Wall Properties », *J. Adhes. Sci. Technol.*, vol. 24, n° 13-14, p. 2165-2201, janv. 2010.

Chapitre 1 : Bibliographie

Enjeux de la médecine régénérative

L'une des plus excitantes nouvelles frontières dans la médecine de nos jours est la médecine régénérative (MR). Cette discipline émergente a comme objectif révolutionnaire la régénération biologique des tissus et des organes lésés ou souffrant d'une maladie grâce à l'interaction avec de nombreux domaines, tels que la biologie, la chimie, la médecine et l'ingénierie, donnant naissance par suite à un nouveau champ scientifique à haut niveau de contenu technologique. Dans ce contexte, les biomatériaux utilisés sont les principaux acteurs des enjeux de la MR, qui ont pour rôle essentiel de remplacer l'environnement naturel des cellules isolées ou des tissus greffés en assurant et en conservant leur structure tridimensionnelle (3D) et en fournissant les signaux biologiques et mécaniques exigés [1]. Les nanomatériaux à base d'argile [2], Les surfaces en forme des nids d'abeille [3], les surfaces à base fibrine, et les matériaux à base hydrogels [4] représentent des exemples des études très récentes de tels biomatériaux participant aux enjeux de la MR.

I- Ingénierie tissulaire

La reconstitution des organes endommagés et le remplacement des cellules déficientes restent le but principal de la MR. Elle regroupe l'ingénierie tissulaire (IT), la thérapie cellulaire et la combinaison des deux (figure 2), où plusieurs cas sanitaires profitent de ce type de médecine comme les cas de destruction des cellules, tissu ou organe (ex: greffes d'îlots de Langerhans, reconstruction épidermique), des maladies dégénératives (maladie de Parkinson) et de nombreuses pathologies humaines (vasculaire, cardiaque, osseuse ...).

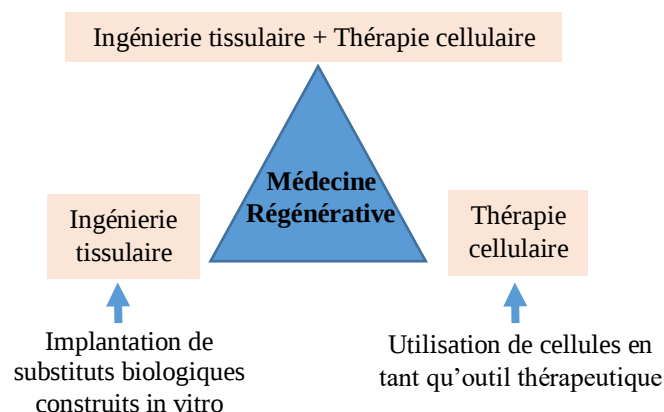


Figure 2: La médecine régénératrice : l'ingénierie tissulaire, la thérapie cellulaire et la combinaison des deux.

L'optimisation des effets de la thérapie cellulaire est basée sur l'association de l'IT à la thérapie cellulaire.

En IT, deux approches ont été développées, la première est la génération-avant l'implantation-d'un tissu fonctionnel entière in vitro, la seconde est l'implantation d'un greffon immature in vivo, où la poursuite de sa maturation se déroulera au sein de son destin [5]. Par ailleurs, l'outil prometteur de l'IT est l'association de deux aspects :

- Le développement de matrices mécaniquement et biologiquement adéquates.
- L'identification d'une source cellulaire ayant un potentiel de différenciation et de réparation adapté (ex : Cellules souches mésenchymateuses (CSM) : des candidates des choix ...).

La complémentarité de ces deux aspects de l'IT est donc essentielle dans le contexte de la thérapie cellulaire.

I.1- Concept de l'ingénierie tissulaire

Le domaine de la transplantation d'organes a connu ces dernières années des importants progrès à l'échelle de plusieurs disciplines, prenant par exemple les premières greffes de visage accomplis par la recherche chirurgicale française en 2005 [6,7]. Cependant, il demeure limité par l'effet immunosuppresseur des traitements chirurgicaux et le manque des greffons. En outre, et surtout à cause de la complexité de la vascularisation, la transplantation de certains organes (la vessie, la trachée ou l'œsophage ...) ne s'achève pas avec succès. Pour ces raisons les chirurgiens cherchent à s'impliquer dans les recherches fondamentales et translationnelles des thérapeutiques innovantes [8], en particulier l'implication dans un des champs en plein essor de la MR qui est l'IT [9], qui a été définie par Langer et Vacanti [10] comme «un domaine interdisciplinaire qui applique les principes de l'ingénierie et des sciences du vivant au développement de substituts biologiques Capable de restaurer, maintenir et améliorer la fonction d'un tissu ou d'un organe entier» [11].

Le concept de l'IT a pour but de générer un tissu en basant sur l'ensemencement d'un biomatériau biocompatible avec des cellules appropriées ou le chargement avec des molécules biologiquement actives afin d'améliorer la différenciation et la maturation cellulaire [5] (figure 3).

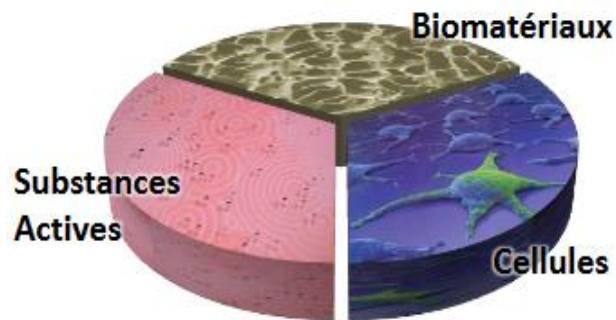


Figure 3: Concept de l'ingénierie tissulaire [12].

Des nombreux facteurs locaux, physiques et chimiques affectent fortement le destin, in vivo, de l'association de cellules et de biomatériau, notamment la perméabilité et les propriétés mécaniques des néo-tissus [13], qui nécessitent une source de cellules saines capable d'améliorer leur fonctionnalité et d'obtenir une matrice appropriée du tissu d'origine [14]. Les CSM est l'une des sources cellulaires pouvant servir à cette amélioration.

Pratiquement ce concept est basé sur l'utilisation de cellules d'intérêt autologues (les CSM, les cellules musculaires ou les cellules épithéliales ...) prélevées chez le patient. Les cellules isolées par une biopsie tissulaire subissent une expansion cellulaire in vitro, avant d'être ensemencées à une matrice acellulaire. L'association cellule/matrice et/ou substitut ainsi formé s'en suit par une maturation dans un bioréacteur naturel ou artificiel. Ce substitut sera implanté au niveau du site lésé. Ce type de remplacement d'organe est donc considéré une autogreffe (figure 4). Le remplacement de la vessie, de l'urètre, des valves cardiaques et la reconstruction du vagin sont parmi les applications cliniques ayant utilisé cette stratégie d'IT avec succès [11].

Ces dernières années ont été marquées par la technologie avancée des nouvelles thérapeutiques (IT, thérapie cellulaire...), aussi par la familiarisation des cliniciens avec les concepts de base liés à l'IT (CSM, culture cellulaire...) [15] expliquant les nombreuses applications cliniques qui se développent très largement compte tenu du potentiel des technologies destinées à la stimulation de la régénération tissulaire.

Plusieurs témoins autres que les applications en clinique soulignent l'émergence de concept de l'IT déjà présenté, citons :

- La formation des équipes chirurgicales, des équipes des chercheurs et des cliniciens impliquées dans l'application de ces thérapies innovantes.
- La création des sociétés ayant comme objectif l'avancement à l'échelle mondiale de la science et de la technologie de l'IT et de la MR telle que la société internationale

TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society) en 2005.

- L'accroissement de nombres des journaux consacrés à ces thèmes : *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *Bioengineering the Heart*, *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *Biomedical Materials*, etc...) [8].

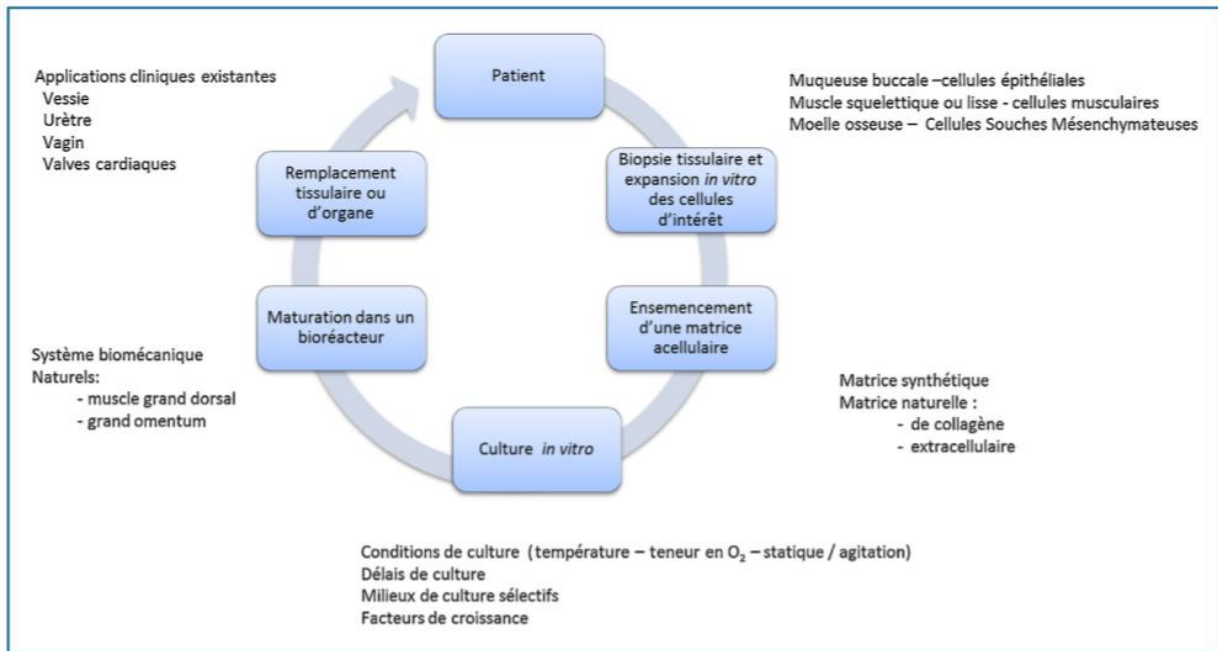


Figure 4: Stratégie générale de l'ingénierie tissulaire [11].

Retournant vers les applications cliniques, les années entre 2005 et 2008 a connu les premières applications de ce concept en clinique. Après les premières greffes de visage exécutées en Novembre 2005 en France pour une femme de 38 ans [6,7], le pédiatre (Antony Atala) a réussi en 2006 d'élaboration par IT d'un tissu vésical et de l'implanter chez 7 patients souffrés de myéloméningocèle et sont menacés d'entérocystoplastie. Une histologie semblable du néo-tissu formé à celle de la vessie native est observée chez 6 de 7 patients, à côté du volume et de la compliance vésicale en croissance. La stratégie d'IT utilisée par Atala était précis, basé sur l'utilisation des cellules musculaires et urothéliales et des matrices d'ensemencement soit sur des matrices naturelles (sous-muqueuse vésicale), soit des matrices synthétiques (collagène, acide polyglycolique) [16].

En outre, un chirurgien thoracique (Paolo Macchiarini) avec ses collègues a présenté une avancée intéressante en remplaçant la bronche souche gauche d'une femme de 30 ans, atteinte de bronchial malacia causé par tuberculous bronchitis, par une trachée cadavérique préparé d'une manière spécifique, et ont réussi d'éviter une pneumonectomie gauche après la

réponse positive du patient et la présentation d'une amélioration de sa fonction respiratoire [17].

De plus, il existe de nombreux produits issus de l'IT commercialisés ou non, par exemple et en particulier dans le domaine cutané, des produits sont déjà commercialisés et appliqués en clinique (Biobrane®, TransCyte®, Dermagraft®, Apligraf®, Integra®) [8].

Tous ces exemples cités et autres, clarifient la validité, l'importance et le grand intérêt du concept de l'IT sur le plan expérimental, industriel et médical.

I.2- Nouvelle visibilité des applications de l'ingénierie tissulaire

Le concept d'IT, auparavant exposé constitue avec la transplantation d'organes et la chirurgie prothétique une approche thérapeutique innovante de la MR [18,19]. Il est basé alors sur l'utilisation des sources cellulaires (soit différenciées, soit souches), des biomatériaux (naturels ou artificiels), des facteurs de croissance, des protéines d'adhésion cellulaire (la fibronectine (FN), RGD cyclique...), ou bien l'utilisation des cellules souches transfectées (la thérapie génique) [15]. Les champs d'applications chez l'homme sont nombreuses et incluent la reconstitution aussi bien du foie [20], de la peau [21], de l'appareil locomoteur [15,22] et de la cornée [23,24].

De nombreuses prothèses humaines synthétisées par bioingénierie y compris les vaisseaux sanguins (Cytograft®), les ligaments (Lars®), le cartilage (DeNovo NT®), les os (ChronOs®), etc..., sont ainsi disponibles et commercialisées. En outre, la régénération d'organes déficients comme le tissu nerveux central et périphérique, les muscles, le foie, la vessie, le pancréas, les sphincters, etc..., peuvent être envisagé par les principes de la génie tissulaire (Figure 5) [25].

Parallèlement à ces nombreux champs d'applications, de nombreux travaux ouvrent des nouvelles perspectives de l'émergence des concepts de l'IT, en particulier ceux qui font intervenir des sources cellulaires notamment les CSM et diverses matrices (biomatériaux), ces perspectives se développent et son attractivité se renforce auprès des chercheurs et des praticiens.

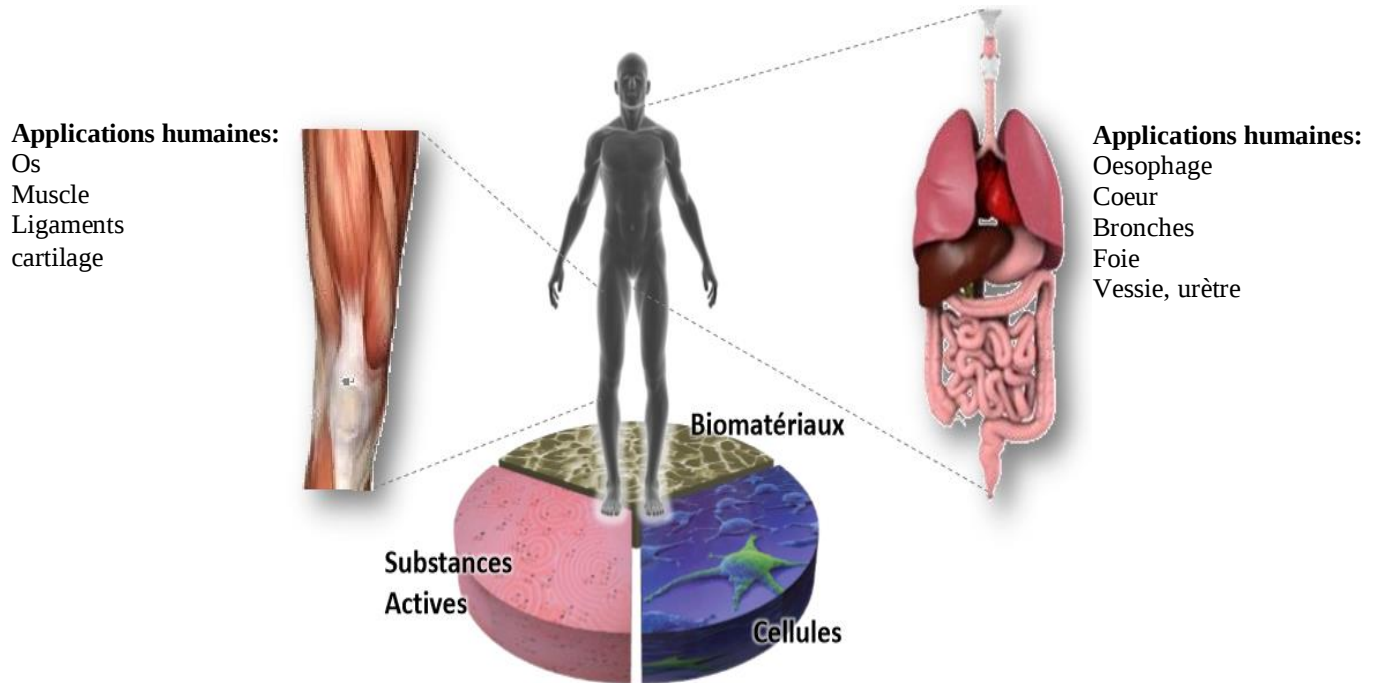


Figure 5: Champs d'application du concept d'ingénierie tissulaire chez l'homme [12].

Comme mentionné précédemment, concernant le remplacement d'une bronche souche par Paolo Macchiarini, les cellules utilisées pour l'ensemencement de la matrice decellularisée sont des CSM ayant été différenciées en des cellules épithéliales et des chondrocytes [17]. Ainsi, Yoshinori Miyahara et al. ont utilisé chez le rat les CSM pour la régénération tissulaire cardiaque notamment pour l'amélioration de la fonction cardiaque suite à un infarctus du myocarde [26]. En ce qui concerne la reconstruction osseuse, les choix en général sont repartis entre autogreffe et allogreffe. L'insuffisance du matériel génétique et des problèmes de la vascularisation sont affrontés dans le cas d'autogreffe, alors que dans le cas de l'allogreffe la disponibilité des greffons restent l'important problème à côté des problèmes de comptabilité et des risques infectieux. Toutes ces raisons illustrent l'intérêt des biomatériaux ensemencés par des CSM amplifiées in vitro pour de tels cas. Chez des malades souffrant de maladie de Blount et ayant été traités par ostéotomie tibiale, les CSM ont enregistré des importants résultats et des effets majeurs pendant le traitement [27].

En outre, les applications de l'IT de l'œsophage jusqu'à ce jour comptent uniquement sur des plasties d'élargissement par des matrices decellularisées [28], et actuellement, la plupart des recherches s'orientent vers l'utilisation des CSM et surtout leur secrétome en vue d'initier des essais cliniques dans un avenir proche.

Ainsi, dans des études très récentes, M. Mousa et al. ont souligné l'importance des nanoparticules d'argile dans l'émergence d'une nouvelle classe de biomatériaux ayant un

potentiel intéressant pour les applications de génie tissulaire et de MR en décrivant les effets potentiels des nanomatériaux à base d'argile sur la fonction cellulaire et en examinant le rôle potentiel des propriétés physicochimiques clés de l'argile dans l'influence des interactions cellule-nanomatériaux à base d'argile et leurs possibilités passionnantes pour la MR [2]. M.T. Calejo et al ont montré, de façon encourageante, le potentiel des films poreuses en nid d'abeilles préparés par la méthode «Breath figure» à induire la différenciation des cellules souches (CS) et de leur orienter dans une lignée spécifique sans avoir besoin de stimuli biochimiques [3]. Ainsi, des avancées récentes se dirigent vers la conception rationnelle des biomatériaux synthétiques d'hydrogels ayant une réactivité vis-à-vis des cellules en répondent localement aux cellules ou aux tissus sans l'apport d'un stimulus artificiel, ce qui fournit des nouvelles stratégies et perspectives pour l'utilisation d'environnements artificiels dans le domaine de l'IT et la MR [4]. Et finalement, plusieurs études orientent vers l'utilisation des biomatériaux à base de fibrine pour des applications de préservation de la fertilité en cas de cancers, grâce aux nombreuses qualités de la fibrine [1].

Dans ce contexte, et après l'exposition de ces quelques témoins qui font intervenir diverses matrices et cellules, apparaît le rôle promoteur des CSM comme outil thérapeutique. La demande en MR reste très élevée, car le besoin d'organes pour des transplantations ne peut être satisfait que par les dons d'organes de patients souvent décédés et malgré de grandes avancées en matière d'extraction, d'isolation de CS et le contrôle de ces dernières en terme de croissance, prolifération et de différenciation dans des milieux biologiques spécifiques, leur croissance sur des substrats reste mal connue et pourtant indispensable pour le développement des nouvelles surfaces pour induire, maîtriser et étudier les comportements cellulaires sur ces surfaces ce qui permet par suite d'émerger une nouvelle visibilité des applications de l'IT.

II- Membrane extracellulaire

II.1- Description de la membrane extracellulaire

Les tissus des êtres pluricellulaires sont caractérisés par une structure de base responsable de leurs propriétés physiques, leur organisation et leur protection. C'est une espace extracellulaire qui entoure des cellules homologues ou hétérologues et contient de macromolécules de type et de nature différents, que l'on désigne sous le nom de matrice extracellulaire (MEC) [29]. Après des études exécutées en XXème siècle sur des tissus conjonctifs visant à isoler et caractériser un grand nombre de leurs constituants

macromoléculaires, la MEC a été défini comme un réseau enchevêtré de macromolécules. Ces macromolécules sont infiniment variés et sont en étroite relation avec les cellules enveloppées dans la MEC [30].

Selon la composition moléculaire de la MEC, elle peut être d'aspect liquide (le liquide interstitiel ou le liquide synovial riches en polysaccharides), d'aspect solide (l'os riche en phosphate de calcium) ou d'aspect gélatineux (les tendons riches en protéines fibreuses) [31]. Histologiquement, la MEC présente deux types d'organisations architecturale : le stroma et la lame basale. Le stroma ou matrice interstitielle caractérise notamment les tissus conjonctifs. Cette matrice est produite par des cellules éloignées les unes des autres, appelées cellules résidentes ou stromales, surtout par les fibroblastes à côté de cellules immunitaires et endothéliales. Son rôle principal est le soutien mécanique. La lame basale ou membrane basale (MB) est spécifique des tissus épithéliaux, elle est synthétisée par les différentes couches de cellules jointives entre elles qui reposent sur cette matrice compacte. Cette matrice est responsable du maintien de la polarité cellulaire à travers son rôle de compartimentation et de support structural [30]. Cette région spéciale constitue un type particulier de MEC est composée de trois couches superposées : la lamina rara (transparente aux électrons), la lamina densa et la lamina reticulata [31]. La MB présente des morphologies, des épaisseurs et des compositions moléculaires différents selon les types cellulaires, on peut distinguer [31] (figure 6) :

- La famille des collagènes qui forme un réseau stable de polymères.
- La famille des laminines qui s'assemble pour constituer des réseaux associés à des autres réseaux formés par les collagènes (surtout le collagène IV).
- Le nidogène/entactine qui relie plusieurs molécules comme le perlecan (heparan-sulfate proteoglycane), le secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), la fibuline et autres au sein des réseaux de collagènes et de laminines.
- Des molécules extrinsèques telles que la FN qui contribue à la formation des MB.
- Des récepteurs à des molécules de la MEC en particulier les intégrines (Ig) (récepteurs à la FN), CD44 (récepteurs à l'acide hyaluronique) et autres, qui sont en regard de la MB.

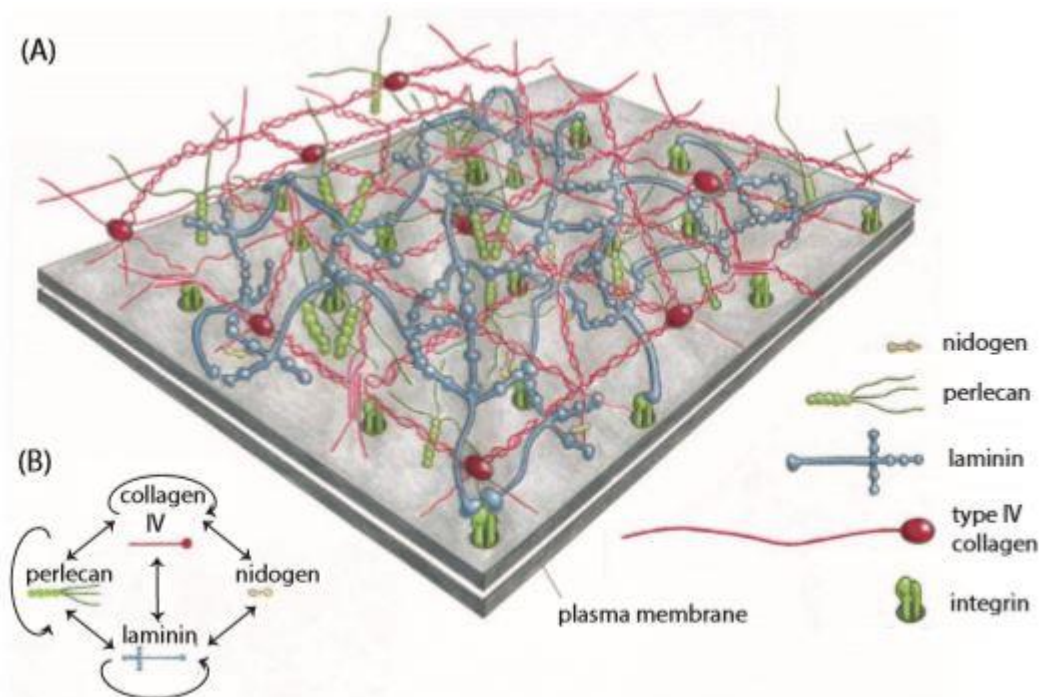


Figure 6: Le réseau bidimensionnel de la lame basale de la MEC [32].

(A) Schéma du réseau bidimensionnel formé par la lame basale à travers des interactions spécifiques (B) entre les protéines du collagène de type IV, la laminine, le nidogène et le protéoglycane (perlecan). Les flèches en (B) montrent les molécules qui peuvent se lier directement les unes aux autres.

Des interactions bidirectionnelles s'établissent entre les cellules et la MEC. Les cellules synthétisent et organisent la MEC, alors que la MEC en retour régule leur phénotype et leur activité, elle interagit avec des récepteurs de la surface cellulaire et affecte par suite les processus développementaux et homéostatiques [29,33]. Comme les cellules baignent dans la MEC, elle assure par suite leurs communications en jouant un rôle essentiel dans les contacts directs entre cellules (molécules d'adhérence et jonction cellule-cellule) et dans l'intervention dans des diverses voies de signalisation et de nombreux processus embryologiques, physiologiques et pathologiques [34]. Sa synthèse diminue avec l'âge et présente un phénomène de vieillissement à l'origine de nombreux problèmes [31].

La composition de la MEC, sans prenant en compte son type, regroupe quatre classes des macromolécules : les protéines fibreuses (élastine, collagène), les polysaccharides matriciels (protéoglycanes et glycosaminoglycanes), les glycoprotéines de structure (fibronectine, laminine), les protéines associées à la matrice (enzyme, facteurs de croissance). Ces macromolécules matricielles présentent dans les fluides biologiques sous forme soluble et/ou incorporées de façon insoluble dans les matrices solides [35–37]. Elles sont distribuées en proportions très variées selon le tissu considéré. Le cerveau est constitué d'une quantité mineure de MEC, par contre les tendons et le derme en contiennent majoritairement [34]. En

général la MEC qui est présente à tous les niveaux de l'organisme se trouve plus spécifiquement dans les tissus osseux et cartilagineux, en abondance dans les tissus conjonctifs lâches, et en faible quantité entre les cellules épithéliales [31].

II.1.1- Les protéines fibreuses

L'organisation structurale des tissus, y compris le soutien mécanique et la rigidité/résistance, et l'élasticité des tissus sont les deux fonctions principales de protéines fibreuses (collagène, élastine). Ces deux fonctions s'accomplissent respectivement par des fibres structurelles et des fibres élastiques synthétisées par ces protéines.

La famille des collagènes est parmi les protéines fibreuses productrices des fibres structurelles. Cette famille occupe un pourcentage important parmi les protéines constitutives du corps humain, environ 30% en masse des protéines totales chez l'homme [38]. La peau et les os sont constitués essentiellement du collagène. Les parois vasculaires, les tendons, le derme en contiennent respectivement 20-40%, 70-85% et 65-75% (en % du poids sec) [31]. Elle regroupe 28 types dont 80-90% sont représentés par les collagènes I, II, et III, ubiquitaires [39]. Le précurseur du collagène est le pro-collagène, synthétisé par les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs), les cellules endothéliales, les fibroblastes et les macrophages [40]. Cette famille comporte trois groupes : les collagènes fibrillaires, les collagènes non fibrillaires et les collagènes constituant des réseaux. Les collagènes les plus fréquents sont les collagènes fibrillaires de type I (artère, veine, os, derme...), II (cartilage), III (artère, veine...) et IV (constituant de la lame basale) [31].

Toutes les molécules de collagènes sont composées de trois chaînes polypeptidiques, ils peuvent être des homotrimères ou hétérotrimères. Ces trois chaînes contiennent la séquence Gly-X-Y (X étant le plus souvent une proline et Y une hydroxyproline [41]) (figure 7), triplet spiralé, favorisant l'assemblage de trois chaînes en triple hélice [38]. Ces triples hélices de collagène subissent avec d'autres des auto-assemblages en formant des fibrilles puis des fibres rigides et stables assurant par suite le maintien de la matrice. La rigidité des tissus augmente avec les liaisons covalentes qui s'établissent entre les fibres de collagènes par l'intermédiaire des enzymes comme la lysyl oxydase ou la transglutaminase [42].

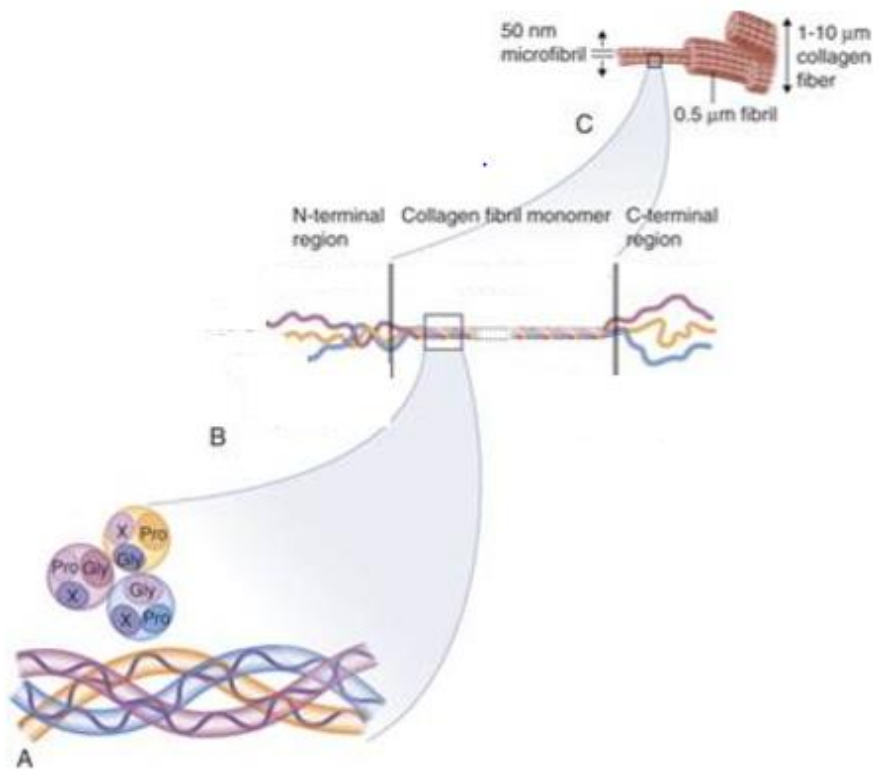


Figure 7: Composition des fibres de collagènes [43].

(A): Assemblage de trois chaînes de collagènes en triples hélice à cause de la répétition du motif Gly-X-Y. (B): Clivage des domaines N-terminal et C-terminal de la triple hélice et formation des monomères de collagènes. (C): Assemblage des monomères en microfibrilles puis en fibres de collagènes.

A côté de la fonction principale de collagène de conférer la résistance mécanique aux tissus, le collagène est également impliqué dans la l'adhésion, la différenciation, la prolifération, la migration, et l'apoptose cellulaires [44]. Par ailleurs, cette protéine présente des sites de liaison pour les FN ou les glycosaminoglycanes à travers des motifs non-collagéniques non pas formée à partir de triple hélice [45,38].

L'élastine est parmi les protéines fibreuses productrices des fibres élastiques. Ces fibres sont composées majoritairement d'élastine associée à des microfibrilles de fibrillines ou de microfibril-associated glycoproteins (MAGP). Ces fibres sont disposées en lames concentriques parallèles à la surface du tissu (figure 8), elles sont retrouvées abondamment dans les ligaments élastiques, les tissus musculaires, le cartilage élastique, les lames élastiques des grosses artères et les vaisseaux sanguins [31].



Figure 8: Représentation des lames élastiques de la matrice extracellulaire de l'aorte [31].

L'élastine est produite sous forme d'un précurseur soluble, la tropoélastine qui est formé de deux régions : la boucle élastique N-terminale qui confère aux fibres l'élasticité et la région C-terminale qui permet l'interaction des fibres avec les cellules [46].

L'élastine joue un rôle important dans l'artériogénèse. Chez la souris, l'absence d'élastine suite à une invalidation du gène de l'élastine permet une occlusion complète des artères et en conséquence la mort des souris après la naissance [47]. Chez l'Homme, la pathologie de la sténose supra-avalvulaire aortique est le résultat d'une hémizygotie du gène de l'élastine [31].

II.1.2- Les polysaccharides matriciels : glycosaminoglycanes et protéoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAGs) et les protéoglycanes (PGs) sont les deux types de polysaccharides matriciels qui assurent la fonction de résistance de la matrice et forment un réservoir de molécules biologiquement actives des tissus.

Les GAGs sont des chaînes polysaccharidiques non ramifiées, sulfatées et chargées négativement, ce sont des enchainements de motifs disaccharidiques, dont l'un des disaccharides est un glucide aminé (N-acétylglycosamine ou N-acétylgalactosamine) et l'autre un monosaccharide (acide glucuronique, acide iduronique ou galactose). Ils occupent 75% du volume de la MEC et 10% du son poids [31].

Le type de liaison entre les disaccharides des GAGs, ainsi le nombre et la position des groupements sulfates sont des critères essentiels de classement des GAGs en cinq groupes : les héparanes-sulfates (HS), les chondroïtines-sulfates (CS), les dermatanes-sulfates (DS), les kératanes-sulfates (KS) et les acides hyaluroniques (AH) [48] (Figure 9).

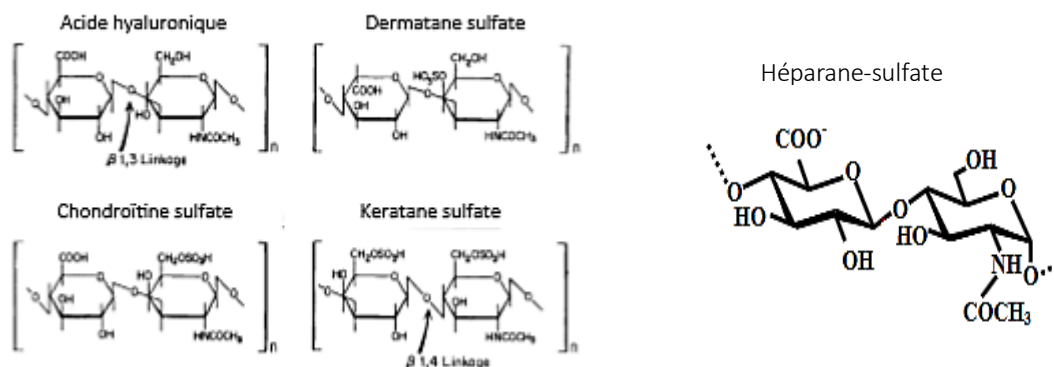


Figure 9: Représentation des motifs disaccharidiques composant les glycosaminoglycanes.

Les protéoglycanes sont composés d'un cœur protéique auquel sont liées une à plusieurs dizaines de chaînes GAGs [49]. Ils se différencient entre eux par la nature de la chaîne protéique (longueur et composition) et des GAGs constitutifs (composition et nombre de ramifications), on peut les retrouver soit sous forme libre dans la MEC (PGs matricielles), soit membranaires tels que les syndécanes (PGs à HS) [48].

Les PGs matricielles les plus répandus sont: l'aggrécane trouvé en grande quantité dans le cartilage, la décorine (CS/DS) abondant dans les tissus conjonctifs, et le perlecan (HS) dans les MB [31], et autres familles y sont représentées dans le tableau 1.

L'AH est un GAG non sulfaté, ce qui ne lui permet pas d'établir des liaisons covalentes avec des protéines et par suite on ne peut pas le trouver sous forme de PGs contrairement aux autres GAGs (HS, CS, DS et KS). La charge négative des molécules des GAGs (groupes sulfatés et carboxylates) les rend d'un part capable de fixer des molécules d'eau, d'augmenter leur rayon hydrodynamique, permettant par suite d'occuper une espace importante dans la matrice en fournissant une résistance aux forces de compression et un réservoir à eau et molécules bioactives et d'autre part de charger les PGs négativement et les rend des molécules hydrophiles grâce à la répulsion entre les charges négatives [50]. Par ailleurs, les PGs (libres ou membranaires) ont des fonctions biologiques différentes, ils contribuent à l'organisation du MEC en réseau en interagissant avec les composants de la MEC ainsi qu'ils peuvent lier directement sur les récepteurs des facteurs de croissance comme le FGF, c'est le cas des perlécans, PGs à HS membranaires [51].

Tableau 1: Les protéoglycanes matriciels [52].

Protéoglycane	Core protéique (Kd)	Nb de chaînes de GAGs	Distribution
Aggrécan	208-220	~100 CS/DS	Secrété; cartilage
Versican	265	12-15 CS/DS	Secrété; tissus conjonctifs;aorte; cerveau
Neurocan	145	1-2 CS/DS	Secrété; cerveau
Brévican	96	0-4 CS/DS	Secrété; cerveau
Décorine	36	1 CS/DS	Secrété; tissus conjonctifs
Biglycan	38	1-2 CS/DS	Secrété; tissus conjonctifs
Perlécane	400	1-3 HS	Secrété; membranes basales; cartilage
Agrine	200	1-3 HS	Secrété; jonctions neuromusculaires
Collagène type XVIII	147	2-3 HS	Secrété; membranes basales

II.1.3- Les glycoprotéines de structure

Les interactions entre les glycoprotéines et les autres constituants de la MEC sont très nombreuses (élastine-glycoprotéines de structure, protéoglycanes-glycoprotéines de structure, glycoprotéines de structure-collagènes). Ces interactions contribuent à la mise en place et au maintien de la cohésion tissulaire.

Par définition, les glycoprotéines de structure sont des protéines sur lesquelles sont greffées de courtes chaînes glucidiques, leur distribution tissulaire diffère entre ces protéines, les uns sont ubiquitaires comme la FN, d'autres spécifiques d'une localisation déterminée comme les laminines des MB. Toutes les glycoprotéines présentent des sites de fixation aux cellules via des récepteurs spécifiques tels que les récepteurs contenant la séquence Arg-Gly-Asp (RGD) qui sont les plus fréquents, ou via les Ig ainsi que d'autres sites d'interactions avec les autres macromolécules extracellulaires [47].

On peut distinguer deux types de glycoprotéines, celles qui sont solubles dans les liquides biologiques et celles qui sont liées aux cellules et/ou incorporées dans des réseaux matriciels insolubles appelées matricielles dont chacune de ces molécules a une localisation et un rôle spécifique (tableau 2). A côté de leur capacité à la formation des réseaux complexes, les glycoprotéines matricielles peuvent encore déclencher plusieurs voies de signalisation par des liens établis avec des différents facteurs de croissance [48].

Tableau 2: Exemples des glycoprotéines solubles et matricielles [48].

Glycoprotéines solubles	Glycoprotéines matricielles
Fibronectine	Fibronectine
Vitronectine	Vitronectine
Fibrinogène	Laminine
Facteur Von Willebrand	Thrombospondine
Immunoglobulines	Ostéopontine
	Ténascine
	Fibrine
	Fibrilline

Elles sont caractérisées par leur complexité (poids moléculaire de plusieurs Da) et leur structure organisée en modules repliés individuellement (figure 10), dont on trouve des séquences d'acides aminés permettant leur auto-assemblage et/ou la liaison de ces molécules avec d'autres protéines [52].

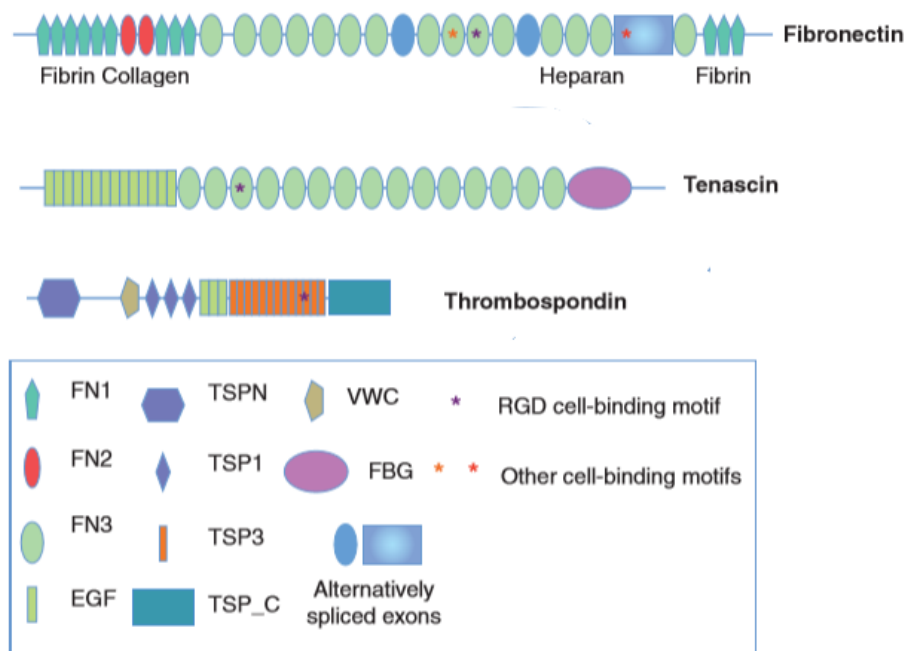


Figure 10: Exemples de glycoprotéines de structure de la MEC [52].

Schéma représentative de trois glycoprotéines : Fibronectine, Tenascin et Thrombospondin. Ces glycoprotéines sont composées de plusieurs modules (domaines) illustrés par des différentes formes géométriques et sont spécifiques d'interactions avec d'autres molécules.

II.1.4- Les protéines associées à la matrice

Les protéines associées à la matrice correspondent à des différents enzymes responsables de la structuration et le renouvellement de la MEC, et à des molécules biologiquement actives (MBA) stimulatrices ou inhibitrices de certains comportements cellulaires.

Les enzymes associées à la matrice peuvent modifier la MEC soit par le processus de pontage via des enzymes liantes ou ligases, soit par le processus de dégradation via des enzymes dégradantes (protéases).

La fonction essentielle des ligases est de créer des liaisons covalentes entre les molécules. La transglutaminase (TGase) et la lysyl oxydase (LOX) sont des exemples de ligases qui permettent le pontage entre les fibres de collagène et les fibrillines [54,38]. La TGase catalyse la formation de liaisons peptidiques entre la lysine et le glutamate alors que la LOX catalyse la liaison entre deux fonctions aldéhydes ou entre l'aldéhyde et la lysine. Ces enzymes permettent la communication entre les cellules et la matrice environnante en jouant le rôle de récepteur membranaire de protéines d'adhérence et de molécules matricielles [55,56]. Par ailleurs, l'action protéolytique des enzymes dégradantes autorise le déplacement des cellules au sein de la MEC, la libération des facteurs de croissance et le renouvellement de la MEC. Leur mode d'action et leur fonction dépend de l'activité de leur site actif : les

métalloprotéases matricielles et métalloprotéases transmembranaires fonctionnent dépendant d'ion métallique zinc, calcium et manganèse, la fonction d'ADAMs et d'ADAMTs dépendent du zinc, les Sérine protéases clivent autour des résidus sérines alors que la cathepsine possède des mécanismes d'action variés et ne fonctionne qu'à pH basique.

Les molécules bioactives liées à la matrice sont désignées encore sous le nom de crynopectines, n'affectent pas la MEC structurellement mais plutôt fonctionnellement à travers soit l'inhibition ou la stimulation de la croissance, la prolifération ou la différenciation cellulaire.

Les crynopectines sont de deux sortes : Les crynopectines de type I comme le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) et le TGF β (Tissue Growth Factor β), et les crynopectines de type II tels que le TGF α (Tissue Growth Factor α) et l'EGF (Epithelial Growth Factor) [48].

II.2- Interactions entre la membrane extracellulaire et les cellules

La MEC, dynamiquement et constitutionnellement, est très diversifiée. Elle régule le comportement cellulaire via des interactions effectuées entre ses molécules constitutives et les cellules environnantes. Ces interactions sont médiées par des récepteurs transmembranaires spécifiques exprimés à la surface cellulaire.

Les intégrines représentent une famille de récepteurs transmembranaires spécifiques des molécules matricielles. Ce sont des hétérodimères composés de deux sous-unités α (18 sous-unités) et β (8 sous-unités) liés entre elles par des liaisons non covalentes, et sont répartis différemment entre les tissus et les cellules de l'organisme [57,58]. La classification des Ig se base soit sur l'association entre les sous-unités α et β (figure 11 A) soit sur la nature de la séquence reconnue dans la matrice (les séquences RGD sont reconnues par les Ig α_v , α_5 , α_8 et α_{IIb}) (figure 11 B). Cette association confère aux Ig la caractéristique de la spécificité d'affinité au ligand comme dans le cas de l'Ig $\alpha_5\beta_1$ qui reconnaît spécifiquement la FN. La FN ou autres ligands peuvent se lier à des différents récepteurs cellulaires, tel que la FN qui est reconnue par $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ (spécifique aux plaquettes) et $\alpha_M\beta_2$ (spécifique aux leucocytes) [58].

Les Ig sont composées de trois parties : une partie extracellulaire de liaison du ligand extracellulaire, une partie transmembranaire et une partie cytoplasmique de liaison des partenaires intracellulaires (sauf β_4) [56]. Cette structure permet aux Ig d'accomplir leur rôle d'adhérence cellule-cellule ou cellule-matrice (Figure 12).

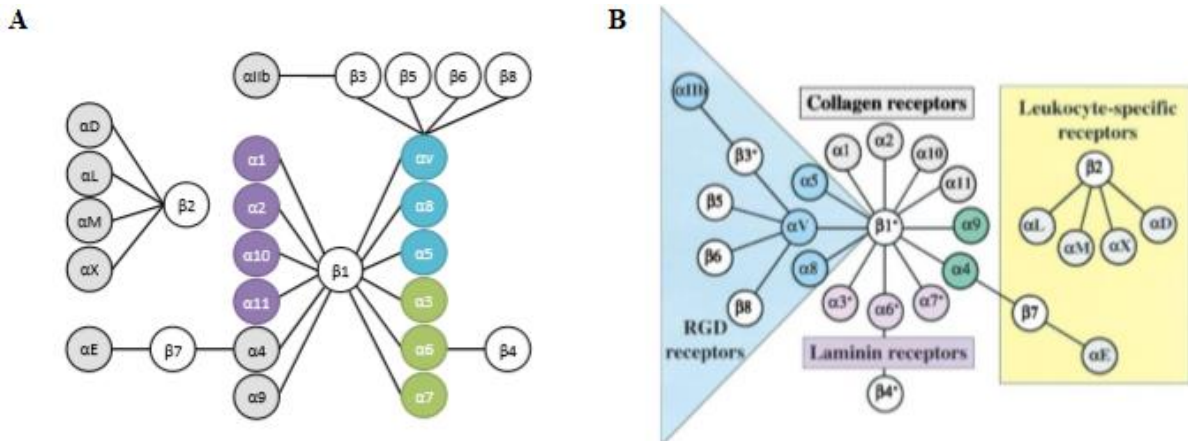


Figure 11: Schéma de la classification et les récepteurs des intégrines.

(A) schéma représentant la classification des intégrines en fonction de l'association des sous-unités α et β . Le bleu représente les intégrines liant la séquence RGD, le violet représente les intégrines liant les collagènes, le vert représente les intégrines liant les laminines [56]. (B) La famille de récepteurs des intégrines [59].

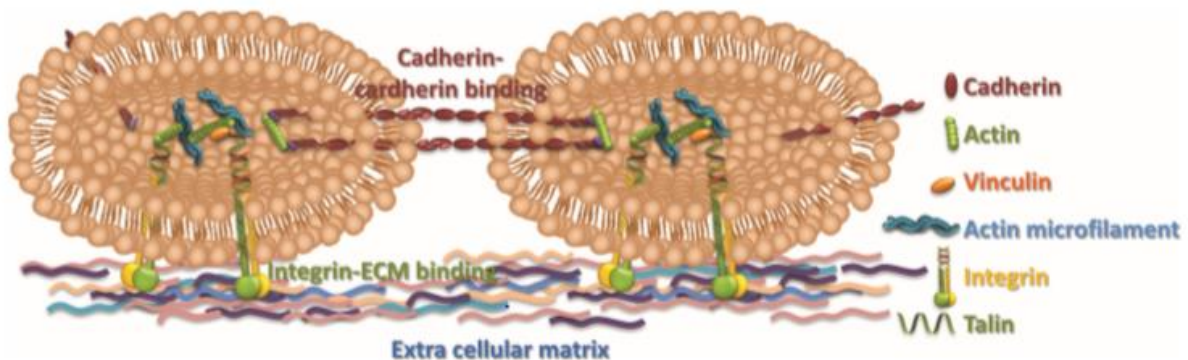


Figure 12: Schéma représentative des interactions cellule-MEC, cellule-cellule [60].

L'adhésion cellule-matrice s'effectue par la participation des Ig à la constitution des structures d'adhérence nécessaires pour la stabilisation et le renforcement des sites d'ancrage à la matrice et l'initiation de la signalisation intracellulaire.

La formation des structures d'adhérence nécessitent le recrutement de trois types de molécules sur la face cytosolique suite à l'interaction du ligand avec l'Ig (figure 13) [61]:

- les protéines de structure (Taline) : lient l'actine du cytosquelette à la partie cytoplasmique des Ig.
- les protéines adaptatrices (Vinculine, α -actinine): servent d'un moyen de consolidation de la liaison entre les protéines de structure et l'actine,
- les protéines de signalisation (Arp2/3, FAK, Rho GTPases) : responsables, par leur activités catalytiques, de la polymérisation de l'actine et par suite de la mise en place

de voies de signalisation comme la voie des MAP Kinases et les voies des remaniements du cytosquelette actino-myosinique [56].

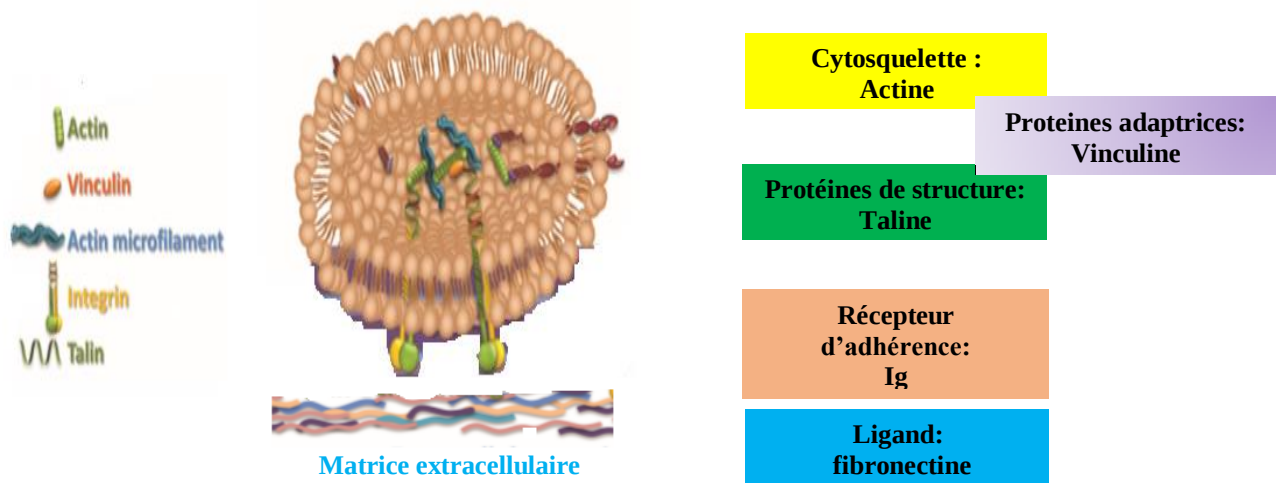


Figure 13: Schéma représentative des structures d'adhérence.

Les littératures ont décrit généralement trois types de structure d'adhérence qui se différencient par leur localisation et leur morphologie mais elles ont comme point commun la composition moléculaire de base (Figure 14) [63,64]:

- Les complexes focaux (moins de 1 μm de diamètre) : localisés à l'extrémité des cellules et des protubérances membranaires. Ils sont plus stables que les contacts focaux.
- Les contacts focaux (1 à 5 μm de diamètre) : localisés à l'extrémité des faisceaux d'actine à la périphérie des cellules. Leur organisation est sous forme de tiret.
- Les adhésions fibrillaires (plus de 5 μm de long): localisées au centre de la cellule. On ne les trouve pas dans des cellules en migration, et on peut les distinguer par les larges fibres de stress disposées parallèlement aux fibres de FN sous-jacentes à la cellule.

On peut trouver dans ces structures d'adhérence plus de 150 molécules différentes recrutées selon des propriétés moléculaires, structurales et mécaniques spécifiques de l'environnement [64].

Le versican, le plus gros protéoglycane de la paroi vasculaire, induit l'adhésion cellulaire, la prolifération et intervient lors de la migration cellulaire [65]. La FN, a des rôles importants dans l'adhérence cellulaire, l'activation des voies de transduction du signal, la modification du comportement cellulaire, et l'intervention dans l'embryogenèse et dans des différents processus physiologiques [67,68], les laminines encore contrôlent l'adhésion, la prolifération,

la différenciation et la polarisation des cellules. Alors, tous ces exemples et autres montrent l'importance des interactions entre le compartiment extracellulaire et le compartiment intracellulaire dans l'orientation des fonctions cellulaires.

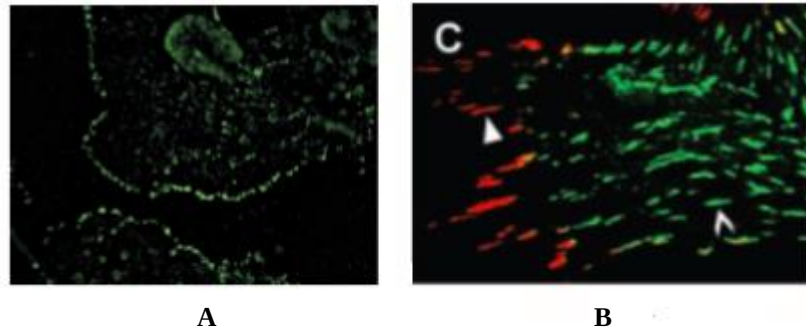


Figure 14: Image des différents types de structure d'adhérence par microscopie à fluorescence [62].

(A) les complexes focaux localisés à l'extrémité des cellules. (B) triangle blanc : les contacts focaux localisés à la périphérie des cellules et représentés en rouge par le marquage de la paxilline, flèche blanche : les adhésions fibrillaires localisées au centre de la cellule et représentées en vert par le marquage des intégrines $\alpha 5$.

II.3- Intérêt des cellules souches mésenchymateuses en médecine régénérative

La MR a été déjà défini comme une combinaison de la thérapie cellulaire et de l'IT, son objectif principal est le traitement des pathologies humaines graves et la régénération des tissus, et tout développement concernant cette nouvelle médecine est basée sur la compréhension des différents processus biologiques exigés dans le fonctionnement des cellules et des tissus. Aujourd'hui le terme de MR est associé à un type de cellules qui suscite des intérêts grandissants : les cellules souches. Le terme de « cellule souche » CS (« stem cell » en anglais) est mentionné depuis 1883 [68]. Ces cellules présentent trois propriétés les différencient des autres types :

- 1- Elles sont des cellules indifférenciées.
- 2- Elles possèdent la propriété d'auto-renouvellement.
- 3- Elles ont la capacité de différenciation (transformation en cellules spécialisées) dans certaines conditions.

Parmi ces CS, les cellules souches dites mésenchymateuses (CSM) représentent un outil thérapeutique attrayant capable de jouer un rôle dans un large range d'applications cliniques dans le contexte des stratégies de thérapie cellulaire et de thérapie génique. Cependant, les CSM présentent des inconvénients résidants dans leur mode d'obtention ainsi que dans le temps de leur utilisation. En fait, les CSM issues de tissus adultes peuvent entrer en phase de sénescence à partir du lancement de la culture cellulaire in vitro et par suite, une perte des

caractéristiques de CS a été signalé [69]. De ce fait, les cliniciens devraient utiliser les CSM dans des phases précoces de la culture.

II.3.1- Historique des CSM

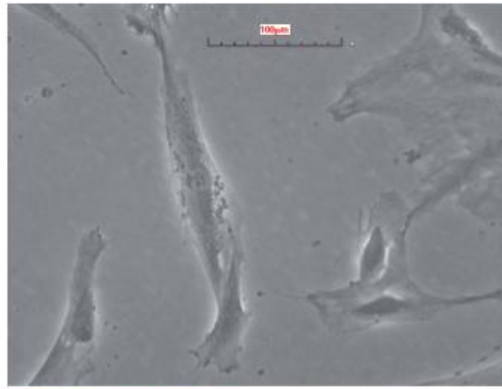
Il y a plus de 140 ans que Cohnheim a évoqué la réparation des lésions cutanées par des cellules d'origine médullaires ayant la possibilité d'être à l'origine d'une partie des fibroblastes dermiques. En 1960, Friedenstein a remarqué dans la moelle osseuse, après une série d'études, une colonie cellulaire adhérente au plastique et d'allure fibroblastique capable de se proliférer, de se différencier en ostéoblastes in vivo, et de participer au soutien de l'hématopoïèse. Ce qui permet à Friedenstein de lancer une définition fonctionnelle des progéniteurs mésenchymateux : Colony Forming Unit-fibroblasts ou **CFU-F** (les unités formant des colonies fibroblastiques) [70]. Owen a montré en 1988 que cette population présente les propriétés d'une CS notamment l'autorenouvellement et la différenciation [71]. Finalement, en 1991, et après la mise en évidence des aptitudes de différenciation ostéoblastique, chondrocytaire et adipocytaire de cette population, Caplan a proposé la dénomination de « **cellules souches mésenchymateuses** » (CSM) et a souligné le potentiel thérapeutique de l'utilisation de ces cellules dans la réparation squelettique [72]. Une série de découvertes au sujet de CSM s'alternent, y compris leur faible immunogénicité, leur capacité de migration vers le tissu lésé, et le plus important leur modulation de fonctionnement des cellules voisines, confirmant par suite l'intérêt de ce type de cellules en thérapeutique et permettant encore une imagination de nouvelles potentialités thérapeutiques jour après jour. Aujourd'hui ces caractéristiques et autres non cités amènent à moduler plusieurs processus cellulaires tels que la mort cellulaire, la réponse immune ou encore la cicatrisation [70].

II.3.2- Définition et localisation des CSM :

En IT, il apparaît essentiel de choisir des sources alternatives des cellules réparatrices ayant un potentiel thérapeutique adapté afin de les associer après aux biomatériaux. Dans ce contexte, les CSM sont d'un intérêt spécifique et remarquable dans la MR du fait de leurs caractéristiques particulières.

Trois critères de caractérisation des CSM ont été proposés en 2006 par la Société internationale de thérapie cellulaire (ISCT) [73]:

- 1- l'adhérence des cellules au plastique de culture (figure 15).



Grossissement oculaire x objectif : 200.

Figure 15: Apparence fibroblastique des CSM en culture observées en microscope [70].

- 2- un phénotype cellulaire commun déterminé par cytométrie en flux en se basant sur un panel d'antigènes de surface (Tableau 3).
- 3- l'aptitude à se différencier *in vitro* en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes (figure 16).

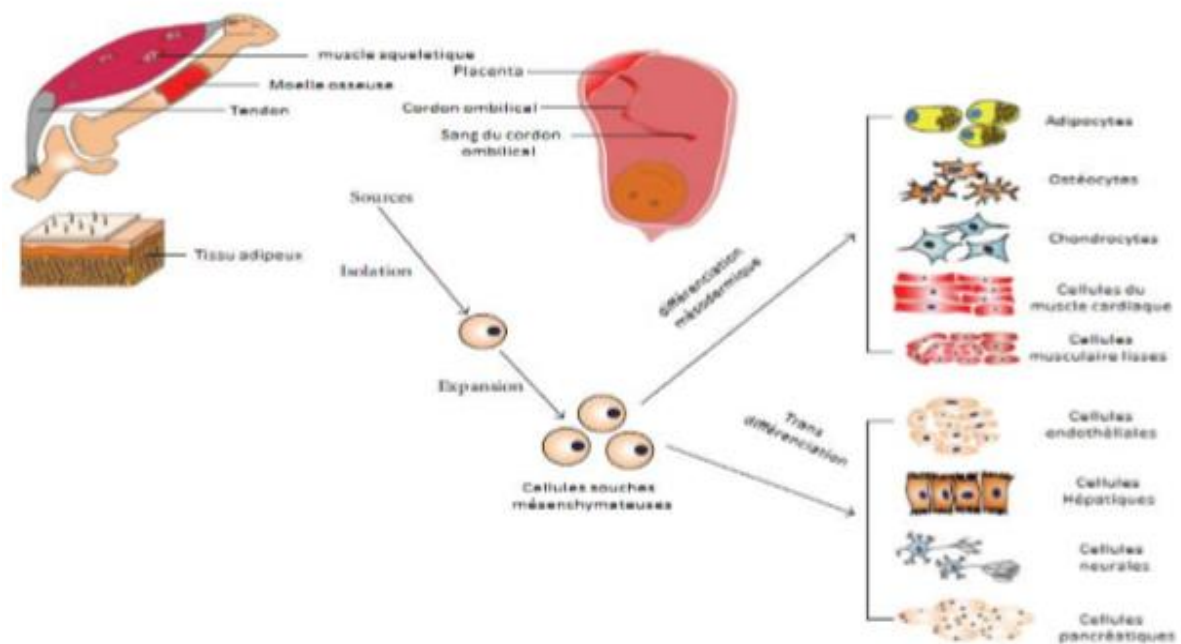


Figure 16: la multipotence des CSM [69].

Les CSMs isolées de nombreux tissus et organes ont le potentiel de se différencier en des lignées mésodermiques comme les adipocytes, les ostéocytes et les chondrocytes, et peuvent aussi transdifférencier en cellules de certaines couches de lignées germinales comme les cellules du muscle cardiaque, des cellules musculaires lisses, les cellules hépatiques, les cellules neurales, les cellules endothéliales et les cellules pancréatiques.

Tableau 3: Marqueurs des CSM en cytométrie de flux [74].

Ces marqueurs regroupent un panel d'antigènes de surface dont l'expression est positive et un autre dont l'expression est négative.

Antigènes présents à la surface des CSMs ($\geq 95\%$)	propriété	Antigènes absents de la surface des CSMs ($\leq 2\%$)	propriété
CD105	SH2, endogline	CD45	Marqueur leucocytaire
CD73	SH3, ecto5'nucléotidase	CD34	Progéniture hématopoïétique/cellules endothéliales
CD90	Thy-1	CD14 ou CD11b	Monocytes et macrophages
CD271	Récepteur de faible affinité au NGF	CD79α ou CD19	Lymphocytes B
CD106	VCAM-1	HLA-DR	En l'absence de stimulation par l'interféron γ
CD54	ICAM-1		
CD29	ITGB1		
CD44	Récepteur à l'acide hyaluronique		

En plus des standards de caractérisation des CSM proposés par L'ISCT, cette société a précisé encore des critères immunologiques des CSM, auxquels devraient répondre ces cellules en ce qui concerne les applications cliniques [75].

Alors les CSM, qui sont identifiées par leur apparence fibroblastique, sont d'origine mésodermique et sont décrites au niveau de la moelle osseuse (MO) mais elles ont été isolées encore à partir de nombreux tissus et organes. L'origine des CSM affecte bien leur potentiel de différenciation [76] et leur profil d'expression génique [77] dont l'expression de nombreux marqueurs (antigènes) exprimés à la surface membranaire de ces cellules varie en fonction de l'origine tissulaire [78].

Les CSM ont été isolées à partir de la MO pour la première fois en 1976. Ensuite, et depuis leur isolement au sein de la MO, ces cellules ont été isolées à partir d'une multiplicité de sources adultes telles que le tissu pulmonaire, le tissu adipeux, le tendon, la membrane synoviale mais aussi des sources fœtales comme le placenta ou le cordon ombilical (Figure 17).

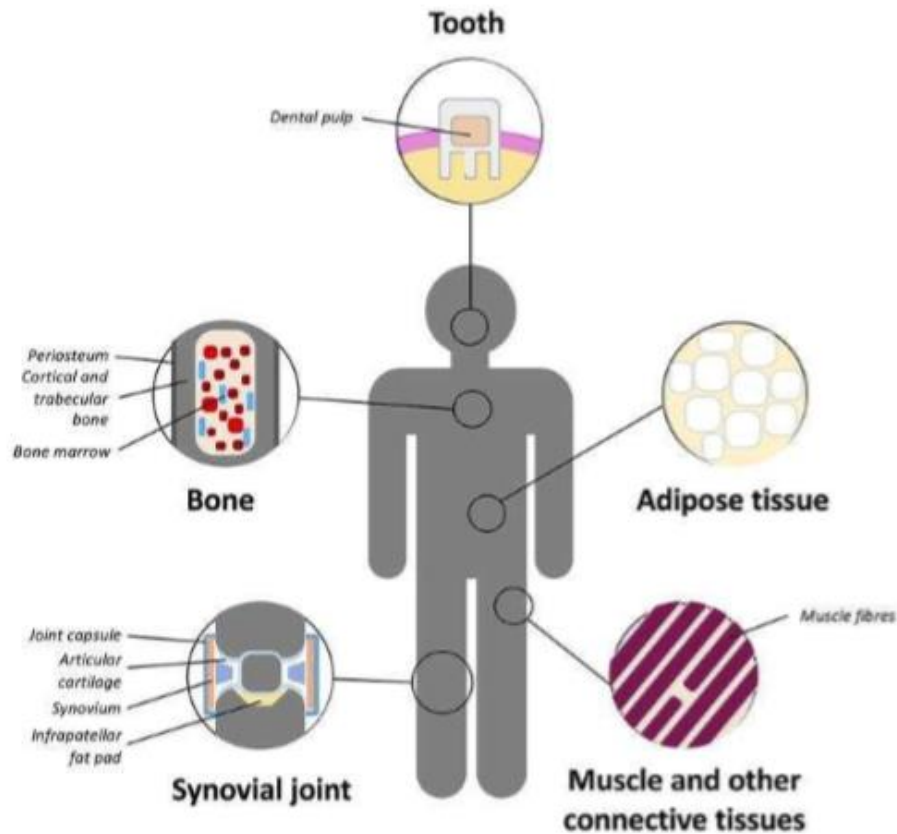


Figure 17: Principales sources adultes de CSMs [79].

La moelle osseuse, le tissu adipeux, le tissu synovial, le muscle squelettique, la pulpe dentaire, le système circulatoire, le cœur, le cerveau et d'autres tissus conjonctifs.

Alors, les CSM ont été isolées tout d'abord des tissus squelettiques vascularisés tels que la MO et le tissu osseux, où elles ne représentent qu'une faible proportion de la population totale des cellules mononuclées [80]. Ensuite, à partir du tissu adipeux qui pourrait servir d'excellente source de CSM du fait qu'elles sont 100 à 1000 fois plus abondantes que dans la moelle où elles possèdent un taux de prolifération élevé lors de l'expansion in vitro avec une capacité de différenciation multiple [82,83,84], ainsi à partir du cartilage (non vascularisé). Et après, elles ont été isolées à partir d'autres tissus tels que les tissus ophtalmologiques comme le trabéculum [84] et le limbe [85], le sang du cordon ombilical [78] ou menstruel [86], ou encore au niveau de la pulpe dentaire [87]. Ainsi, autres tissus comme le liquide synovial, la gelée de Wharton du cordon ombilical, le tissu fœtal, la veine ombilicale, le périoste, le

système vasculaire, les muscles [69] et autres exemples contiennent également des CSM. En plus, et selon les critères d'identification de l'ISCT [73], les CSM ont encore une localisation périvasculaire [88].

Les CSM sont trouvés dans la MO en faible nombre [89], elles sont physiologiquement quiescentes et présentent un faible taux de renouvellement in vivo [90]. Ces cellules possèdent in vitro une forte multiplication après l'adhérence au support plastique de la culture, ainsi une durée de vie assez limitée [91]. La vie des CSM est limitée soit à cause de l'engagement précoce de ces cellules dans des lignages de différenciation, soit à cause qu'elles entrent en phase de sénescence qui est caractérisé par la manque d'activité télomérase [92].

II.3.3- Spécificités et intérêt des CSMs en médecine régénérative

Du fait de l'ensemble des spécificités qu'elles présentent, les CSM apparaissent prometteuses de nombreux études et essais cliniques quant à la réparation et la régénération de tissus, ce qui leur permet d'abord d'occuper une place importante dans la MR, et de constituer un enjeu majeur dans des perspectives de développement clinique.

En premier lieu, certaines études ont montrées que les conditions environnementales où se trouvent les CSM, sont les facteurs principaux de déterminer leur phénotype, leur morphologie, et leur marqueurs membranaires spécifiques. L'importance biologique de différents types de ces cellules réside dans les molécules de la surface cellulaire qui, d'une part les caractérisent et distinguent, d'autre part sont responsables de leurs propriétés fonctionnelles, y inclus l'adhésion cellulaire, la signalisation cellulaire, l'activation du récepteur et autres fonctions spécifiques des CSM. Citons parmi ces marqueurs : les protéines ancrées à glycosylphosphatidylinositol (GPI) : le CD73 (ecto-5'-nucléotidase) et CD90 (Thy1), les molécules de transduction du signal dans le système immunitaire humain et les médiateurs des interactions cellule-cellule et cellule-matrice, les molécules d'adhésion CD106 (VCAM-1) et CD166, CD105 (endogline), une intégrine et une molécule de fixation de TGF- β , CD29 (intégrine β 1) impliqué dans la migration des cellules souches mésenchymateuse et le récepteur CD44 (récepteur hyaluonane)...[69].

En deuxième lieu, un rôle de CS et un rôle dans la niche de la MO sont exercés par les CSM. Le premier rôle a pour objectif principal le renouvellement physiologique de cellules constitutives spécifiques des tissus squelettiques, pas seulement dans les cas normales mais encore en cas d'atteinte tissulaire [72]. Le deuxième rôle physiologique vise à assurer un

support physique et nutritif de maintien et de contrôle des CS du point de vue de nombre et destin [93].

Par définition, une niche est composée d'une partie cellulaire (CS et cellules stromales) et d'une partie non cellulaire (la MEC), elle présente des vaisseaux sanguins et des neurones permettant la régulation de la mobilisation des CS. La fonction de ce microenvironnement est le contrôle des comportements cellulaires tels que la mobilisation, l'auto-renouvellement, la différenciation, expansion, apoptose et quiescence [95,96] (figure 18). La teneur en oxygène est un facteur essentiel dans la composition de cette niche. l'équipe Nékanti et al., a révélé une faible teneur en oxygène (hypoxie) dans le microenvironnement de nombreuses CS adultes à des stades précoces du développement et des cellules souches embryonnaires, ainsi cette équipe a montré que les CSM de la Gelée de Wharton présentent une meilleure prolifération dans des conditions d'hypoxie, tout en conservant l'expression des marqueurs de surface et leur potentiel de différenciation en des différentes lignées [96].

Les CSM ont initialement été décrites dans la MO, qui après la compréhension progressive de sa physiologie et de la nature des cellules qui la composent a permis de développer la connaissance sur les fonctions des CSM médullaires et surtout sur les niches des cellules souches hématopoïétiques (CSH).

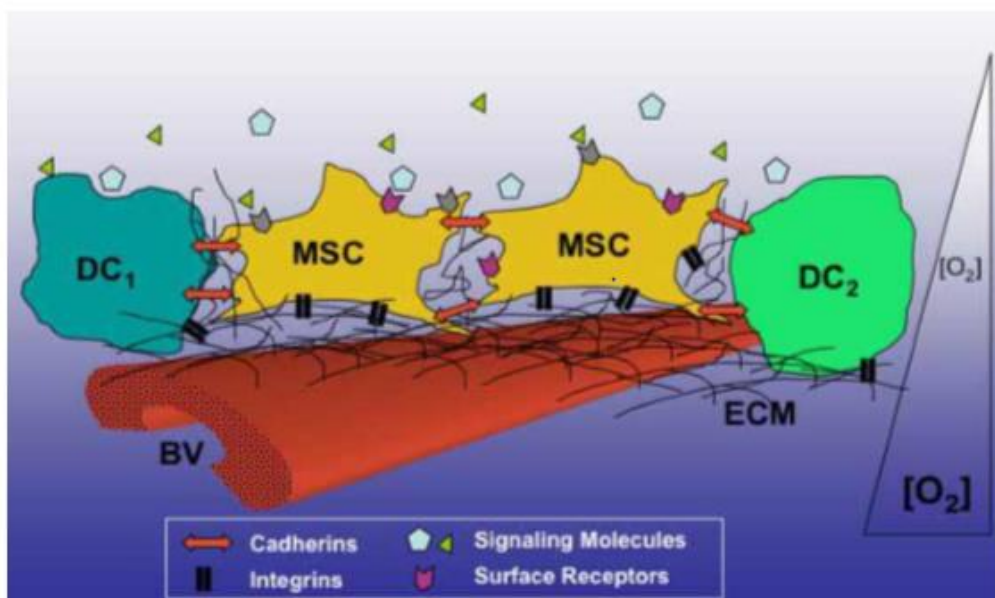


Figure 18: Schéma représentant la niche des cellules souches mésenchymateuses [69].

[O₂] = Concentration de l'Oxygène relative des CSM, DC = Cellule différenciée, ECM = Matrice extracellulaire, BV = Vaisseaux Sanguins.

La niche des CSH, dans la MO, est composée majoritairement des CSM où elles présentent un rôle prédominant en recevant les messages afférents des nerfs adrénergiques [96,98], et contribuent d'un côté au recrutement des cellules hématopoïétiques matures [98] et au

contrôle de la différenciation des CSH d'un autre côté. Ainsi, il a été identifié que les CSM jouent un rôle intermédiaire, via les lymphocytes CD8+, L'IFN- γ et l'IL-6, dans la différenciation et le recrutement des progéniteurs hématopoïétiques [99]. En plus, Chao Shi et al. ont montré que les CSM médullaires qui expriment des récepteurs TLR (Toll-Like receptor) sont impliquées, en cas d'une infection, dans le recrutement de monocytes vers la circulation systémique à travers la sécrétion de CCL2 [100]. D'autres rôles sont identifiés encore pour les CSM, par exemple l'identification du leur rôle dans le contrôle de l'hématopoïèse, ainsi leurs différents rôles dans la formation/réparation/renouvellement en tant que CS, ce qui constitue un enjeu majeur dans le développement clinique.

Les effets bénéfiques globaux de l'utilisation des CSM tellement décrits dans différents contextes pathologiques proviennent des propriétés et des mécanismes spécifiques de CSM, où dans la plupart des cas, l'intérêt majeur de ces cellules est le résultat d'une association de plusieurs mécanismes essentiels: la multipotence/différenciation, l'immunomodulation et l'activité paracrine... Ces caractéristiques émergentes occupent un atout important dans le domaine de la MR.

II.3.3.1- La multipotence/différenciation

En effet, les CSMs sont définies par leurs caractéristiques d'autorenouvellement, de prolifération [101] et de multipotence [73] (figure 19), et la trans ou retrodifférenciation [102].

La multipotence définit le pouvoir d'une cellule à se différencier en plusieurs types cellulaires issus d'un même feuillet embryonnaire (adipocytes, ostéoblastes, chondrocytes,...) [80]. Il a été observé des différenciations en neurones [104,105], cardiomyocytes [105], hépatocytes [106], cellules pancréatiques[107], l'os [108], le cartilage [109], le ligament et le tendon [110] et cellules musculaire squelettiques ou lisses [111]. L'autorenouvellement est l'aptitude d'une cellule à se diviser pendant plusieurs générations sans perdre de leur capacité de différenciation ni changement de morphologie, ces démonstrations sont mises en évidence in vitro [112], par ailleurs la capacité d'autorenouvellement in vivo n'est pas démontré que jusqu'à l'année 2007 par l'équipe de P.Bianco [113]. Alors et comme toutes les CS, les CSMs sont des cellules immatures (indifférenciées) capables de s'autorenouveler et de générer plusieurs types de cellules différenciées matures et fonctionnelles.

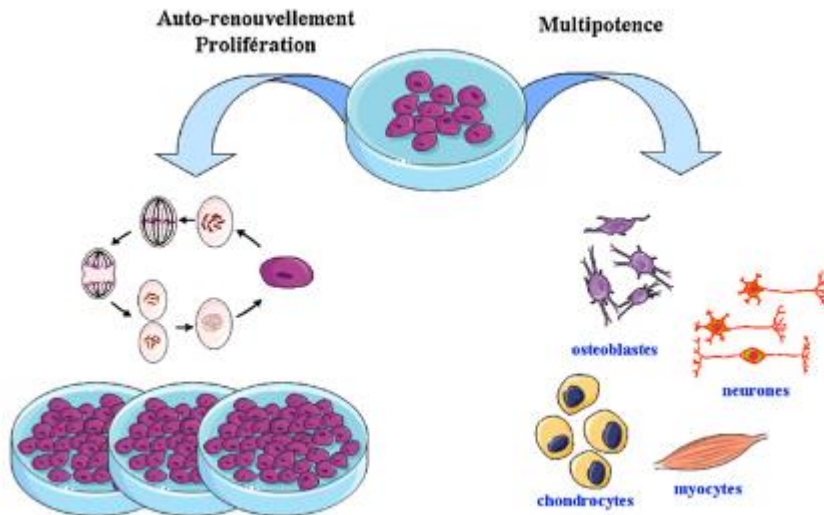


Figure 19: Caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses: l'autorenouvellement/prolifération et différenciation [5].

Alors que, la transdifférenciation ou plasticité qui a été étudié la première fois par Lakshmipathy et Verfaillie (2005) [114] est définie par la capacité des CS à générer des types cellulaires spécialisés d'un autre tissu, elle a été observée et décrit dans plusieurs types cellulaires (figure 20) [115,116,117]. Elle présente deux grands intérêts : le premier est la compréhension des mécanismes déterminants le devenir des CS et l'irréversibilité ou non de l'engagement dans des lignées spécifiques cellulaires, le deuxième est la capacité thérapeutique impliquée dans les thérapies régénératives à médiation cellulaire.

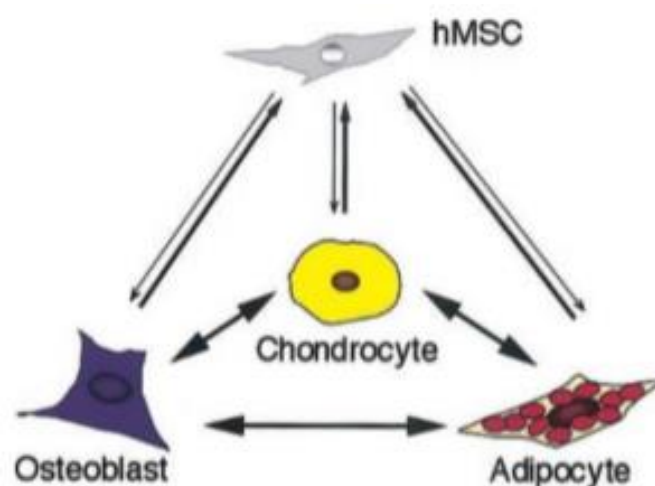


Figure 20: Schéma représentant un modèle de certains potentiels de transdifférenciation de CSMs [118].

II.3.3.2- La migration

La migration ou la capacité d'adressage vers un tissu lésé est un mécanisme existant physiologiquement, cette capacité est mise à profit en thérapeutique pour des cas des lésions tissulaires. En cas de souffrance tissulaire, l'intégration des signaux de souffrance ou des paramètres physiques générés, par exemple l'hypoxie, induit la sortie des CSMs de leur(s) niche(s) et leur migration le long d'un gradient de chimiokines dont CXCL-12 (SDF-1) [70]. Une augmentation de l'expression du cathepsine B, cathepsine D, et prohibitine et une diminution de l'expression du PAI-1 (plasminogène activator inhibitor-1) et la superoxyde dismutase manganèse permettent la régulation de la migration des cellules. Les CSMs du placenta et de la MO possèdent une capacité de migration plus grande que celles du cordon ombilical [69].

II.3.3.3- L'immunomodulation

De récentes études montrent que, suite à une infection ou une atteinte tissulaire, non seulement les cellules de l'immunité innée sont stimulées mais également les CSMs résidentes [119]. D'autres études considèrent que les CSMs sont des cellules sentinelles de l'immunité innée. Cette considération est basée sur le pouvoir des CSMs à détecter les agents pathogènes à l'intérieur de l'organisme d'un part et, à résoudre l'infection d'autre part, via leurs interactions étroites directes et indirectes avec les cellules de l'immunité innée et leur présence dans l'ensemble des tissus vascularisés de l'organisme [101,121]. Par ailleurs, leurs interactions ne sont pas limitées seulement avec les cellules de l'immunité innée (monocytes, macrophages...) mais encore avec celles de l'immunité adaptative (lymphocytes T, lymphocytes B...). Cette fonction des CSMs est mise en évidence chez des souris souffrant de la septicémie (une infection générale grave provoquée par le développement de germes pathogènes dans le sang), ces souris survivent après un traitement basé sur l'injection intraveineuse de CSMs [122,123]. Cet effet immunorégulateur ne peut pas s'accomplir par les CSMs en soi même, mais après leur exposition à des différentes cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN, le TNF, l'IL-1 α ou β et autres, qu'on les désigne sous le nom des stimuli, ce qui induit une potentialisation des CSMs [124,125,126,127]. Des études ont signalé le rôle de l'IFN- γ dans la stimulation de l'immunomodulation surtout dans l'induction de la production d'IDO par les cellules CSMs [127], d'autres ont signalé que l'effet de cette cytokine est amplifié par l'ajout de TNF- α [124,129]. Guangwen et al. ont montré que l'IFN γ seule n'induit pas une immunosuppression des Lymphocytes T (acteur de l'immunité adaptative), c'est par l'addition concomitante de l'une ou l'autre des autres cytokines avec

l'IFN γ que l'activité immunosuppressive par les CSMs se produit (figure 21 A). Cette même équipe a montré encore que les cellules CSMs attirent les lymphocytes T, mais elles ne les attirent pas qu'après l'exposition de ces cellules aux cytokines proinflammatoires dont une migration des mêmes lymphocytes T préactivés a été observée en co-culture après un prétraitement des CSMs avec des combinaisons diverses de cytokines. Seul le résultat de la co-culture contenant les cellules T, les CSMs, IFN γ et TNF α est représenté dans la figure 21 B, mais les mêmes co-cultures (cellules T, CSMs, IFN γ) contenant à la place de TNF α des IL-1 α ou IL- β ont donné le même résultat [129].

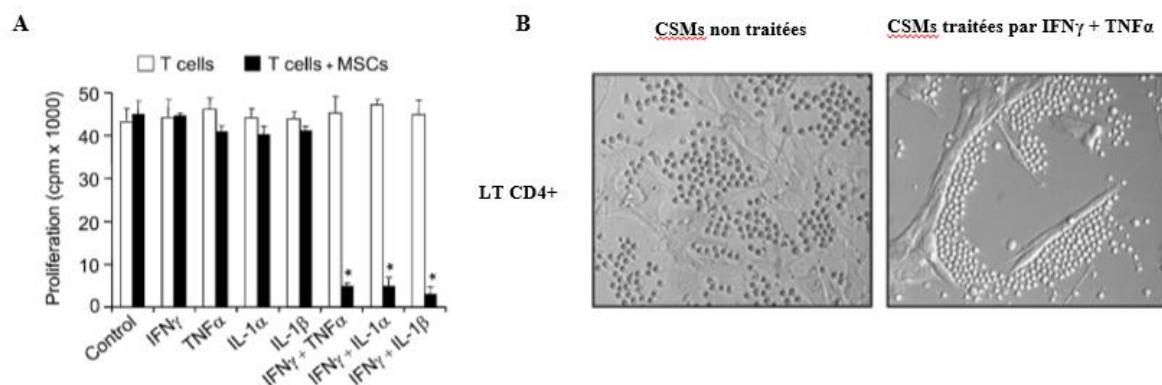


Figure 21: A) L'activité immunosuppressive des CSMs induit par des cytokines proinflammatoires. (B) La migration des mêmes cellules T à proximité de CSMs induite par les cytokines inflammatoires [129].

L'efficacité prouvée de CSMs dans diverses lésions tissulaires (lésions neuronales, myocardiques, articulaires ou musculaires) chez des différents modèles d'animaux est due à la production par ces cellules des molécules anti-inflammatoires et immunosuppressives après quelques jours, promouvant par suite la régénération du tissu de l'hôte [130]. L'intérêt des CSMs comme immunorégulateurs et médiateurs dans l'immunité provient essentiellement des molécules qu'elles produisent, ces intérêts ont été largement décrits in vitro et in vivo (Tableau 4).

La prostaglandine E2 (PGE2) [131], le TNF- α -stimulated gene/protein 6 (TSG-6) [132], l'enzyme l'indoleamine 2,3dioxygénase (IDO) [127] et le transforming growth factor (TGF- β) [133], sont des molécules immunosuppressives et possèdent plusieurs rôles bénéfiques lors des désordres immunitaires tels que l'induction de l'expression de IL-10 par les lymphocytes T régulateurs, la prolifération des cellules natural killer (NK) ou aussi l'inhibition des lymphocytes T et la maturation des cellules dendritiques (CD).

Tableau 4: Molécules essentielles sécrétées par les CSMs ayant comme cellules cibles les cellules de l'immunité innée et adaptative [74].

Molécules sécrétées par les cellules CSMs	Cellules immunitaires cibles
IDO	Lymphocytes B, T, Treg, monocytes, CD
PGE2	Lymphocytes T, macrophages, NK, monocytes, CD
TGF- β	Lymphocytes B, T, Treg, NK, macrophages, CD
VEGF	Lymphocytes Th1, Th17, Treg, CD
IL-10	Lymphocytes Th1, Treg, macrophages, neutrophiles, CD
IL-6	Lymphocytes Th2, Th17, Treg, lymphocytes B, neutrophiles, monocytes, CD
CCL2	Lymphocytes Th2, Th17, macrophages
CCL5	Lymphocytes Th1, Treg, neutrophiles, monocytes, CDs

En effet, les CSMs expriment à leur surface des Toll Like Receptors (TLRs) fonctionnelles, et plus précisément, elles expriment les ARNm des TLRs [134]. Suite à une inflammation, les TLRs sont activés et les CSMs changent leur type de réponse selon la phase d'inflammation. Pendant une phase aiguë d'inflammation, les CSMs présentent une activité proinflammatoire en empêchant les monocytes et les macrophages M1 (proinflammatoires) de se différencier en M2 (anti-inflammatoires), aboutissant par suite à une réponse proinflammatoire précoce. Dans un second temps, et lors d'une phase d'inflammation secondaire, les CSMs présentent une activité anti-inflammatoire après leurs stimulations par l'ensemble des cytokines proinflammatoires. Cette activité est contrôlée par certaines molécules immunomodulatrices notamment l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui a un rôle essentiel au cours de la différenciation de M1 en M2, ainsi au cours de l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T, ce qui engendre une réponse anti-inflammatoire tardive permettant la régénération tissulaire [130, 136].

Alors, le microenvironnement cellulaire et le contexte inflammatoire jouent un rôle clé dans la détermination du phénotype des CSMs d'une part et dans leurs effets sur le système immunitaire d'autre part. Les CSMs présentent une plasticité marquée, exerçant des phénotypes pro- et anti-inflammatoires dépendants des stimuli environnementaux [124]. En équilibrant le phénotype activant ou suppressif, les CSMs peuvent jouer un rôle central dans la régulation du contrôle immunitaire et la réparation et la régénération tissulaire. Ainsi, en fonction du microenvironnement, les CSMs sont capables de moduler la réponse des cellules immunitaires du système immunitaire inné et adaptatif (figure 22).

La facilité à proliférer dans la culture et la capacité immunosuppressive, sont les deux caractéristiques essentielles des CSMs qui les confèrent un potentiel clinique considérable. Plusieurs maladies ont été traitées avec succès en utilisant les CSMs telle que cirrhose du foie [136], la maladie de Crohn [139, 140] et le sclérose en plaque [141, 142]. En plus ces cellules, dans des cas de suractivation des systèmes immunitaire et inflammatoire, sont utilisées pour traiter des différentes pathologies telles que les pathologies auto-immunes (syndrome de Gougerot-Sjögren [141], encéphalite auto-immune [142], les pathologies inflammatoires chroniques (colite ulcéreuse) [143], maladie de Crohn [144], et les réactions du greffon contre l'hôte (GvHD) [147– 150].

En effet, L'activité immunosuppressive des CSMs a été prouvé particulièrement lors du traitement de la maladie du greffon contre l'hôte qui se caractérise par une destruction des tissus du receveur reconnus comme intrus par les cellules immunitaires présentes dans le greffon. Plusieurs études ont montré cette activité, une d'elles a révélé une inhibition de la réaction aigue de la GvHD chez des patients ayant reçu une transplantation allogénique de CSH et résistants aux stéroïdes, ce qui montre l'efficacité des CSMs [146], une autre étude clinique plus récente, a conduit encore aux effets prometteurs de l'injection des CSMs chez un groupe de 37 enfants atteint d'une GvHD aigue et résistants aux stéroïdes [148].

The Innate Immune System

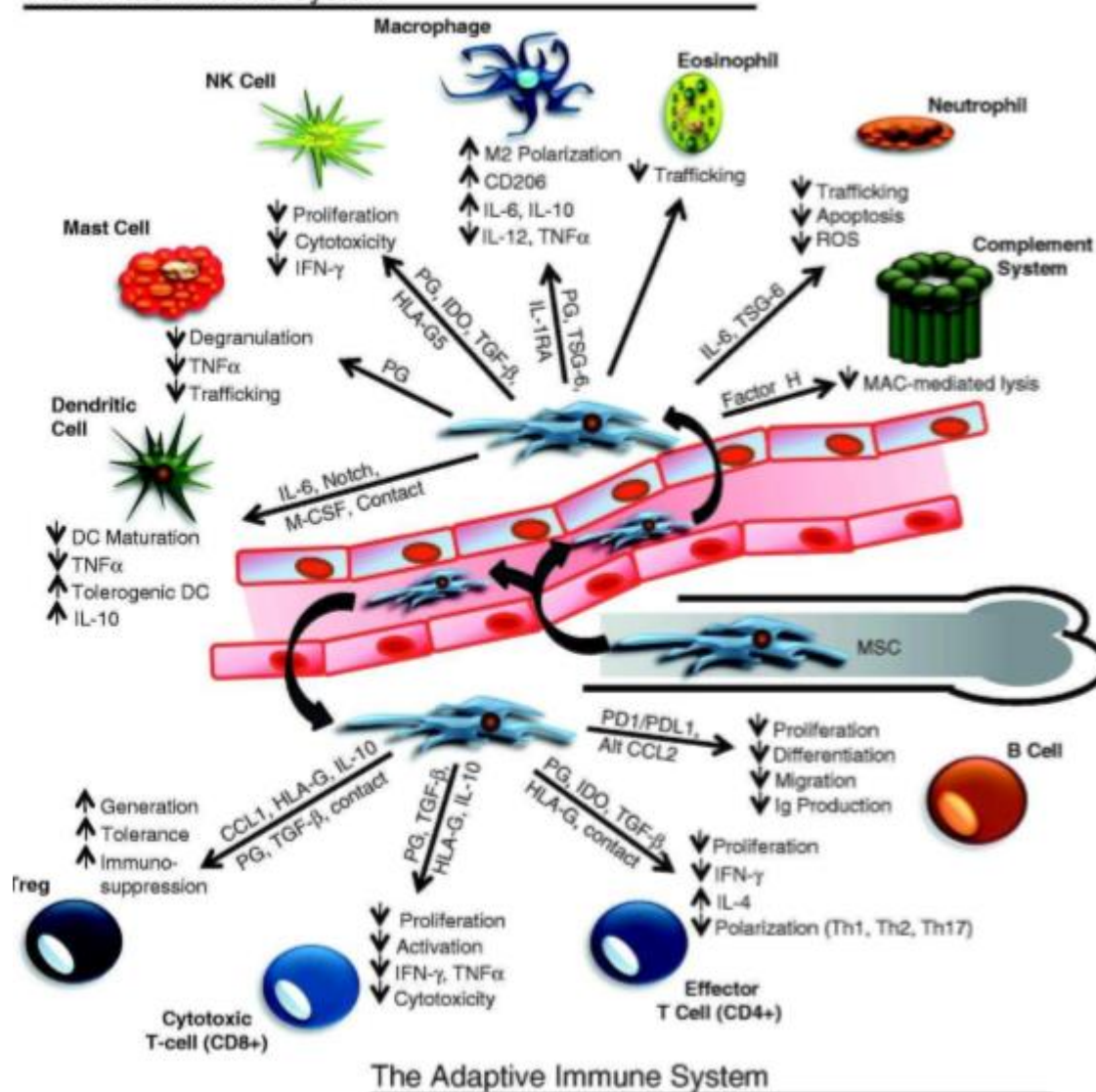


Figure 22: Propriétés immunosuppressives des CSMs de système immunitaire inné et adaptatif [149].

II.3.3.4- L'activité paracrine

Les molécules sécrétées par les CSMs (facteurs de croissance, cytokines, chimiokines), appelés encore sécrétome, sont responsables de plusieurs fonctions importants comme la réparation tissulaire, l'homéostasie, résolution de différents pathologies et autre. Cette activité paracrine a été mise en évidence par plusieurs études récentes qui travaillent dans le domaine de la thérapie cellulaire et utilisent les CSMs en tant que la source cellulaire efficace. Elle a montré des effets bénéfiques dans différents processus tels que : la prolifération des cellules souches endogènes, l'angiogenèse, l'activité neuroprotectrice.

Plusieurs travaux ont abordé le mécanisme de la prolifération des CS endogènes surtout au sein de l'organe endommagé en concentrant sur le rôle des CSMs dans la régénération et la réparation tissulaire. Dans un cas d'une congestion cérébrale, une étude montre la capacité

des CSMs à stimuler la prolifération de CS neurales résidentes chez le rat, en augmentant significativement le taux de prolifération [150]. Dong et al., décrivent, à la suite d'un infarctus aigu du myocarde, la réparation tissulaire médiée par les CSMs via la chimiokine CXCL12 stimulatrice de recrutement des cellules progénitrices cardiaques [151]. Et dans un modèle de glaucome, une étude récente de Manuguerra et al. montre, que chez des souris glaucomateuses ayant reçu une injection de sécrétome des CSMs, une régénération du trabéculum de l'œil est favorisée en activant la prolifération des CS endogènes latentes [152].

Un autre mécanisme, l'angiogenèse, qui est définie comme un processus physiologique de restauration des vaisseaux sanguins, semblerait important dans la réparation et dans la restauration de la fonction d'un organe via les CSMs qui possèdent un pouvoir angiogénique d'un grand intérêt. C'est surtout le sécrétome des CSMs qui est responsable de ces effets, il contient un panel de molécules et de facteurs agissant sur l'angiogenèse : le placenta growth factor (PLGF), FGF-2, VEGF, angiopoïétine-1 (Ang-1), la protéine cysteine-rich, angiogenic inducer 61 (Cyr61), Il-6, CCL2,...[121,154–158]. Les étapes de l'angiogenèse sont affectées par le sécrétome des CSMs, à partir du recrutement des cellules endothéliales en promouvant leur migration [158] et leur prolifération [153] jusqu'à l'étape de la préservation et la stabilisation des vaisseaux néoformés en jouant un rôle similaire des péricytes [159].

Les pathologies d'origine ischémiques sont caractérisées par une baisse de l'apport sanguin artériel à un organe ou tissu, d'où l'importance de l'activité angiogénique des CSMs dans le traitement de telles pathologies. A. Bura et al. ont utilisés des CSMs dérivées du tissu adipeux pour traiter 7 patients présentant une ischémie critique de membre, les résultats ont montré une amélioration des ulcères en restaurant le réseau vasculaire et par suite en accélérant la disparition progressive de ces ulcères [160] (figure 23).

En plus, des nombreuses études ont signalé encore l'impact considérable des CSMs sur des ischémies tissulaires. Parmi elles l'étude de Mias C et al. qui vise à traiter les ischémies cardiaques en montrant l'effet majeur des CSMs dans la réduction de la fibrose ventriculaire après un infarctus du myocarde [161]. Ainsi Alfarano C et al. révèlent l'importance des CSMs de MO dans le traitement des ischémies rénales en indiquant leur rôle d'améliorer la filtration glomérulaire suite à une insuffisance rénale chronique [162].

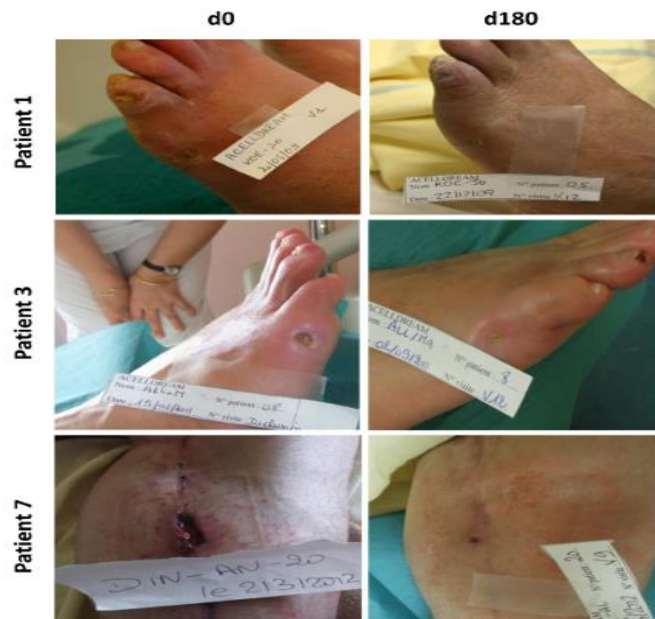


Figure 23: Images d'ulcères de la plaie des patients ayant reçu une injection intramusculaire des CSMs d'origine adipeuse [160]. Trois exemples montrant l'amélioration des ulcères à partir du jour de l'injection des CSMs (d0) jusqu'au le dernier jour de suivi (d180).

Enfin, les CSMs sont capables d'induire une neuroprotection à travers ses impacts directs sur la croissance et la survie des neurones et les cellules neuronales (figure 24) [163]. Ces impacts sont influencés par un ensemble des molécules (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance) trouvés dans le sécrétome dont leur production augmente avec l'augmentation de l'activité neuroprotectrice des CSMs qui est excitée par un ensemble de facteurs de microenvironnement tels que la stimulation des CSMs par un milieu hypoxique, des cytokines proinflammatoires, ou par des cellules apoptiques ou des microglies [165– 167]. Parmi ces facteurs on compte : VEGF, CNTF, FGF8, TGF- β 1, GDNF, bFGF, CXCL12, FGF20, IGF1, TRKC HGF, IL6, NGF, G-CSF, TNF- α , et BDNF [74]. La dernière molécule a été identifiée comme un facteur de croissance neurotrophique ayant un intérêt majeur dans la maladie de Huntington [167]. Ainsi dans plusieurs cas de lésions cérébrales, des travaux ont prouvé que la transplantation des CSMs maintenait une masse importante de cellules neuronales au niveau de la zone lésée [169, 170]. Plusieurs fonctions neuroprotectrices sont accomplissés par ces différents facteurs comme l'accroissement de la constitution des connections synaptiques, la réduction de l'apoptose neuronique, l'augmentation de la formation de neurites [74]...

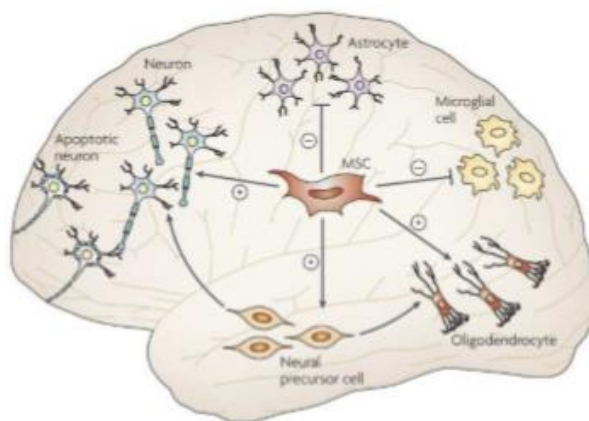


Figure 24: Image montrant la capacité des CSMs de stimuler (+) ou d'inhiber (-) certaines cellules neuronales [163].

III- Développement des biomatériaux

Les besoins croissants en organes de remplacement sont justifiés par l'inéluctable outrage du temps sur le corps humain ainsi que les nombreuses maladies liées au passage des années. Cependant, les transplantations classiques d'organes sont accompagnées de différents inconvénients : la pénurie du nombre de greffons au premier rang, le risque significatif de transmission d'agents pathogènes, et l'obligation du suivi d'un traitement immunosuppresseur. Pour ces raisons, les scientifiques et les médecins ont depuis longtemps cherché des solutions alternatives à la transplantation d'organes humains. Il est peu de ces alternatives qui ne fassent appel à des biomatériaux, on peut citer : le traitement chirurgical des maladies dégénératives, cardiovasculaires, urologiques, ophtalmologiques, les traumatismes...

Le domaine des biomatériaux représente une des grandes avancées thérapeutiques de ces quarante dernières années, il recouvre en effet l'ensemble de la recherche et du développement concernant, d'un côté, les matériaux et biomatériaux qui sont mis en jeu dans ces systèmes, d'autre côté, la fonction de ces systèmes artificiels, envisagée sur le plan biologique (biofonctionnalité).

Selon la définition élaborée à Chester en 1986 par la Conférence de Consensus organisée sous l'égide de la Société Européenne des Biomateriaux, les biomatériaux sont des "matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques". Ainsi, à Sorrento (Italie) en 2005, un biomatériau était défini un comme « un matériau conçu pour interagir avec des systèmes biologiques, qui participe à la constitution d'un dispositif à visée diagnostic ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle » [170]. Les premiers

biomatériaux métalliques utilisés comme attelles pour les os, datent de la fin du 18^{ème} siècle. La première prothèse complète de hanche a été réalisée en 1938. Dans les années 1950, les biomatériaux polymères font leur apparition. Ils sont utilisés pour les prothèses de cornée ainsi que pour les vaisseaux sanguins. Aujourd'hui, les biomatériaux sont utilisés pratiquement partout au niveau du corps humain et leur utilisation est très largement répandue [171] (Figure 25).

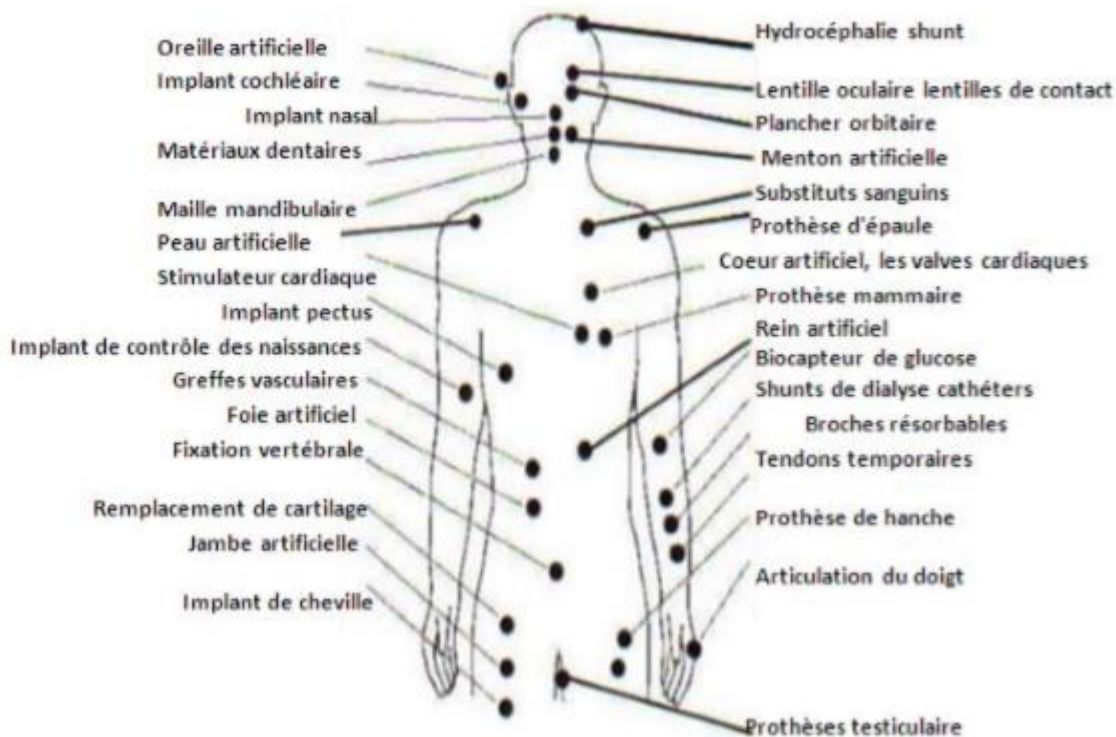


Figure 25: Biomatériaux dans le corps humain [171].

Une grande variété de produits implique l'utilisation de biomatériaux, depuis les dispositifs médicaux à usage unique jusqu'aux prothèses implantées. Leur caractéristique commune est la biocompatibilité, qui peut être défini comme, la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse de l'hôte appropriée dans une application spécifique, peut y être associée. Enfin, pour que le biomatériau corresponde aux critères déjà définis, il est généralement admis que la durée de contact avec les tissus vivants dépasse quelques heures [170]. En fait, le caractère multiparamétrique des biomatériaux est une fonction difficile à mesurer ou à évaluer objectivement. Alors, la notion de « biomatériaux » demeure vaste et englobe de nombreux domaines (tableau 5).

Tableau 5: Domaines d'application des biomatériaux [170].

Domaines	Applications
Cardiovasculaire	Valves cardiaques, matériel pour circulation extra-corporelle, cœur artificiel, assistance ventriculaire, stimulateurs cardiaques, prothèses et endoprothèses (stents) vasculaires, matériels pour angioplastie luminale, cathéters
Chirurgie plastique et reconstructive	Matériaux et implants pour chirurgie esthétique, drains de chirurgie, colles tissulaires, peau artificielle, sutures résorbables
Chirurgie orthopédique	Prothèses articulaires (hanche, coude, genou, poignet), orthèses, ligaments et tendons artificiels, cartilage, matériel de remplacement ou comblement osseux, chirurgie du rachis, réparation de fractures (vis, plaques, clous, broches)
Endocrinologie	Pancréas artificiel, pompes portables et implantables
Odontologie et stomatologie	Matériaux de restauration, comblement dentaire et osseux, traitements prophylactiques, orthodontie, traitements du parodonte et de la pulpe, implants, reconstruction maxillo-faciale
Ophtalmologie	Implants, lentilles, coussinets de récupération, produits visqueux de chambre postérieure
Radiologie et imagerie	Produits de contraste, produits pour embolisation, produits pour radiologie interventionnelle
Urologie et néphrologie	Dialyseurs, poches, cathéters et tubulures pour dialyse, rein artificiel portable, prothèses, matériaux pour traitement de l'incontinence
Autres ou applicables à plusieurs domaines	Systèmes de libération contrôlée de médicaments ou de gènes, biocapteurs, encapsulation cellulaire, néo-intestin

III.1- Propriétés des biomatériaux

Plusieurs études précliniques et cliniques ont testés des diverses matrices (biomatériaux) in vitro et in vivo. La nature et la forme des biomatériaux permettent leur classification en synthétique ou naturelle (selon leur nature, protéique ou polysaccharidique) ou liquide visqueux, massique, massique poreuse, hydrogel et mousse (selon leur forme) [172]. En IT, des différents types de biomatériaux sont utilisés selon le domaine d'application, prenant par exemple l'IT du cartilage recrute un panel des biomatériaux de différentes natures qui

peuvent être associés entre eux ou modifiés chimiquement ou structurellement pour former des matrices mixtes [173] (tableau 6).

Tableau 6: Différents types de biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage [5].

Matrices à base de protéines	Matrices à base de polymères polysaccharidiques	Matrices à base de polymères artificiels
Collagène	Chitosane	Acide polyglycolique
Laminine (Matrigel™)	cellulose	Acide polylactique
Fibrine	Alginate	Acide polybutyrique
Gélatine	Agarose	Phosphates de calcium
	Acide hyaluronique	polyéthyléméthacrylate
		Polyuréthane
		Téflon® (polytetrafluoroéthylène)
		Dacron® (polyéthylène téréphtalate)
		Fibres de carbone

Idéalement, Les biomatériaux doivent satisfaire plusieurs propriétés avant toute évaluation clinique [5]:

- La biocompatibilité
- La bioactivité qui lui permet de libérer de morphogènes ou de facteurs de croissance.
- La biodégradabilité pour s'intégrer dans les processus physiologiques de remodelage tissulaire.
- La prévention des réactions inflammatoires et immunologiques qui peuvent être suite à son implantation, en vue de préserver le tissu receveur.
- L'assurance d'un environnement tridimensionnel favorable à l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire

- La présence d'une certaine porosité pour permettre la migration des cellules et la diffusion des nutriments et des molécules.
- La capacité d'adhérer aux tissus, la résistance et la conservation de son intégrité mécanique pour éviter son écoulement ou sa fuite après implantation.
- Le pouvoir d'être stérilisé (sans affecter ses propriétés fonctionnelles) afin d'éviter les contaminations par des agents pathogènes.
- La possession d'une forme et d'une taille adaptées à la forme et la taille de la lésion.

Le tableau 7 illustre certaines propriétés intrinsèques avec leur définition que chaque biomatériau utilisé doit néanmoins les présenter.

Tableau 7: Quelques propriétés et définitions des biomatériaux [174].

Propriétés	Définition
Biocompatibilité	Capacité à provoquer une réponse appropriée de l'organisme hôte dans une application spécifique
Cytocompatibilité	Capacité à conserver la viabilité des cellules
Biofonctionnalité	Capacité à remplir in vivo les fonctions biologiques auxquelles la matrice est destinée
Injectabilité	Biomatériau injectable
Perméabilité	Diffusion des nutriments et des déchets
Biodégradabilité	Dégradation du biomatériau au cours du temps

En plus, le biomatériau idéal doit être non-immunogènes, manufacturé dans une grande variété de forme et de taille, facilement accessible, ainsi posséder une autorisation de mise sur le marché pour faciliter l'application chez l'homme de concepts démontrés expérimentalement [11].

Plusieurs travaux visent à l'optimisation principalement de la biocompatibilité, la cinétique de dégradation et des propriétés mécaniques des biomatériaux. Cette optimisation s'effectue en prenant en considération quelques variables :

- le poids moléculaire des molécules constitutives du biomatériau en premier lieu : une réaction inflammatoire peut être induite par un matériau de faible poids moléculaire alors qu'un même matériau de poids moléculaire élevé est bien toléré [175].
- La porosité et l'élasticité des biomatériaux qui sont fortement impliqués dans les processus d'adhésion et de différenciation cellulaires.
- La nature des biomatériaux [176].

Le rôle d'une matrice peut être résumé par le fait de diriger à la fin la régénération tissulaire à travers l'assurance d'un support aux cellules d'un part, et la libération des signaux favorisant l'intégration, la différenciation, la survie, la croissance cellulaires, et l'angiogenèse. On distingue deux types de matrices, les matrices synthétiques (artificielles) et les matrices naturelles (biologiques) [11].

Alors, la science des biomatériaux est connu comme un outil de support cellulaire, de part que les biomatériaux représentent un environnement tridimensionnels (3D) pour favoriser la prolifération cellulaire et/ou la différenciation pour la régénération tissulaire [177]. Des facteurs mécaniques tels que la rigidité de la matrice, la nanotopographie matricielle, la microgéométrie et les forces extracellulaires influencent significativement les activités des cellules souches. En se basant sur la source de dérivation, les biomatériaux peuvent être regroupés alors sous deux classes : naturels et synthétiques. Certains des biomatériaux naturels utilisés dans l'IT comprennent le collagène, la fibroïne de soie, l'alginate, le chitosane, la kératine et les tissus décellularisés tels que la membrane amniotique humaine dé-épithélialisée [178]. Chacun de ces deux types de biomatériaux représentent des avantages ainsi que des inconvénients selon leur application. Pour les deux classes, les avantages et les inconvénients sont résumés dans le tableau 8.

Tableau 8: Résumé des avantages et des inconvénients des matériaux naturels et synthétiques [179].

	Avantages	inconvénients
Biomatériaux naturels	- Origine biologique - Biocompatibilité - Présence des séquences adhésives facilitant l'adhésion et la différenciation cellulaire	- Propriétés mécaniques insuffisantes - Dégradation rapide - Propriétés variables en fonction de la procédure d'extraction - Risque de contamination - Coûts de production élevés
Biomatériaux synthétiques	- Propriétés mécaniques appropriées - Propriétés chimiques et mécaniques - Hautement reproductibles - Coûts de production faibles - Réponse immunitaire faible	- Biocompatibilité faible - Risque d'effets secondaires résultant de la biodégradation

La biodégradabilité et la nature biologiquement active sont les principaux avantages des biomatériaux naturels par rapport aux biomatériaux synthétiques. Les cellules cultivées sur des matériaux naturels révèlent une bonne réponse cellulaire avec une amélioration de la croissance et de l'IT lors de la transplantation. L'un des principaux inconvénients des matériaux naturels est leur capacité inhérente à être contaminés par la source [180]. Les matériaux synthétiques représentent le plus grand groupe de polymères biodégradables, ils représentent des propriétés constantes et cohérentes à part du rapport surface/volume élevé de ce type, la versatilité dans la composition chimique et les propriétés biologiques qui montrent une bonne malléabilité et une bonne aptitude au traitement. Des polymères de diverses propriétés ont été utilisés pour la fabrication des matériaux destinés à différentes applications. L'un des principaux inconvénients des matériaux synthétiques est l'inflammation locale déclenchée par la libération d'acides comme sous-produits de dégradation [181]. Différentes techniques avec des architectures différentes sont utilisées pour synthétiser des matériaux à des applications biologiques ou cliniques spécifiques. La figure 26 représente quelques méthodes qui donnent l'unicité architecturale à la conception des matériaux et leurs limites en ce qui concerne les applications des CS.

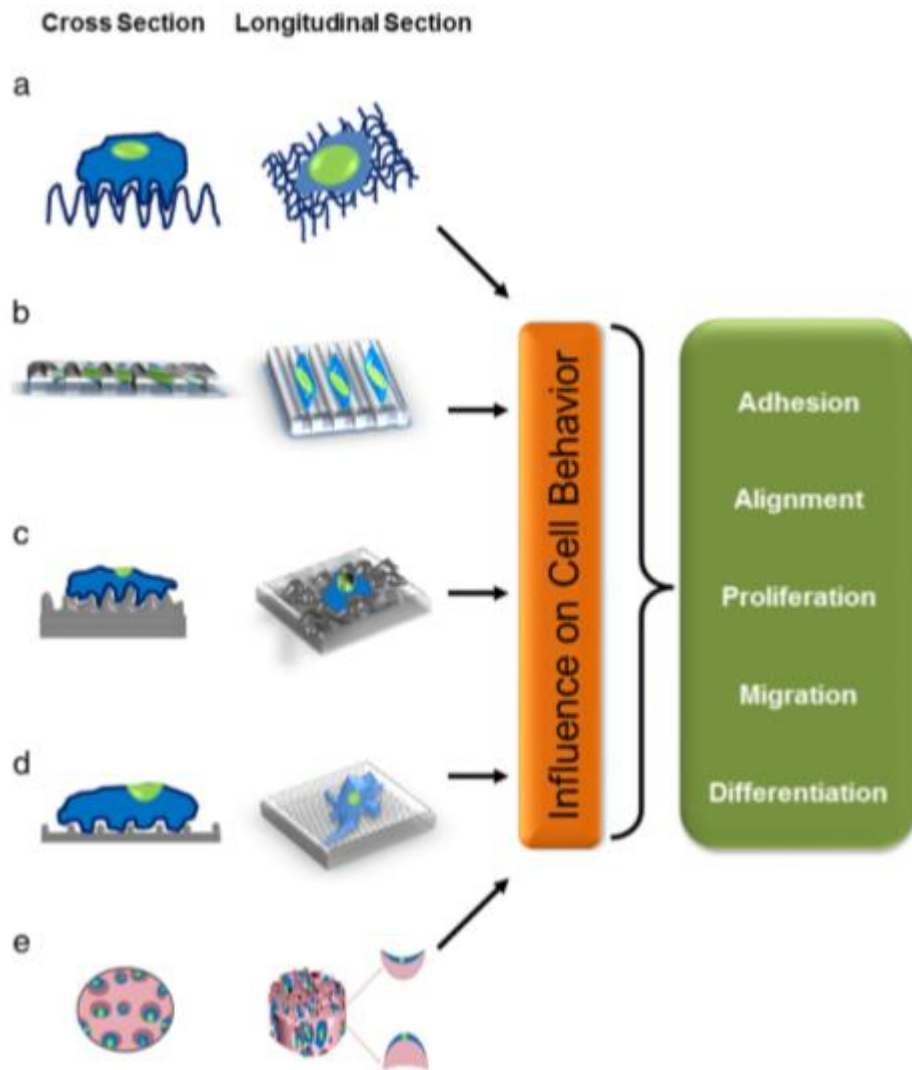


Figure 26: Réponse cellulaire au microenvironnement biophysique [180].

Biomatériaux avec : (a) architecture fibreuse, (b) nano-sillons/crêtes, (c) rugosité de surface et des nanotopographies variables, (d) surface nanométrique, et (e) courbures concaves et convexes à l'intérieur des matériaux poreux. Ces signaux mécaniques microenvironnementaux influencent les différents comportements cellulaires.

III.2- Biomatériaux artificielles

On distingue parmi les matrices artificielles trois catégories : les métaux et alliages métalliques, Les céramiques, Les polymères et la matière molle.

Les métaux et alliages métalliques sont les "ancêtres" des biomatériaux en vue qu'ils sont les premiers biomatériaux utilisés pour fabriquer des implants. Les plus importants du point de vue des propriétés mécaniques est l'acier inoxydable (utilisé en chirurgie orthopédique) et de biocompatibilité est le titane (utilisé en chirurgie orthopédique, implants dentaires, pompes implantables, stimulateurs cardiaques...). Ainsi, on distingue parmi les alliages métalliques : les alliages cobalt, tantale, molybdène, chrome, etc, et parmi les céramiques : l'alumine, la

zircon et l'hydroxyapatite (HAP) qui sont utilisés dans le domaine des biomatériaux. Le HAP qui est une céramique à base de phosphate de calcium présente une excellente biocompatibilité et bioactivité et capable d'améliorer les propriétés mécaniques des matrices, il est très utilisé dans l'ingénierie de l'os, alors que l'alumine et la zircon sont utilisées en odontologie pour les implants dentaires ainsi que dans les têtes de prothèses de hanche. Finalement la catégorie des polymères et la matière molle regroupent plusieurs catégories de polymères qui présentent de nombreuses utilisations dans le domaine des biomatériaux, citons : les élastomères (utilisés pour les ventricules artificiels, les lentilles de contact, Encapsulation cardiaques), les polyépoxydes (utilisés pour les montures de lunettes, stimulateurs cardiaques, matériel d'assistance), les polyesters : poly (téréphtalate d'éthylène), polyesters insaturés UP, polycarbonate PC (utilisés en greffes vasculaires, matériel prothétique), les polyéthers : Poly (oxyméthylène) POM, Poly (oxyphénylène) PPO (utilisés pour les valves cardiaques), les polymères Cellulosiques : Acétate de cellulose, Acétobutyrate de cellulose (utilisés pour les montures de lunettes) [182].

La possibilité d'étudier la réponse cellulaire sur des substrats synthétiques, et dans des conditions mécaniques contrôlées, est très grande. Plusieurs facteurs peuvent influencer la différenciation des CS, y compris les facteurs solubles sécrétés, l'élasticité, et la composition biochimique et la dimensionnalité de la matrice [183]. L'élasticité du substrat est un paramètre mécanique qui influence fortement la réponse cellulaire. Engler et al., ont examiné l'effet de l'élasticité de la matrice sur la différenciation des CSM humaines. Ils ont montré que les matrices de faible élasticité favorisaient la différenciation des CSM en des cellules de type neuronal, les matrices d'une élasticité modérée favorisaient une différenciation myogénique et que les matrices rigides stimulaient la différenciation ostéogénique (figure 27) [184].

Actuellement, les polymères ayant la propriété de la possibilité de la dégradation de leur chaîne principale présentent une attention particulière en IT. Ce sont principalement les polymères aliphatiques à base de polyester (poly L-lactide-co-caprolactone [PLLC], acide poly DL-lactique [PLGA], acide poly L lactique [PLLA], acide polylactiques [PLA], polycaprolactone [PCL], acide polyglycolique [PGA]). Ces matrices présentent à la fois des avantages et des inconvénients, les avantages résident dans la nanoporosité de leur surface qui fournit des points d'ancrage protéique et par suite favorise la capacité adhérencielle, alors que les inconvénients résident dans l'hydrophobicité de leur surface qui limite l'interaction protéine-polymère, ce qui gêne l'adhésion cellulaire. Cet inconvénient peut être pallié partiellement par l'introduction de protéines naturelles à la surface de ces matrices. Zhu et al. ont montré qu'une amélioration significative de l'adhésion, la survie et le fonctionnement

mitochondrial de fibroblastes, de cellules épithéliales œsophagiennes et de cellules musculaires lisses est favorisé par l'ajout de FN ou de collagène à la surface de différents polymères (PLLC, PLGA et PLLA). Le comportement, la prolifération et la différenciation cellulaire sont ainsi influencés par la taille des pores et la concentration en calcium de la matrice [188,189].

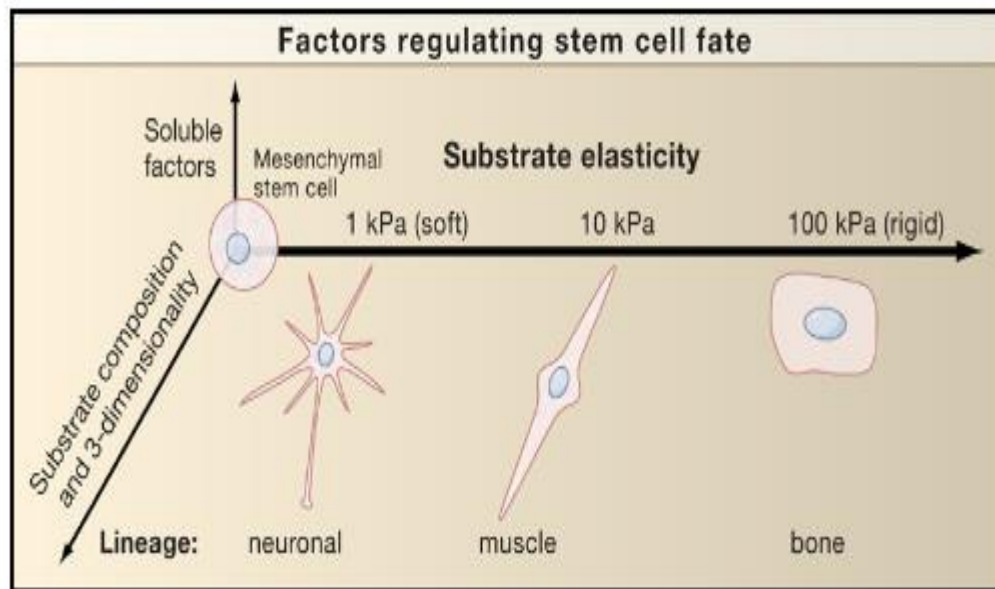


Figure 27: Schéma montrant le contrôle du destin des cellules souches [183].

En définitive, les propriétés physiques et biologiques médiocres de ces matériaux peuvent limiter leur application clinique à long terme. Le souci de leur faible biocompatibilité, qui fait qu'elles provoquent souvent une réaction à corps étranger accompagnée de la formation de sténose ou de fistule, a orienté les chercheurs et de nombreuses équipes vers des matrices d'origine biologique.

III.3- Biomatériaux naturelles (biologiques)

Ils se distinguent parmi les biomatériaux d'origine naturelle, biomatériaux d'origine végétale et les biomatériaux d'origine animale. Les tableaux 9 et 10 montrent, respectivement, des exemples de chacun de ces biomatériaux et leurs utilisations.

Tableau 9: Exemples de biomatériaux d'origine végétale et leurs utilisations [182].

Biomatériaux d'origine végétale	Utilisation
Les fucanes : polysaccharides extraits des algues marines.	Anticoagulants, anti complémentaires.
La cellulose : dérivée des parois cellulaires.	Utilisée pour les membranes de dialyse ou comme ciment de prothèse de hanche.
Les dextranes : préparés par transformation de saccharose par des bactéries.	Agroalimentaire
Les alginates de sodium	Ingénierie tissulaire, agroalimentaire

Tableau 10: Exemples de biomatériaux d'origine animale et leurs utilisations [182].

Biomatériaux d'origine animale	Utilisation
La chitine : polysaccharide extrait des carapaces de crustacés.	Utilisée pour les fils de suture, la chirurgie reconstructive et la peau artificielle
Le corail : extrait des madréporaires.	Utilisé en chirurgie orthopédie et maxillofaciale.
Le collagène : extrait de la peau ou du placenta humain	- La cosmétologie et la chirurgie esthétique - Les pansements et éponges homéostatiques - les implants oculaires et pansements ophtalmologiques - La reconstitution de tissus moux et durs à l'aide de mélanges collagène-facteurs de croissance-hydroxyapatite

Les matrices naturelles peuvent être considérées comme des alternatives aux matrices synthétiques, elles présentent une meilleure surface pour l'adhésion, la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire [187].

Ces matrices jouent un rôle important d'un part, dans la réduction de fibrose et des phénomènes inflammatoires, et en favorisant le remodelage tissulaire d'autre part. Le remodelage tissulaire vers le phénotype de l'organe voulu est jusqu'à présent une voie de recherche prometteuse notamment par l'application de l'approche hybride de IT qui consiste à une création d'un substitut composé d'une matrice naturelle telle qu'une MECensemencée par des cellules spécialisées.

Le derme (DDM: decellularized dermal matrix), la vessie (UBM: urinary bladder matrix), la sous-muqueuse intestinale (SIS: small intestinal submucosa), l'estomac (GAM: gastric acellular matrix), l'œsophage (EAM: esophageal acellular matrix), le placenta (HAM: human amniotic membrane), ce sont quelques exemples des MEC qui sont obtenues par traitement enzymatique de tissus natifs ou d'organes, dont l'obstacle de leur obtention réside à l'arrivée à une décellularisation complète sans détériorer leur structure. Ces matrices naturelles offrent un environnement tridimensionnel capable d'avoir des impacts sur la fonctionnalité et la nature des cellules désirant les coloniser [11]. Chaque matrice a un rôle dans l'adhésion et la repopulation cellulaire grâce à sa composition en protéines structurales (collagène et élastine) et protéines fonctionnelles (adhérentielles: FN et laminine), ainsi un rôle dans la réparation tissulaire grâce à sa capacité de libérer des molécules protéiques (les peptides cryptiques) ayant des capacités mitogènes et chimiotactiques devant les cellules de l'hôte [188].

Ainsi les matrices de collagène (un des constituants de la MEC) représentent une subdivision des matrices naturelles. Les matériaux à base de collagène pour la reconstruction tissulaire peuvent se présenter principalement sous forme de solutions acido solubles lyophilisées (éponges de collagène) qui sont effectives chez les grands brûlés dans la reconstruction de peau (derme et épiderme) mais leur utilisation reste largement limitée aux reconstructions de défauts osseux de taille réduite [189], ou comme des adjuvants associés aux thérapies des défauts plus larges [190]. Ces matériaux sont également présentés sous forme d'hydrogels faiblement concentrés qui sont utilisés comme des supports tridimensionnels pour la culture de cellules in vitro [191] mais leur utilisation demeure limitée aux réparations osseuses grâce à leurs faibles propriétés mécaniques [192]. Habituellement, les matrices de collagène sont synthétisés à partir du collagène bovin de type I extrait de la peau ou du tendon d'Achille, dont la grande ressemblance avec le collagène humain est un atout. Elles possèdent une forme

bi ou tridimensionnelle issue des processus de fabrication. Comme ces matrices sont formées d'un seul des constituants de la MEC, il est pressenti que ses aptitudes sont limitées par rapport aux MEC [11].

IV- Modifications de surface

La MR du XXIème siècle est témoin d'une nouvelle génération de biomatériaux (substituts artificiels hybrides) et matériels implantables qui constituent un des axes moteurs de développement du génie tissulaire. Les biomatériaux doivent présenter à la fois des propriétés structurales adaptées à la fonction prévue et des propriétés superficielles constituant la base des interactions à l'interface biomatériau-tissu. Pour n'importe quelles applications envisagées il est souvent difficile, voire impossible, de trouver un biomatériau répondant aux ces deux exigences à la fois, et judicieusement il faut choisir un matériau satisfaisant la première exigence puis à modifier sa surface pour qu'il puisse acquies les propriétés superficielles demandés pour satisfaire la deuxième exigence. La modification de surface a un impact à la fois sur la nature du biomatériau, la structure de sa surface, ses caractéristiques physico-chimiques superficielles et la micromorphologie et par suite sur le comportement cellulaire (adhérence, étalement, migration, différenciation, prolifération...) contribuant ainsi à l'édification d'un néotissu. Mel et al., et dans le but d'accélération de l'endothélialisation des greffes vasculaires, ils ont envisagé différentes modifications de surface de biomatériau (figure 28) [193].

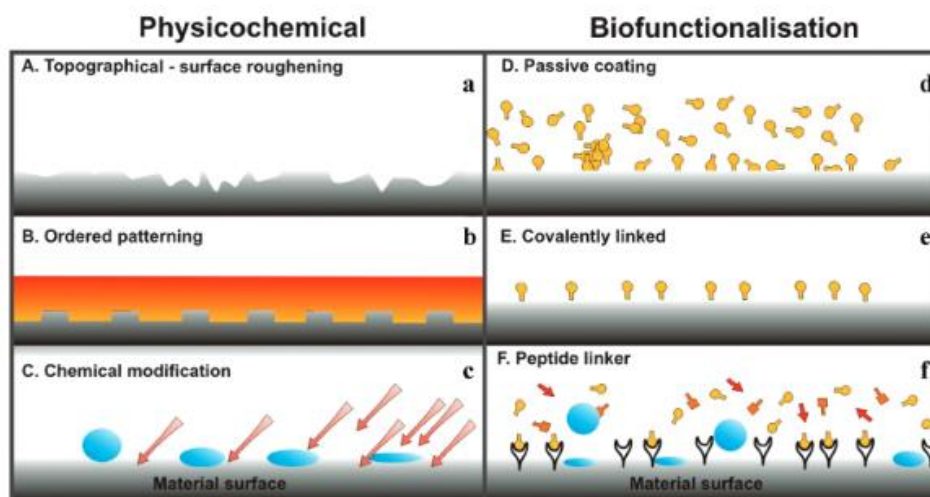


Figure 28: Différents exemples de modifications de surface: physiques, chimiques et biologiques contribuant à l'amélioration de l'endothélialisation [193].

Ainsi, Le tableau 11 présente un résumé des différentes techniques de fonctionnalisation (post-polymérisation) pour modifier les biomatériaux afin d'induire la réponse cellulaire désirée.

Tableau 11: Différentes techniques utilisées pour modifier les biomatériaux (post-polymérisation) pour l'amélioration des interactions avec les cellules [179].

méthode de modification	propriétés modifiées des biomatériaux
Modifications morphologiques	- Revêtements contenant des pores pour améliorer la croissance tissulaire - Topographie induite (sillons, morphologie, rugosité) - Matériaux fibreux - Matériau poreux
Modifications chimiques	- La décharge lumineuse pour augmenter l'énergie de surface et l'adhérence des tissus - Les surfaces à polymères réticulées pour diminuer la perméabilité de surface et augmenter la dureté de surface - Le traitement au plasma avec des gaz réactifs pour créer de nouveaux groupes fonctionnels sur la surface du polymère - La greffage des macromolécules telles que le polyéthylèneglycol pour réduire l'adsorption de protéines et l'adhésion cellulaire - Des groupes fonctionnels pour produire des surfaces chargées positivement ou négativement
Modifications biologiques	- Immobilisation de biomolécules pour favoriser l'adhésion et la croissance cellulaire - héparine, des peptides liants à l' héparines sulfate - Protéines naturelles de MEC (fibronectine, laminine, collagène) - Séquences peptidiques (RGD) - Facteurs de croissance

Par suite, les modifications de surface peuvent être classées en trois catégories: modifications chimiques, géométriques, et biologiques.

IV.1- Modifications chimiques

Les techniques de modifications chimiques font intervenir la structure chimique du matériau. La modification de la charge ou du caractère hydrophile/hydrophobe du matériau d'une part et de ses interactions avec les cellules d'autre part sont les effets de telles modifications. La modification de charge des surfaces a été abondamment étudiée dans plusieurs domaines concernant la recherche sur les biomatériaux à applications diverses. En utilisant des polymères plus ou moins hydrophiles, Kim et al. ont ainsi montré que l'adhésion et l'étalement de cellules souches humaines issues de la MO étaient meilleurs sur des surfaces hydrophiles que sur des surfaces hydrophobes [194].

IV.1.1- Surfaces à chimie contrôlées

Beaucoup de travaux ont été effectués sur des surfaces à chimie contrôlées afin de mieux comprendre les différents mécanismes agissant sur le devenir cellulaire. Contrôler la chimie des surfaces est intéressant pour mieux comprendre le rôle des liaisons entre la membrane plasmique et le support dans le fonctionnement cellulaire d'où la définition d'un support à chimie contrôlée est comme suit, un support plan sur lequel ont été déposés des substrats (naturels ou artificiels). En effet, les cellules vont se lier aux substrats via leurs propres molécules d'adhésion et le comportement cellulaire est influencé par le substrat en fonction des molécules d'adhésion capables de le lier.

Les substrats peuvent être d'origine naturelle ou artificielle. Les substrats naturels comme les protéines de la MEC (FN, ...) sont reconnus par différentes protéines membranaires telles que les Ig et vont entraîner des réponses relativement spécifiques de la part de la cellule comme des changements de morphologie ou des variations d'adhésion. Les substrats dits artificiels peuvent être des fragments de molécules naturelles (peptides), comme le peptide RGD de la FN, ou bien des molécules complètement artificielles comme les polymères ou les polyélectrolytes (chitosan, polyacrylic acid PAA, poly(styrène-4-sulfonate) PSS...). Si les peptides synthétiques (peptide RGD,...) permettent d'étudier les séquences fonctionnelles et l'importance de la conformation des protéines, l'utilisation de molécules purement artificielles permet de mieux comprendre les interactions entre la cellule et son substrat, ainsi que de jouer sur les paramètres physicochimiques impliqués dans l'adhésion cellulaire pour modifier la cytocompatibilité des surfaces. En effet il existe certains polymères dits « répondants » qui subissent des modifications (notamment conformationnelles) en réponse à certaines variations du milieu.

IV.1.1.1- Modification par assemblage multicouches de polyélectrolytes

La technique de modification des surfaces par assemblage multicouches de polyélectrolytes (PEMs) est une des types de modifications chimiques reposant sur des molécules complètement artificielles comme les polyélectrolytes (PE), c'est une nouvelle voie des études et de recherches qui a été développée. Cette technique a été décrite pour la première fois par Decher et al. [198–200], et elle a été ensuite développée et utilisée par de nombreuses autres équipes. L'utilisation de cette technique est facile, elle constitue un moyen simple, original, et efficace de fonctionnalisation rapide des surfaces des biomatériaux, ainsi que les polyélectrolytes utilisés possèdent un grand nombre de charges quand ils sont dissous dans des solvants polaires en particulier l'eau, toutes ces raisons rendent de cette technique utilisable particulièrement dans les applications biomédicales. Cette utilisation pour telles applications est permise par le fait qu'elle peut être effectuée dans des conditions moyennes de pH et de température, et dans des solutions aqueuses, aussi qu'elle ne nécessite pas l'intervention de réactifs chimiques potentiellement dommageables ou dénaturants, ce qui rend cette technique idéale pour l'étude de molécules sensibles comme les biopolymères ou les protéines.

La base de cette méthode est le principe de dépôt couche par couche, "Layer-by-Layer". Ce principe repose sur l'adsorption alternative des polyanions et des polycations sur la surface. En raison des charges opposées, les PE à chaque étape s'auto-assemblent, induisant par suite une accumulation des films (figure 29).

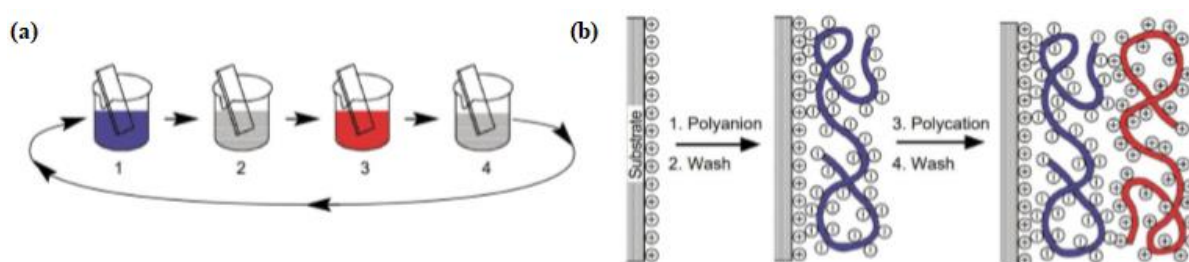


Figure 29: Principe de dépôt couche par couche utilisé dans la technique de modification des surfaces par assemblage multicouches de polyélectrolytes (PEMs). (a) schéma représentant le processus de déposition des films de polyélectrolytes. Les étapes 1 et 3 représentent l'adsorption des polyanions (bleu) et des polycations (rouge), les étapes 2 et 4 représentent les étapes du rinçage qui éliminent l'excès des charges. (b) Schéma d'un modèle moléculaire simplifié des deux premières étapes d'adsorption, le premier dépôt est effectué à l'aide d'une solution de polyanions alors que le second dépôt est effectué à l'aide d'une solution de polycations ce qui rend le substrat chargé positivement en surface. Ces deux dépôts ou couches peuvent interagir électrostatiquement [196].

La simplicité chimique de cette technique permet d'ajuster facilement les propriétés et les caractéristiques du film de PE grâce à de petits changements dans le montage expérimental ou en utilisant des différentes solutions des PE. Alors et selon l'application visée, les PEMs peuvent être adaptées en offrant par suite une multitude de possibilités, ce qui exige un choix particulier des PE en se basant sur divers propriétés parmi elles [198]:

- la croissance du film des PE (linéaire ou exponentielle)
- les propriétés mécaniques du film (rigidité, élasticité, résistance)
- la stabilité des PEMs
- les interactions physicochimiques existant entre les couches
- les interactions hydrophiles / hydrophobes
- la biodégradabilité et l'absence de cytotoxicité de ces types de films.
- la concentration des PE, la réticulation, le temps d'adsorption, le nombre de couches.

L'épaisseur de ces films peut être ainsi ajustée simplement en changeant le nombre de cycles de dépôt (polyanion / polycation), le pH, ou la force ionique de la solution [199]. La rigidité est un critère essentiel que les PEMs doivent la posséder pour optimiser l'adhésion et l'étalement cellulaire, par exemple les PEMs formés par des couches alternées d'hydrochlorure de poly(allylamine) (PAH) et de poly(styrène-4-sulfonate) de sodium (PSS) sont reconnus qu'ils sont suffisamment rigides et fins pour l'amélioration de l'adhésion cellulaire. La propriété du biodégradabilité des films PEMs peut être obtenu pour les multicouches à base de chitosan et de hyaluronane (HA), via des enzymes comme l' α -amylase, la hyaluronidase et la lysozyme ainsi, certaines films peuvent être dégradées de manière pH-dépendante [170]. Cette propriété de biodégradabilité, les propriétés mécaniques et autres propriétés physicochimiques des PEMs peuvent être contrôlés par le processus de réticulation des PE, ce qui aboutit à une modulation du comportement cellulaire, en particulier la favorisation de la prolifération et l'étalement de nombreux types cellulaires (ostéoblastes, chondrocytes, cellules musculaires lisses, neurones) [198].

Alors en bref, Les propriétés de surface des PEMs telles que la chimie, la topographie, et la biocompatibilité de surface peuvent être ajustées en variant les paramètres des films tels que les polyélectrolytes utilisés, le nombre de couches et le degré de réticulation (ceux qui augmentent la rigidité) [200]. Ces propriétés rendent les PEMs utiles pour étudier et améliorer les interactions entre les cellules (comme les cellules stromales mésenchymateuses et d'autres types de CS) et les substrats ainsi pour évaluer leur utilité potentielle en tant que revêtements pour des dispositifs biomédicaux implantables en améliorant la fixation entre les implants et les tissus.

IV.1.1.2- Silanisation en phase gazeuse

Les SAM (Self-Assembled Monolayers) sont des assemblages moléculaires formés spontanément sur des surfaces par adsorption et sont organisées en domaines ordonnés plus ou moins grandes [204,205]. Dans certains cas, les molécules constitutives de la monocouche n'interagissent pas fortement avec le substrat. C'est le cas par exemple des réseaux supramoléculaires bidimensionnels [203]. Dans d'autres cas, les molécules possèdent des groupes dont leur tête présente une forte affinité pour le substrat et permet l'ancrage de la molécule sur le substrat [204] (figure 30). La tête de ces groupes peut comprendre des thiols, des silanes, des phosphates, etc, elle peut adsorber sur le substrat (surface) par phase gazeuse (vapeur) ou liquide, suivie d'une configuration lente des groupes formant une queue.

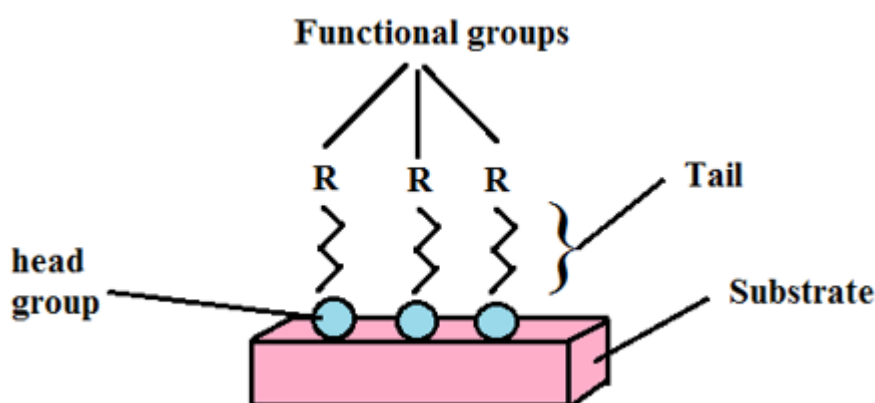


Figure 30: Groupe de SAM composé d'une tête, d'une queue et un groupe terminal fonctionnel.

Le fait que les SAM sont d'une part, des agrégations moléculaires ordonnées et, d'autre part formés par adsorption sur la surface avec une affinité spécifique de la tête de leur groupe [205], les rend intrinsèquement manufacturables et par suite technologiquement attractifs dans le domaine de l'ingénierie de surface [206].

Historiquement, la forte activité dans le domaine des SAM et les progrès dans la compréhension microscopique de celles-ci a commencé dans les années 1980 [205]. Cependant, d'autres sources ont montré que ce champ a vraiment commencé beaucoup plus tôt. En 1946, Zisman a publié la préparation d'une monocouche de n-hexadécane oléophobe par une adsorption (auto-assemblage) sur une surface métallique. À ce moment, il n'a pas été reconnu comme un auto-assemblage et l'enquête n'a suscité qu'un intérêt limité.

Le tableau 12 expose quelques principaux raisons et propriétés pour lesquels les SAM présentent un intérêt particulier et attrayant.

Tableau 12: Tableau montrant des avantages et des propriétés fournis par SAMs à une surface une fois greffée par ces monocouches

La facilité de la manière de préparation de telles surfaces

L'obtention des propriétés de surface convenables via des modifications de la structure moléculaire et des fonctions

L'utilisation des SAM en tant qu'unités élémentaires dans des structures plus complexes

La possibilité d'une structuration latérale dans des échelles nanométriques

Les applications sont rendues possibles par propriétés citées

Les combinaisons les plus populaires des SAM et de substrats sont représentées par les combinaisons des alkylsilanes sur le silicium, comme mentionné par Whitesides [207] dans son rapport et principalement des thiols sur des substrats d'or [206]. Un avantage important du silane est que les extrémités terminales des monocouches présentent une stabilité physique et chimique supérieure à celle d'une monocouche terminée par des groupements thiol.

Alors Les SAM sont considérées comme des revêtements de surface économique et versatile pour plusieurs applications, y compris le contrôle de l'humidité et de l'adhérence, la résistance chimique, la biocompatibilité, la sensibilisation et l'identification moléculaire pour les capteurs (détecteurs) et les techniques de nanofabrication. Les domaines d'application des SAMs sont nombreux, ils comprennent la biologie, l'électrochimie et l'électronique, les systèmes nanoélectromécaniques (NEMS) et les systèmes microélectromécaniques (MEMS), ainsi que les produits ménagers quotidiens. Les SAM peuvent servir ainsi comme des modèles d'étude des propriétés membranaires cellulaires et de la fixation des cellules sur les surfaces [207]. Les SAM peuvent également être utilisés pour la modification des propriétés de surface des électrodes en électrochimie, électronique générale et en divers NEMS et MEMS, En plus, Les SAM sont également utiles dans le dépôt des nanostructures, car chaque molécule adsorbée peut être adaptée pour attirer des différents matériaux.

Dans le but de contrôler l'influence des substrats sur la régulation de la fonction cellulaire, kilian et al., ont servi de l'ingénierie moléculaire, en utilisant les SAM d'alkanethiolates sur des films d'or comme des substrats modèles car ces surfaces permettent un excellent contrôle des interactions ligand-récepteur qui constituent un médiateur lors de l'adhésion cellulaire, d'une part elles sont structurellement bien définies et d'autre part, parce que l'utilisation de ces monocouches qui sont terminées par un groupe oligo (ethylene glycol) sont très efficaces pour empêcher l'adsorption non spécifique des protéines [208]. De même, Hudalla et al., ont décrit dans leur revue des divers exemples montrant que les substrats de culture cellulaire préparés de SAM d'alkanethiolates sont des outils uniques et indispensables pour élucider les détails mécaniques régissant les interactions cellule-MEC, et qu'ils sont utilisées régulièrement pour étudier l'influence de la chimie de surface des biomatériaux sur l'adsorption des protéines et, à son tour, l'interaction des cellules avec les protéines adsorbées. Et par suite l'impact des protéines adsorbées sur les fonctions et comportements cellulaires (adhésion, prolifération, différenciation) [209] (figure 31).

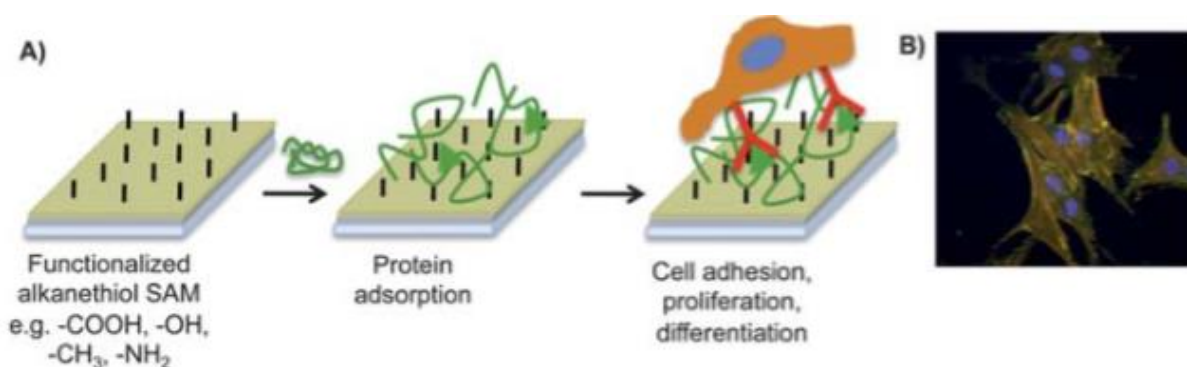


Figure 31: Utilisation des SAM pour l'étude de l'influence des protéines adsorbées sur le comportement cellulaire, comme l'adhésion, la prolifération et la différenciation. (A) : Représentation schématique d'une adhésion cellulaire sur des SAM fonctionnalisées initialement par des alkanethiol suivies par une adsorption protéique. (B) Photomicrographie fluorescent des CSM humaines adhérents aux SAM. (Bleu : noyau, orange : F-actin, vert : vinculine) [209].

IV.1.2- Impact des modifications chimiques

Yamato et al. ont réalisé des cultures cellulaires sur une couche de poly(N-isopropylacrylamide) (PIPAAm) dont les propriétés sont semblables à celles des surfaces de polystyrène utilisées en culture cellulaire traditionnelle mais qui acquiert des propriétés hydrophiles et s'hydrate lorsque la température diminue, conduisant au détachement des cellules [210]. De la même façon, Aggarwal et al. ont déterminé qu'une modification de surface par l'alternance de couches de PE répondant aux variations de pH (chitosan et

héparine) permettait de conditionner les propriétés de la surface sur laquelle les cellules vont développer. Leurs résultats présentent une différence d'épaisseur et d'hydratation selon le pH auquel les couches ont été déposées, suggérant qu'il est possible d'influencer la cytocompatibilité des PEM en jouant sur les paramètres physicochimiques au moment de l'élaboration de la structure [211].

Les résultats de Aggarwal et al [211] concernant l'effet de pH sur le développement cellulaire suggèrent que les cellules ont pu développer sur tous les substrats avec une augmentation du nombre de cellules allant du premier jusqu'au troisième jour. L'étalement cellulaire est amélioré dans le cas des multicouches préparées à pH = 4 mais le nombre de cellules ne présente qu'une légère augmentation. La haute confluence cellulaire n'a pas été atteint qu'après 3 jours de culture à pH = 9 et présentent donc la plus importante prolifération (figure 32). Ainsi cette même équipe a comparé entre les multicouches terminées par le chitosan et à celles terminées par l'héparine, Ils ont constaté que l'effet de la couche terminale semble négligeable mais le pH a évidemment un effet important sur l'adhésion et l'étalement cellulaire au cours de la formation des multicouches (figure 33).

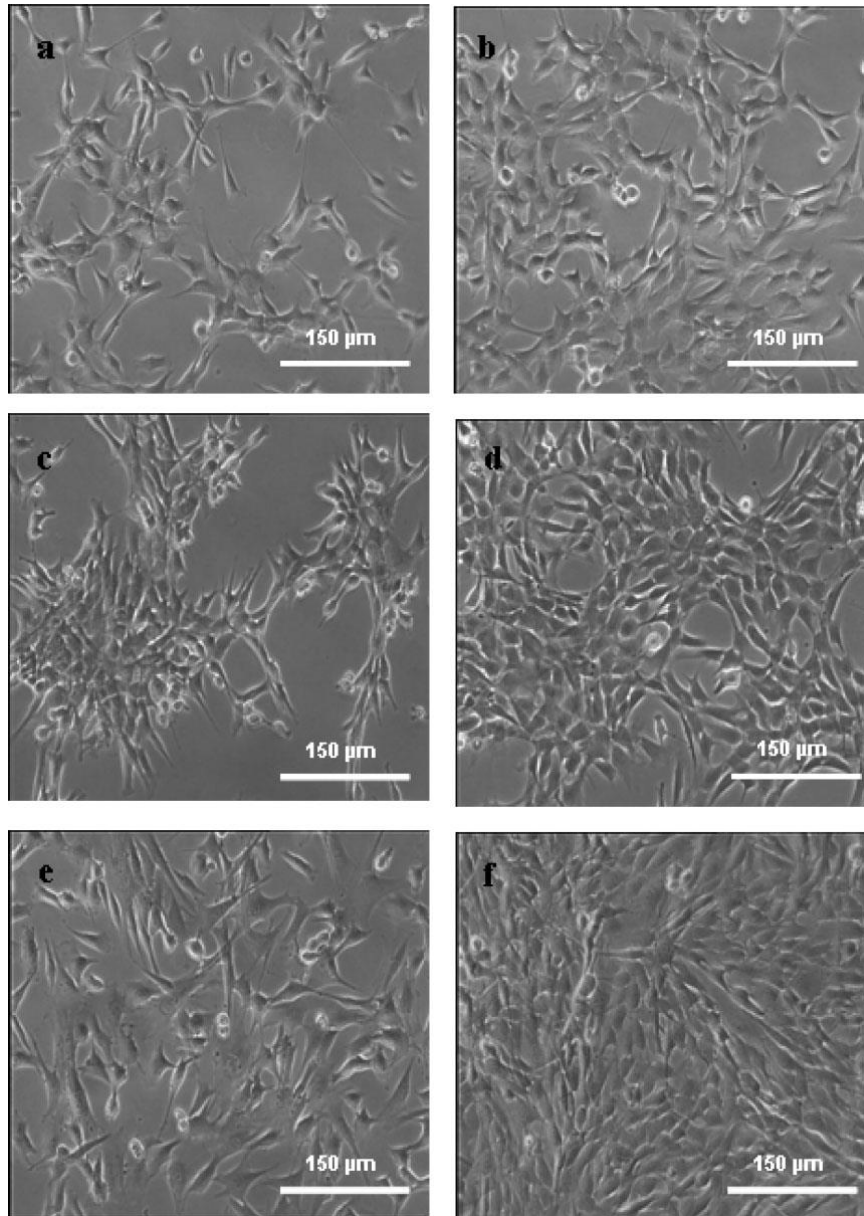


Figure 32: Images à contraste de phase de cellules cultivées sur des multicouches d'héparine préparées à des conditions différentes de pH [211].

La figure 32 montre la morphologie des cellules pendant la période de culture allant d'un jour (côté gauche) jusqu'à trois jours (côté droit). Aggarwal et al. ont utilisé trois modalités de pH. Les images 32 a et b montrent les substrats préparés à un pH = 4. Les images c et d montrent les substrats préparés à un pH alternatif entre 4 et 9. Les deux dernières images montrent les substrats préparés à un pH =9.

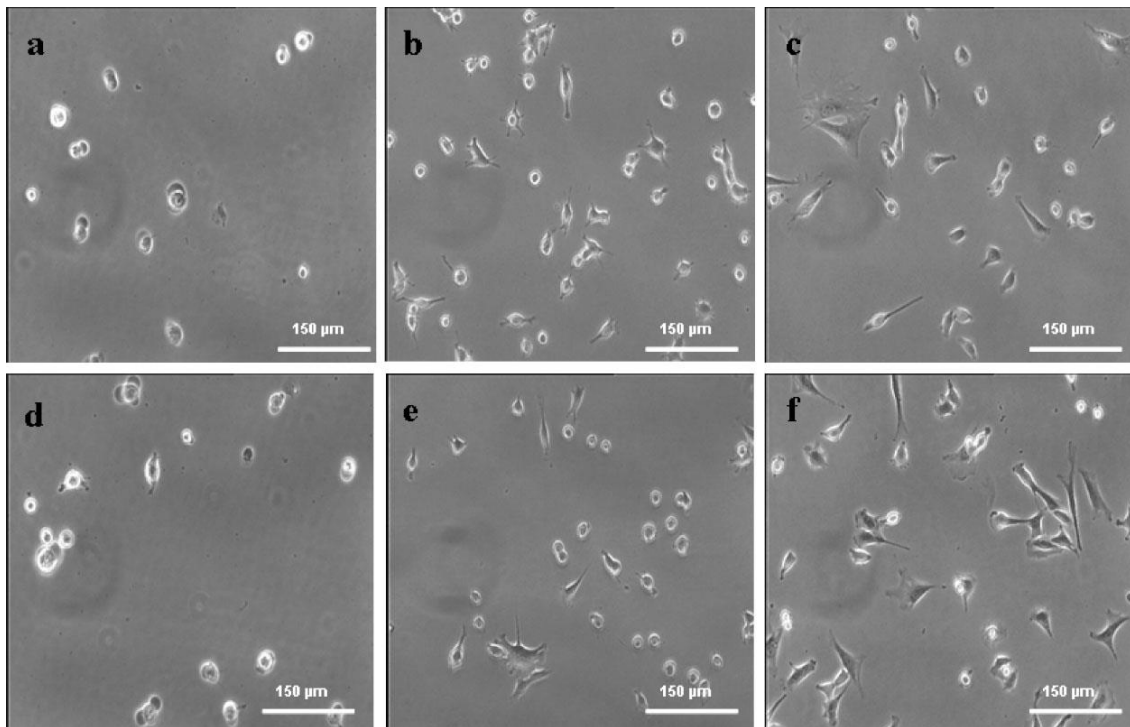


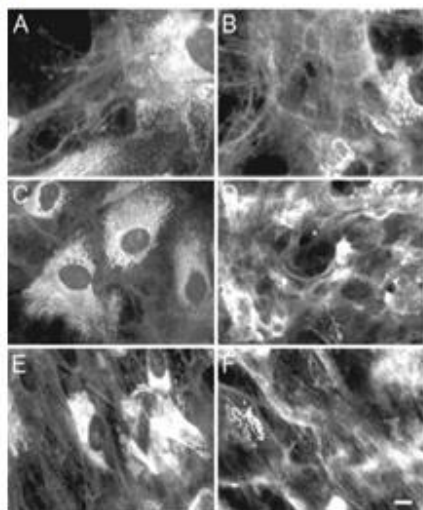
Figure 33: Images à contraste de phase de cellules cultivées sur des multicouches terminées soit par le chitosan, soit par l'héparine à des différentes conditions de pH. Images à contraste de phase de cellules cultivées sur des multicouches terminées soit par le chitosan (a-c) soit par l'héparine (d-f) à des différentes conditions de pH : pH = 4 (a-d), pH alternatif entre 4 et 9 (b-e), pH = 9 (c-f) [211].

De même, Patabhi et al. ont étudié l'impact de la modification chimique par la technique de PEM sur la différenciation des CSMs en particulier la différenciation ostéoblastique en utilisant comme couple d'étude le couple PAH/PAA, le poly(allylamine hydrochloride) (PAH) c'est le polycation utilisé, et le polyanion est représenté par le poly(acrylic acid) (PAA). Ils ont montré l'aptitude du substrat des PEM construits par ces deux PE à la favorisation de l'ostéogénèse des CSMs ainsi qu'ils ont mis en évidence l'importance des effets du substrat sur l'organisation de la MEC et sur la biominéralisation [212] (figure 34). Il est important de noter qu'ils ont utilisé des multicouches suffisamment épaisses (des multicouches terminées soit par le PAH à 29 couches, soit par le PAA à 30 couches) et exigeantes pour telles différenciations, du fait qu'ils offrent une grande flexibilité pour l'ajustement des multicouches en réticulant les couches ainsi qu'ils présentent également des réponses viscoélastiques proches de celles des tissus vivants [213].

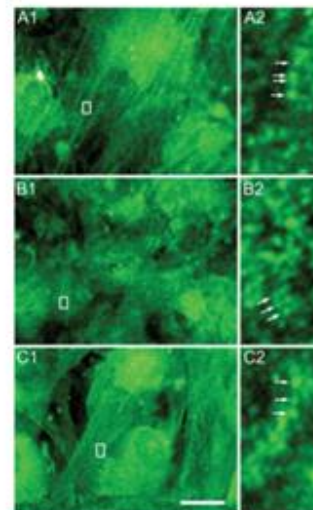
1

Surface	PAH-PEMU	PAA-PEMU	CS	TCP
ALP activity ^{1,2}	11.1 ± 1.0a	18.0 ± 1.9b	18.2 ± 1.7b	14.3 ± 1.0

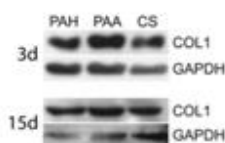
2



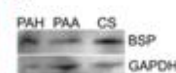
3



G



D



4

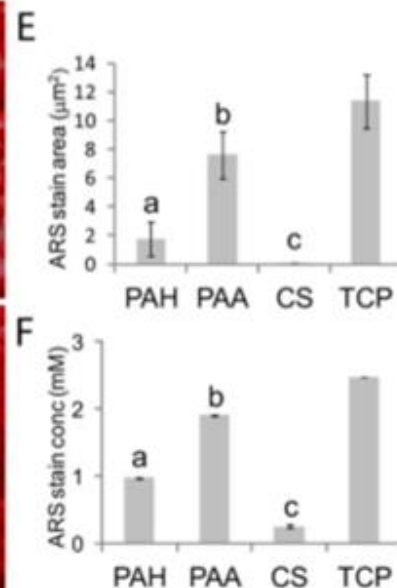
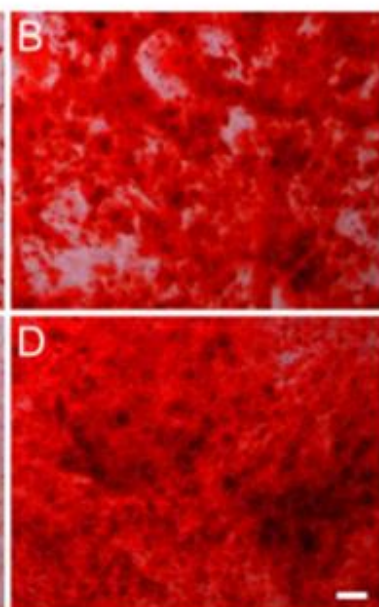
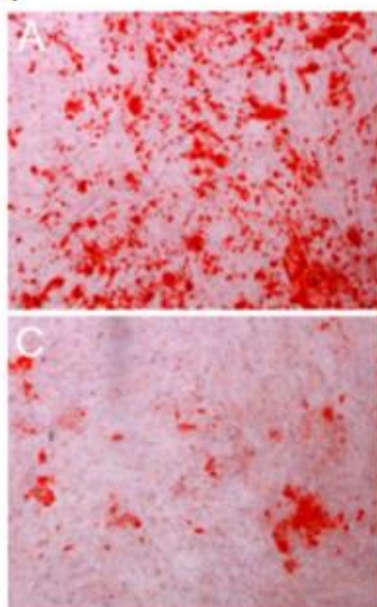


Figure 34: La biocompatibilité des substrats formés par les multicouches PAH / PAA réticulés pour l'ostéogénèse et la biominéralisation des CSMs [212].

(1) Tableau montrant l'activité d'ALP exprimée par les CSMs cultivées sur des multicouches thermiquement réticulées terminées soit par le PAH soit par le PAA, sur des CS et sur des TCP et qui sont induites avec BDM pendant trois jours.

(2) Images immunofluorescentes montrant la localisation du COL1 dans le MEC organisé par des CSMs induites par BDM et cultivées sur des multicouches thermiquement réticulées soit (PAH / PAA)₁₄PAH (A, 3

jours, B, 15 jours), soit (PHA / PAA)₁₅ (C, 3 jours, D, 15 jours), ainsi que sur des CS non revêtues (E, 3 jours; F, 15 jours). G : Analyse par Western blot de l'expression de COL1 sur les multicouches terminées soit par le PAH soit par le PAA et sur les CS au jour 3 et 15, l'expression de GAPDH est utilisée pour le contrôle.

(3) : (A1-C1) Immunolocalisation de BSP dans des cultures de CSMs induites par BDM pendant 15 jours sur: (A1) des multicouches thermiquement réticulées (PAH / PAA)₁₄PAH, (B1) des multicouches de (PAH / PAA)₁₅, et (C1) une surface de lamelle de verre non revêtue pour le contrôle. A2-C2: agrandissement des zones encadrées de A1-C1. D : Analyses par Western blot de l'expression de BSP après 15 jours d'induction des CSMs par BDM sur des surfaces de multicouches terminées par PAH, PAA, et CS, avec le GAPDH qui est utilisé pour le contrôle.

(4) : Biominéralisation des substrats par les CSMs induites par le BDM pendant 21 jours. Coloration à l'aide d'ARS de cultures sur: (A) multicouches thermiquement réticulées (PAH / PAA)₁₄PAH, (B) multicouches de (PAH/ PAA)₁₅, (C) une surface de contrôle de CS non revêtue, et (D) une plaque de plastique pour culture tissulaire. (E) et (F) : Zones d'images colorées par l'ARS et colorant ARS extrait des surfaces et tache d'ARS extraite des surfaces.

ALP : Alkaline Phosphatase, marqueur précoce de différenciation ostéoblastique. TCP : Tissue Culture Plastic, plastique de culture cellulaire. CS : coverslip, lamelles de verre. BDM : Bonne Differentiation Medium, milieu de différenciation osseuse. CSMs : cellules souches mésenchymateuses. MEC : Matrice extracellulaire. COL1 : collagène de type I. GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. BSP : Bone Sialoprotein,, marqueur de différenciation des ostéoblastes à des stades avancés. ARS : Alizarin Red S : colorant utilisé pour évaluer les dépôts de calcium dans la culture cellulaire.

Pris ensemble, Les CSMs induites par le BDM ont exprimé des taux élevés d'ALP et du COL1, plus tôt sur les multicouches terminées par le PAA que sur les multicouches terminées par le PAH. Les cellules cultivées sur les deux types de multicouches ont exprimé le BSP, mais les cellules induites par le BDM ont organisé une localisation plus amorphe du COL I et plus dense de BSP sur les multicouches terminées par le PAA que sur les multicouches terminées par le PAH. Ces organisations distinctives de collagène I et de BSP de MEC sont en forte corrélation avec la plus grande biominéralisation des multicouches terminées par le PAA que sur les multicouches terminées par le PAH au jour 21 de l'induction de culture cellulaire par BDM. Alors, les résultats soulignent l'importance des effets du substrat dans l'organisation de MEC sur le comportement et la différenciation des CSMs.

Il a été constaté grâce à différents travaux et littératures que les propriétés physicochimiques des surfaces n'étaient pas les seules à être importantes, mais que la géométrie de la surface l'était également.

IV.2- Modifications géométriques

Les modifications géométriques (topographiques) s'effectuent d'une manière mécanique via des processus différents (exemple : lithographie électronique ou optique...) en vue de structurer une surface. La croissance des cellules peut être mise en évidence par l'étude de l'impact des nano/micro surfaces à chimie et géométrie contrôlées à la fois (surfaces patternées et fonctionnalisées).

Au niveau cellulaire, les connaissances sur l'impact de la topographie sur la manière de la réaction des cellules ne sont pas encore entièrement comprises. Récemment, il a été montré que les facteurs topographiques tels que la taille (telle que la largeur, l'espacement et la profondeur), la forme et l'arrangement géométrique peuvent exercer de forts effets sur de nombreux comportements cellulaires tels que l'adhésion, la migration, l'alignement et la différenciation. Alors que la microtopographie a principalement des effets sur la morphologie de la cellule entière, la nanotopographie est particulièrement impliquée dans les mécanismes de détection subcellulaire. La corrélation entre la taille de la topographie et les organites de détection cellulaires a été observée dans plusieurs études (figure 35) [214].

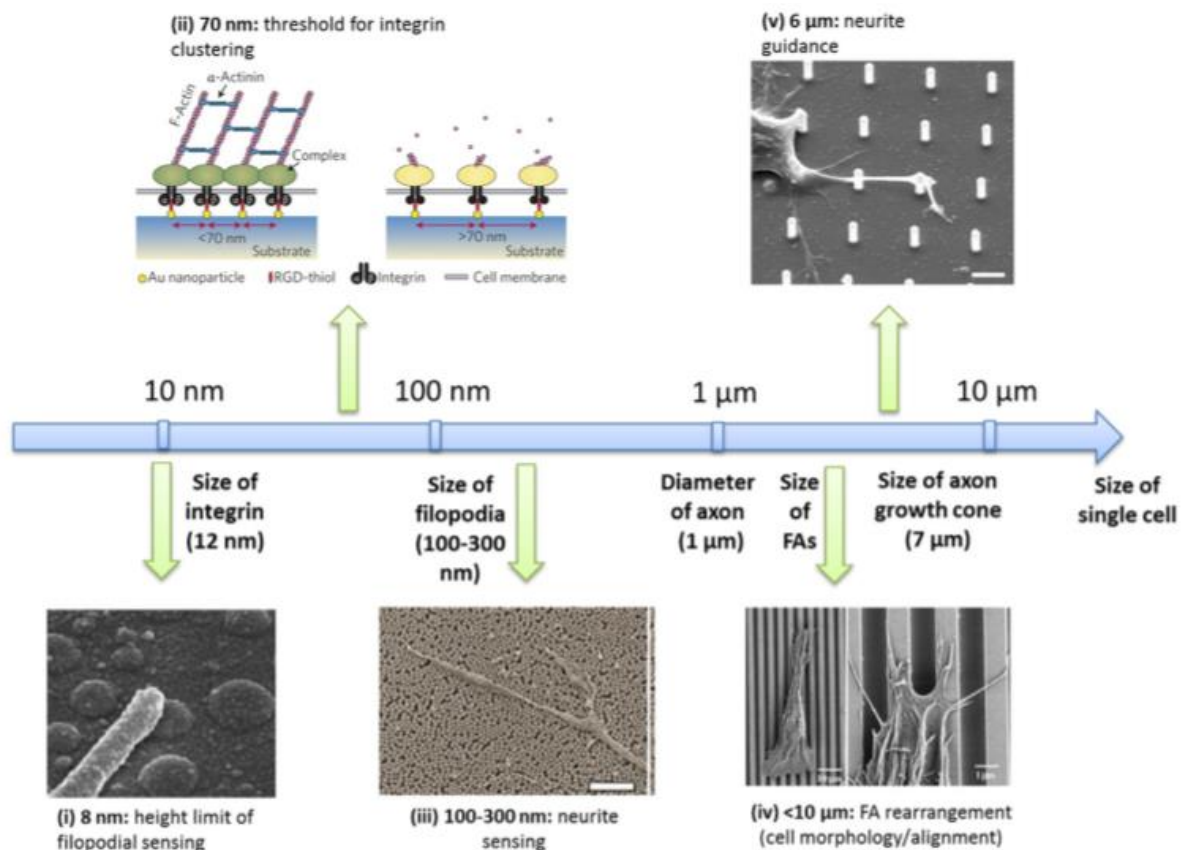


Figure 35: Corrélation entre la taille de la topographie du substrat et les organites de détection cellulaire [214].

(i) Détection des filopodes cellulaires des nanotopographies aussi haut que 8 nm. (ii) Assemblage des intégrines en un cluster lorsque leur espacement est inférieur à 70 nm. (iii) Les neurites sont sensibles à des nanotopographies supérieures à 200 nm. (iv) Réarrangement des adhérences focales est observé dans la gamme de taille inférieure à 10 μm . (v) 6 μm est la plus longue distance inter-pilier qui a un effet sur l'orientation des neurites.

IV.2.1- Surfaces à géométrie contrôlées : lithographie électronique

Flemming et al., ont défini le support à géométrie contrôlée comme une surface qui a subi des modifications physiques par photolithographie [215] ou par un autre procédé, permettant d'y imposer des motifs et des structures spécifiques. Ce type de surface permet d'observer et d'étudier la réponse cellulaire. Les supports à îlots (nanodots), à sillons, à puits et les supports à géométrie anisotropique [216] représentent des exemples des différents types de tels supports. Bien entendu, il existe de nombreux autres motifs de forme plus particulière. On peut parler encore d'un support à chimie et géométrie contrôlées, dans ce cas les caractéristiques intrinsèques sont déterminées par la structure et les motifs du support d'une part, et par les traitements chimiques (dépôts, greffages, etc.) réalisés à sa surface d'autre part.

On peut distinguer ainsi plusieurs paramètres ayant un rôle direct ou indirect dans l'architecture de telles surfaces, ce sont des paramètres mécaniques et géométriques. Les interactions physiques de la MEC avec les cellules contribuent au contrôle de l'activité des CS telles que : les propriétés mécaniques et la topographie de la MEC ainsi la forme de la cellule. Une revue récente expose précisément la réaction de la MEC à des stimulations mécaniques (mechanosensing) et les mécanismes résultants à l'intérieur de la cellule, en particulier en ce qui concerne les forces cytosquelettiques et les propriétés mécaniques nucléaires [217].

La rigidité est parmi les plus importantes propriétés mécaniques de la MEC ayant une grande influence sur la détermination du destin et du comportement cellulaire (figure 36). Elle est l'objet de plusieurs études in vivo et in vitro. In vivo, la diminution de la rigidité musculaire en collagène VI chez les souris induit une réduction de l'auto-renouvellement des cellules souches dans leur niche cellulaire, cette diminution est corrigée par un greffage des fibroblastes [218]. Ainsi, plusieurs études in vitro ont mis en évidence le rôle de la rigidité du substrat. La rigidité mécanique de la MEC affectent le comportement cellulaire, tel que la migration [219], la prolifération [220] et l'apoptose [182]. Saha et al., 2008 ont montré que des substrats souples de l'ordre de 10 Pa inhibent la différenciation et l'allongement des cellules souches neuronales tandis que des substrats présentant une rigidité de 100 Pa ou plus

favorisaient la multiplication de ces cellules. D'autres études ont montré que l'utilisation d'un MEC souple ayant une rigidité proche de celle de la MO permet de maintenir les CSMs dans un état de repos tout en conservant le potentiel de différenciation et par suite de maintenir ces cellules pendant une longue durée [221].

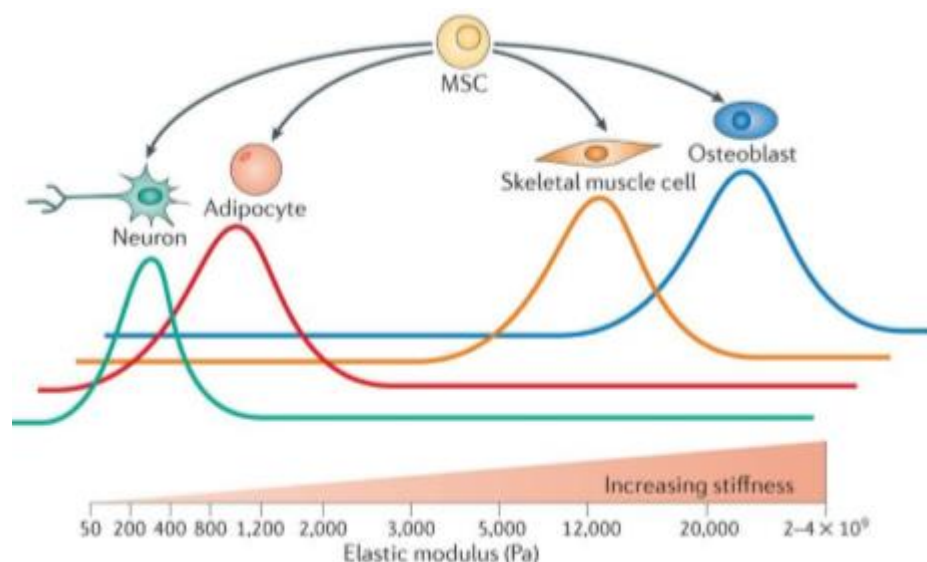


Figure 36: Influence des propriétés mécaniques et physiques de la MEC sur le comportement cellulaire [222].

Ainsi, la topographie (la géométrie et la taille) de la MEC peut avoir des importantes influences sur un grand nombre de comportements cellulaires, telles que l'adhésion, la migration et la prolifération. Il a été établi que l'espacement précis entre les îles d'adhésion sur un substrat permet la régulation de regroupement des intégrines, de l'adhésion focale et de l'organisation des fibres d'actine et par suite la modulation de l'adhésion et l'étalement cellulaire [223]. En plus, il a été montré que la topographie de la MEC peut modifier la morphologie et la prolifération des CS embryonnaires humaines à travers le cytosquelette. Un alignement et un allongement des cellules souches embryonnaires a été induit par un substrat de polydiméthylsiloxane (PDMS) avec caillebotis de 600 nm d'espacement [224]. Par exemple, chez la drosophile, la topographie entourant leurs CS, en particulier la topographie de leur support a été montré, par plusieurs études, qu'elle participe à la régulation de la prolifération des CS [225]. Des résultats similaires ont été observés lors du contrôle de l'auto-renouvellement et de la différenciation des cellules souches chez *C. Elegans* [226].

Aussi, Certaines études utilisant des indices nanométriques ont révélé comment la topographie peut influencer la différenciation des CSMs in vitro. Dalby et al. ont induit une différenciation ostéoblastique chez les CSMs humaines en utilisant une topographie de la surface d'un ordre nanométrique et sans ajouter des suppléments ostéogéniques [230, 231].

En plus, en présence d'un milieu ostéogénique, Engel et al. ont pu montrer l'effet synergique des microstructures sur la différenciation des CSMs en ostéoblastes matures [229].

Enfin, les cellules ont la capacité de détecter les indices géométriques de leur microenvironnement (la topographie de la surface, la rugosité, la rigidité ou d'autres paramètres), ce qui nous permet de dire que le facteur de forme des cellules peut être un puissant régulateur de la croissance et de la différenciation cellulaire. Depuis longtemps, en 1991, il a été montré par Ingber, que le changement de la forme des cellules endothéliales induit par la MEC, a une grande influence sur leur prolifération et leur différenciation [230]. Ainsi, certaines études ont montré que le devenir CS peut être influencé grâce à un contrôle de leur forme par la MEC, les interactions entre de plusieurs facteurs extrinsèques et intrinsèques, ou par d'autres paramètres mécaniques [234–236]. Prenant par exemple la différenciation chondrocytaire des CS. Des études ont pu montrer que la forme arrondie des cellules souches adultes ou embryonnaires est une exigence pour la différenciation des cellules en chondrocytes [237]. En effet, l'expression des marqueurs moléculaires de la chondrogenèse augmente dans le cas des CSM dérivées de la MO ayant les noyaux plus arrondis [233] ainsi que celles dérivées du tissu adipeux cultivées en 3D dans des biomatériaux à base d'agarose ou d'alginate et qui ont encore un phénotype arrondi [234].

Lithographie électronique

En sciences des matériaux, les techniques de nanofabrication permettent d'une part, la synthèse de nouveaux matériaux qui présentent par leur nouvelle structure des propriétés entièrement différentes des matériaux conventionnels et d'autre part, la reproduction des interactions ou des comportements existants déjà dans certains matériaux. Ces matériaux néosynthétisés n'existent pas dans la nature et étendent les limites et les propriétés de certains systèmes. Il existe plusieurs techniques de nanofabrication citons par exemple : la lithographie électronique, la lithographie optique ou photolithographie, lithographie par microscopie champ proche, nanoimprint, les différentes techniques de micropatterning... Dans notre travail la lithographie électronique est la méthode utilisée pour modifier géométriquement les surfaces afin d'étudier et contrôler les comportements cellulaires.

Par définition, la lithographie électronique est une technique permettant de réaliser des motifs haute résolution allant jusqu'au nanomètre à partir d'un film de résine photosensible. Le principe de lithographie électronique est basé sur l'adressage d'un faisceau électronique par un logiciel qui permet de reproduire dans la résine le motif choisi par l'opérateur (figure 37). La haute résolution de ce type de lithographie rend la technique lente puisque le faisceau d'électrons dessine progressivement le motif à transférer. La détermination de la résolution

ne repose pas uniquement sur la taille du spot du faisceau mais encore sur l'interaction électron-matière dans la résine notamment et le substrat dont il faut tenir compte surtout lorsque les motifs sont très proches [235].

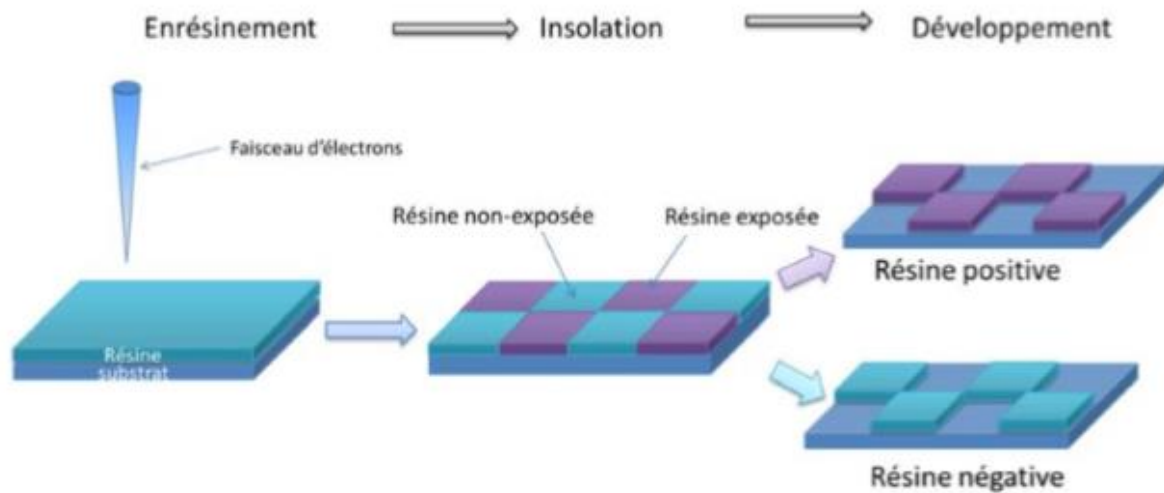


Figure 37: Schéma représentant la lithographie électronique. L'insolation de la résine est assurée par l'utilisation d'un faisceau d'électrons [236].

Des modifications chimiques et structurales de la résine sont provoquées suite à l'exposition de celle-ci au faisceau d'électrons, aussi cette exposition provoque des différences de solubilité ou de vitesse d'attaque chimique de la résine entre zones exposées et non-exposées. Le motif dessiné lors de l'exposition pourra donc être révélé par différence de solubilité. En lithographie électronique, la dose est définie comme étant la quantité de charges déposées sur la résine. Ce facteur est précisé initialement et dépend essentiellement de la taille et l'environnement du motif ainsi de la résine.

IV.2.2- Impact des modifications géométriques

L'influence des modifications géométriques du support a été étudiée, grâce au développement d'une nouvelle méthode de création des nanostructures sur les surfaces comme les montre la figure 38 où des différentes nano-topographies sont présentées (figure 38 a : nano-lignes, figure 38 b : nano-îlots). La forme de la surface, en terme de nanostructures, a été montré pour planifier un rôle important de poursuite de l'évolution cellulaire, en vue qu'elles ensemble influencent la forme cellulaire. Comme par exemple, Hsu et al., ont développé deux supports différents, le premier présente des sillons dans lequel le cytosquelette des cellules aura tendance à s'organiser en parallèle, leur conférant une morphologie allongée, alors que le deuxième est développé avec des îlots susceptible de confiner les cellules et de les maintenir arrondis (Figure 38) [240, 241] comme montré par Cheng et al.[238].

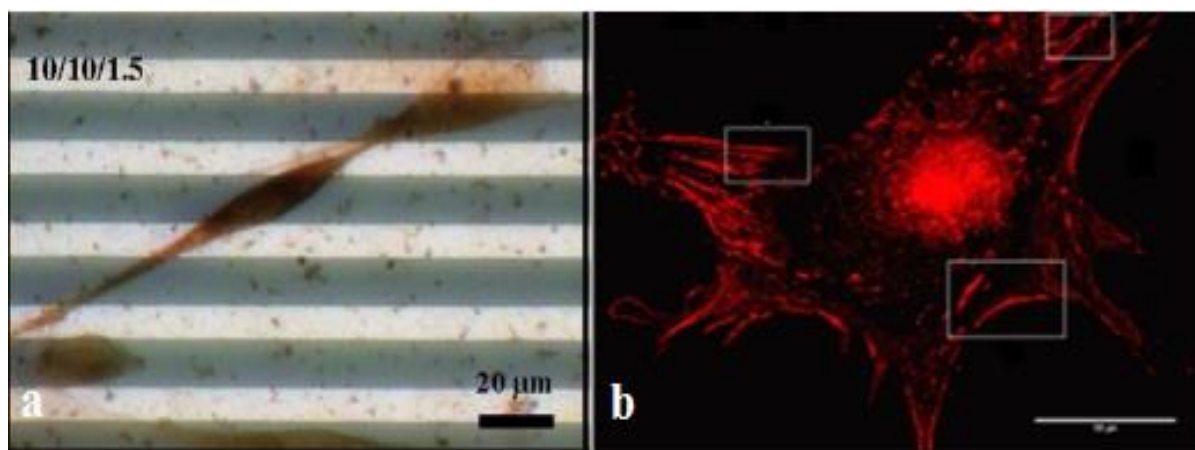


Figure 38: Micrographies optiques (a) [237] et images de fluorescence (b) [238] respectivement sur le support présentant les sillons et le support présentant les îlots montrant la différence de forme des cellules.

Les CSMs, selon que leur forme est arrondie ou aplatie se différencient davantage en adipocytes ou en ostéoblastes lorsqu'on les expose à un milieu contenant les facteurs de différenciation des deux types cellulaires. En effet, Zhang et al. ont montré que les cellules cultivées sur de larges îlots s'étalent et présentent des marqueurs plus spécifiques de la lignée ostéoblastique alors que celles qui sont confinées sur de petits îlots s'orientent préférentiellement vers la voie adipocytaire. En plus, les cellules maintenues dans une forme arrondie, et dont le cytosquelette subit peu de tension, conservent plus longtemps leur caractère multipotent [239]. Alors la forme des cellules modifie l'organisation du cytosquelette ce qui facilite l'une ou l'autre voie de différenciation.

Donc et comme présentée plus haut, géométrie du support (la structure et les motifs du support) vont donc être importants puisqu'ils influencent à la fois la forme des cellules et l'affinité de la cellule avec son ligand qui à son tour module le degré de tension exercée sur son cytosquelette. Tous ces paramètres combinés orientent le comportement cellulaire et prédéterminent le destin de la cellule.

Lee et al., ont associé certaines cellules exprimant des marqueurs d'adipogenèse (p-par γ) et de la neurogenèse (beta3 tubulline). La figure 39 montre que les cellules qui adoptent une morphologie arrondie la plupart du temps ont tendance d'exprimer des marqueurs adipogéniques, alors que les cellules qui ont une morphologie étendue (allongée) et ont une tendance à l'étalement cellulaire montrent une expression plus élevée des marqueurs de neurogenèse [240].

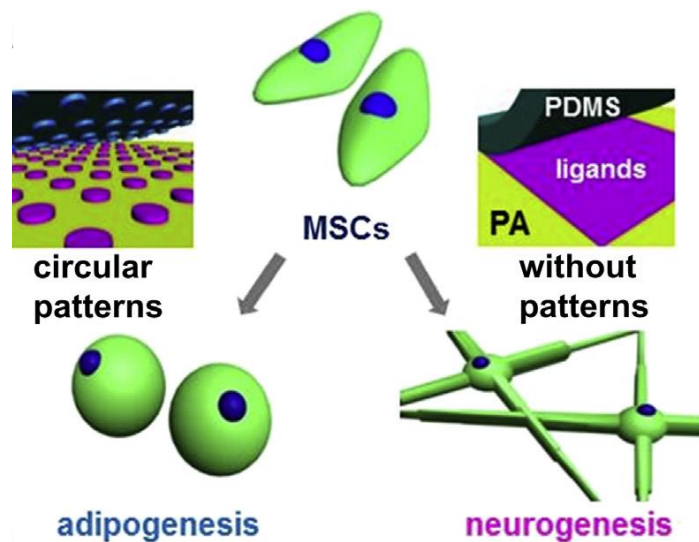


Figure 39: Combinaison de caractéristiques géométriques et de ligands d'adhésion orientant la différenciation vers des lignées adipocytaires et neuronales [240].

L'hypothèse de cette équipe est illustrée dans la figure 40. Cette figure présente le destin des CSMs sur un hydrogel polyacrylamide mince avec ou sans des contraintes géométriques. Il a été démontré que dans le cas où il y a des géométries identiques dans toutes les directions, l'étalement cellulaire est limité favorisant une grande expression des marqueurs adipogéniques par rapport aux cellules qui peuvent se propager.

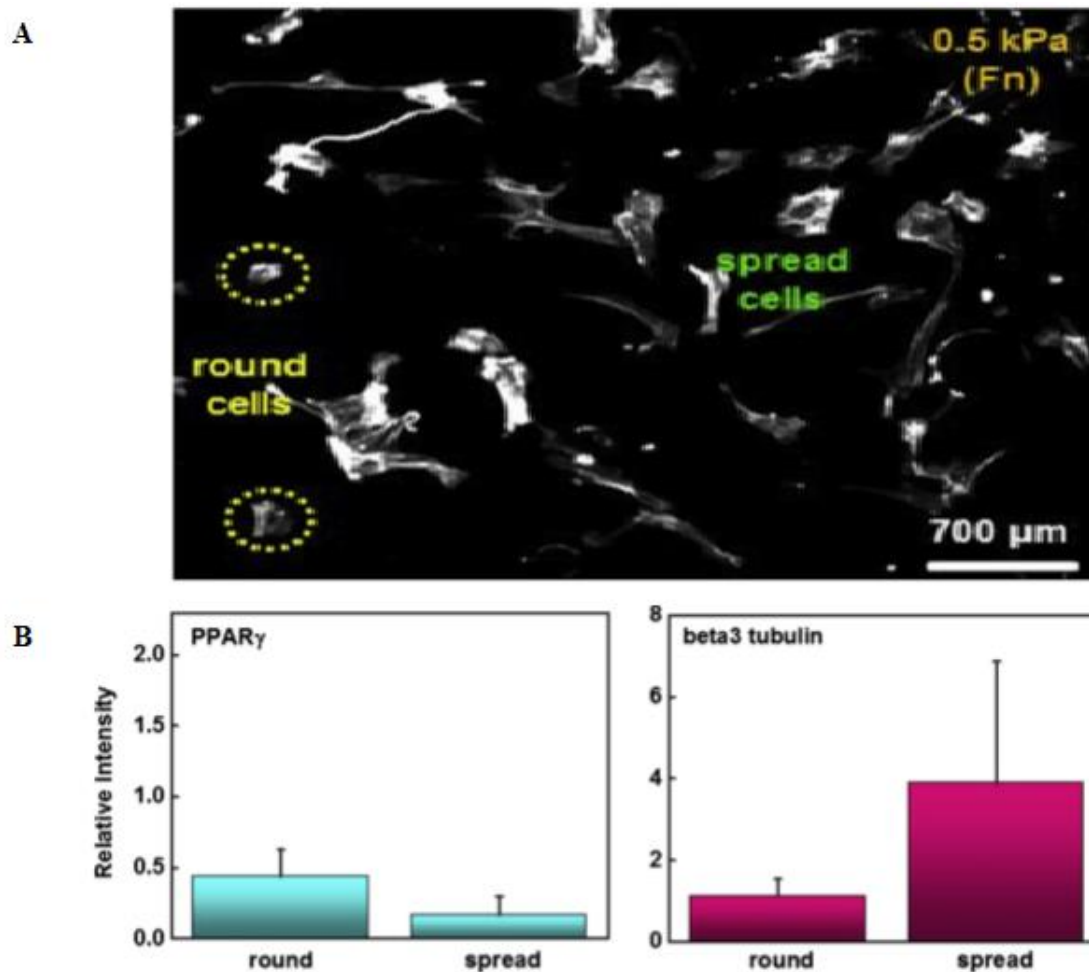


Figure 40: L'étalement cellulaire affecte le degré de spécification de la lignée adipogénique et neurogénique [240].

(A) images d'immunofluorescence de CSMs adhérents sur des substrats non patternés avec de fibronectine montrant des cellules rondes et autres étalées. (B) Expression des marqueurs adipogéniques (gauche, PPAR γ) et neurogéniques (droite beta3 tubulin) démontrant l'influence de l'étalement sur la différenciation cellulaire.

Des efforts significatifs ont été dirigés vers la compréhension des facteurs qui influencent la différenciation des CS vers une lignée ou vers une autre. Kilian et al ont publié un travail très intéressant en 2010, où ils ont montré qu'avec la même chimie de surface, des différentes différenciations de CS pouvaient être obtenues et plus précisément, l'ensemble de ce travail souligne que la forme cellulaire, indépendante des facteurs solubles, a une forte influence sur la différenciation des CSMs humaines de la MO [241]. Suite à l'exposition des cellules cultivées en forme rectangulaire avec des ratios (longueur/largeur) croissants et des cellules présentant une symétrie pentagonale mais des courbures subcellulaires différentes (forme de fleur, forme pentagonale, forme d'étoile), à des signaux de différenciation solubles concurrents, elles montrent des différentes orientations soit adipogéniques, soit ostéogéniques (figure 41 A et B).

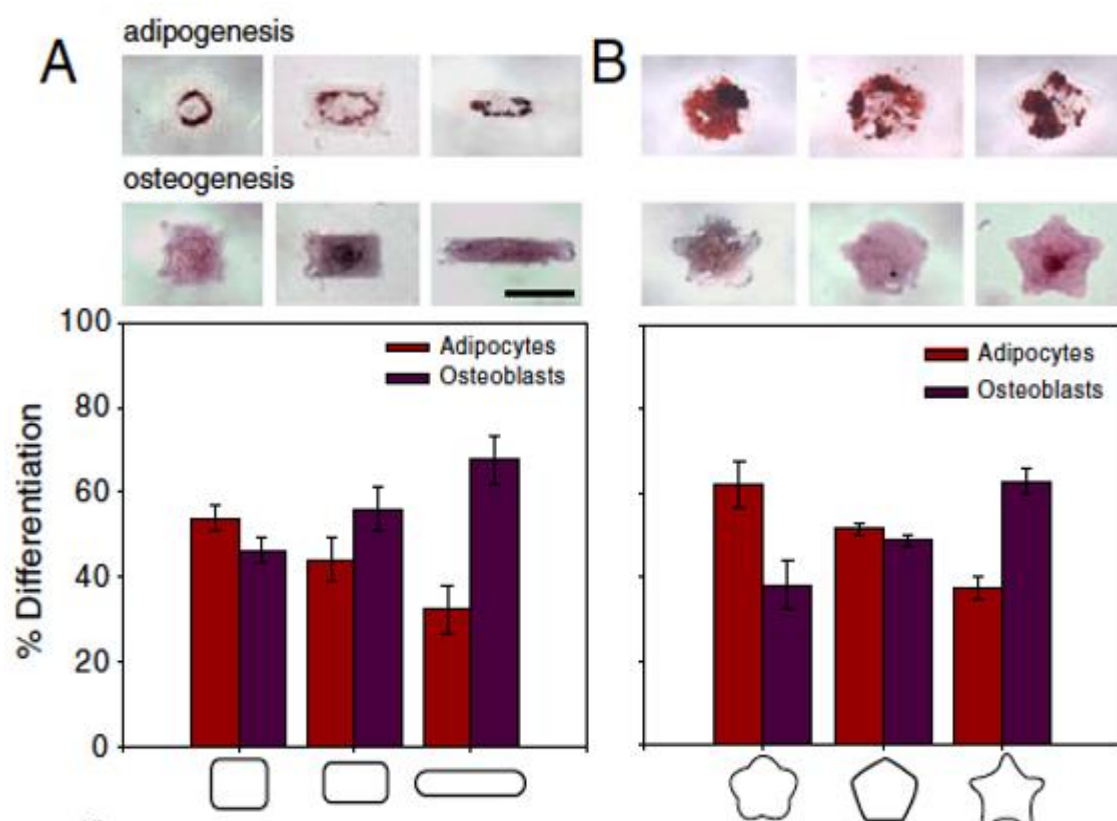


Figure 41: (A) Pourcentage de cellules en forme rectangulaire et de ratio croissant différenciées en ostéoblastes ou adipocytes. (B) Pourcentage de cellules en forme de fleur, forme pentagonale et forme d'étoile différenciées en l'un ou l'autre des deux lignées [241]

Ainsi, Les résultats de ce travail révèlent que les caractéristiques géométriques qui augmentent la contractilité de l'actomyosine (myosine IIa qui est la protéine motrice primaire responsable de la contractilité cellulaire) et par suite la contractilité du cytosquelette favorisent l'ostéogénèse. Ces résultats sont compatibles avec des observations précédentes démontrant que les substrats rigides favorisent l'ostéogénèse [186,245]. La figure 42 A montre qu'une forme circulaire des cellules favorise l'adipogénèse tandis que les cellules ayant une augmentation de contractilité de cytosquelette favorisent l'ostéogénèse, cette différence du destin de ces deux formes de cellules est approximativement similaire de celle observée dans le cas des cellules en forme d'étoile (ostéogénèse) et de fleur (adipogénèse) où le chemin (en termes de mécanotransduction) de la différenciation en ostéogénèse des cellules en forme d'étoile est représenté dans la figure 42 B .

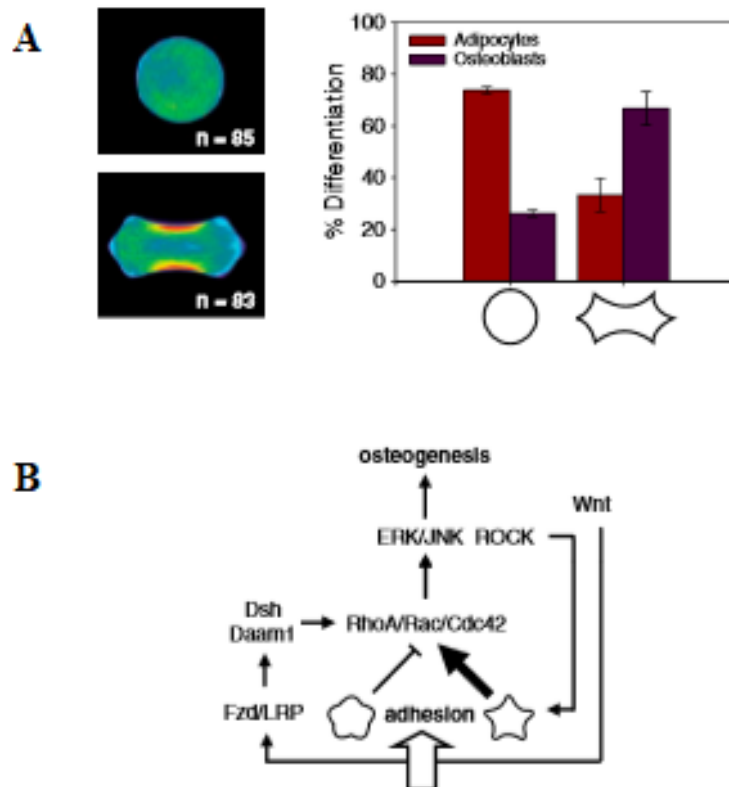


Figure 42: Destin de différenciation cellulaire selon la contractilité des cellules. Images d'immunofluorescence de localisation de Myosin IIa de forme circulaire et contractile des cellules (A : gauche), pourcentages de différenciation des cellules de deux formes (A : droite). (B) voie ostéogénique des cellules contractiles (forme étoile par exemple) en favorisant l'activation de JNK (c-Jun N-terminal kinase) et de ERK1/2 (extracellular related kinase) associée à une élévation de la signalisation Wnt (wingless type) [244].

IV.3- Modifications biologiques

La modification biologique ou biofonctionnalisation agit au niveau protéique pour contrôler les différentes réponses cellulaires et tissulaires. Elle s'effectue par la fixation des protéines d'adhérence (ex: la FN...) ou des motifs peptidiques (tableau 13) reconnus spécifiquement par des récepteurs cellulaires (ex : les Ig comme $\alpha\beta3$) favorisant par suite la fixation des cellules sur le support [243].

Tableau 13: Quelques séquences peptidiques capables de promouvoir l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire [244].

RGD	Arg-Gly-Asp
REDV	Arg-Glu-Asp-Val
SVVYGLR	Ser-Val-Val-Tyr-Gly-Leu-Arg
YIGSR	Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg
WQPPRARI	Trp-Gln-Gln-Pro-Pro-Arg-Ala-Arg-Ile

IV.3.1- Mécanismes cellulaires essentiels de contrôle de la réponse cellulaire

La MEC a un rôle important de transmission des signaux extracellulaires à la cellule qui les intègre en induisant des voies de signalisation et des réponses cellulaires adaptées aux propriétés du microenvironnement. En fait, la cellule est capable de percevoir des signaux mécaniques exerçant sur elle et autour d'elle (étirement, pression, rigidité du support), des signaux solubles (facteurs de croissance) et insolubles matricielles (FN, collagène...), ainsi que des modifications d'ordre biologiques (ligands spécifiques), chimiques, et structurales de son environnement à l'échelle nanométrique (figure 43). La détection de ses variations repose sur des différents mécanismes faisant appel aux molécules d'adhésion et au cytosquelette [239] et induisant des changements dans la cellule via diverses voies de signalisation : c'est la mécanotransduction.

Par définition, la mécanotransduction étant un procédé permettant de transformer des signaux mécaniques en signaux biochimiques, elle est considérée comme l'une des premières, si ce n'est la première forme de perception cellulaire. A ce titre, elle a reçu une attention toute particulière et de nombreux efforts sont faits pour mieux comprendre son fonctionnement. Au niveau moléculaire, il existe de nombreuses voies de signalisation qui ont été identifiées en mécanotransduction, y compris les voies Ras/MAPK, PI3K/Akt, RhoA/ROCK, YAP/TAZ, Wnt/ β -catenin, ou TGF- β pathways [249 – 251] (Figure 44).

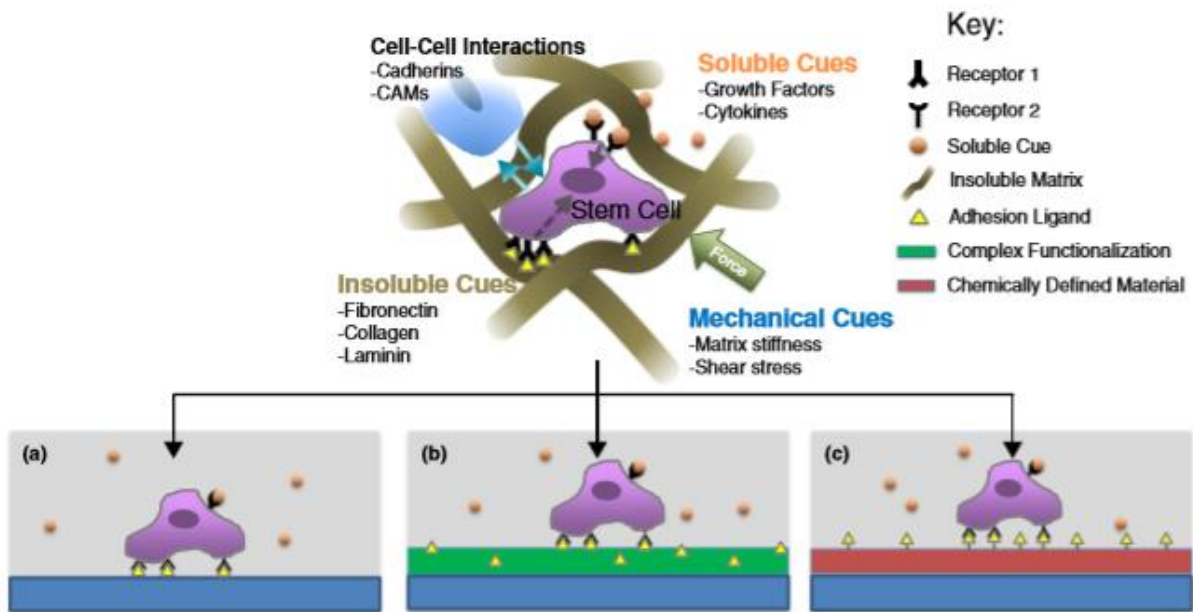


Figure 43: Schéma représentant les différents aspects du microenvironnement cellulaire [245].

(a) Adhésion des cellules à des ligands d'adhésion adsorbés sur des surfaces non traitées et leur interaction avec des signaux solubles. (b) Complexe de la fonctionnalisation biologique (vert) via des signaux insolubles dérivés de la MEC. (c) Matériaux chimiquement fonctionnalisés (rouge) permettent une présentation adaptée des ligands bioactifs.

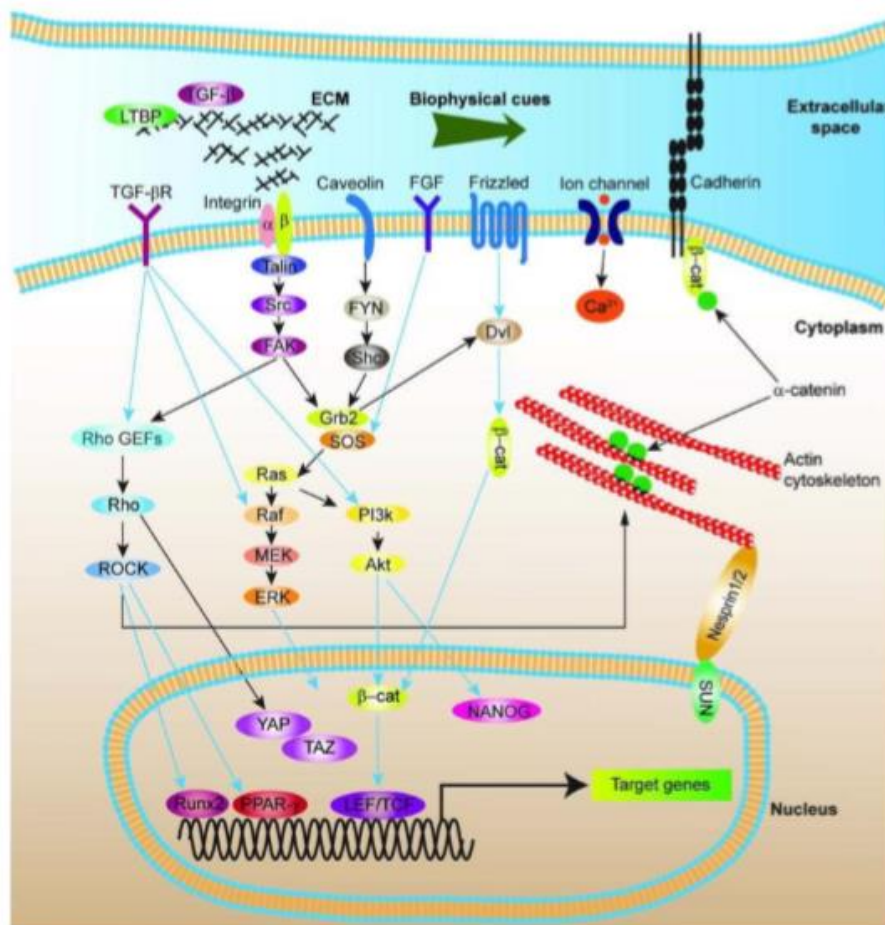


Figure 44: Les voies de signalisation induites lors de la mécanotransduction (flèches noires) interférées avec les voies de signalisations médiées par les facteurs solubles (flèches bleues) qui participent à la régulation du destin cellulaire [248].

Plusieurs acteurs ont déjà été identifiés, parmi lesquels les intégrines, les cadhérines, les canaux ioniques activés par l'étirement (Stretch Activated ion Channels : SACs), le cytosquelette et le noyau.

Les intégrines sont au cœur de la transmission des signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (outside-in) mais également de l'intérieur vers l'extérieur (inside-out) (figure 45). Ce sont des protéines transmembranaires participant à l'adhésion des cellules avec la MEC et servant de trait d'union avec le cytosquelette par l'intermédiaire de protéines de liaison de l'actine (Actin Binding Proteins : ABPs). La liaison d'une Ig avec son ligand est d'abord faible puis se renforce sous l'action des contraintes exercées sur elle. Dans un premier temps, et en présence de ces forces, l'Ig passe à une conformation de plus haute affinité (forme active), permettant de stabiliser l'interaction. Cette réponse de l'Ig est plus efficace si la contrainte est appliquée rapidement ou si elle est cyclique. Des protéines des complexes d'adhésion focale comme la vinculine, taline, kindlin sont également recrutées. Dans un second temps, d'autres Ig de haute affinité vont être recrutées à leur tour pour interagir localement avec les protéines extracellulaires au niveau de la liaison, ce qui renforce le complexe d'adhésion focale. Ces adhésions focales vont ainsi transmettre des signaux biochimiques par l'intermédiaire de RhoA GTP, de c-src et de la Focal Adhesion Kinase (FAK) et entraîner une modulation de l'organisation et de la contraction du cytosquelette [249]. L'activation des Ig est dépendante de la présence de cations divalents (magnésium, calcium ou manganèse), leur conformation est inactive, et leur liaison au ligand est très faible en cas d'absence de liaisons de ces ions [56].

Les cadhérines sont également des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire mais participent aux interactions des cellules entre elles. Soumises à des contraintes, elles répondent de façon similaire aux Ig, en changeant de conformation et en recrutant d'autres cadhérines pour former des clusters très semblables aux complexes d'adhésion focale des intégrines. La kinase de la chaîne légère de la myosine II (Myosin II Light Chain Kinase : MLCK) et ROCK (RhoAssociated Protein Kinase) joueraient un rôle essentiel dans le renforcement des liaisons des cadhérines et dans le recrutement des clusters, notamment en activant Rho et en phosphorylant la chaîne légère de la myosine II (MLC) [250].

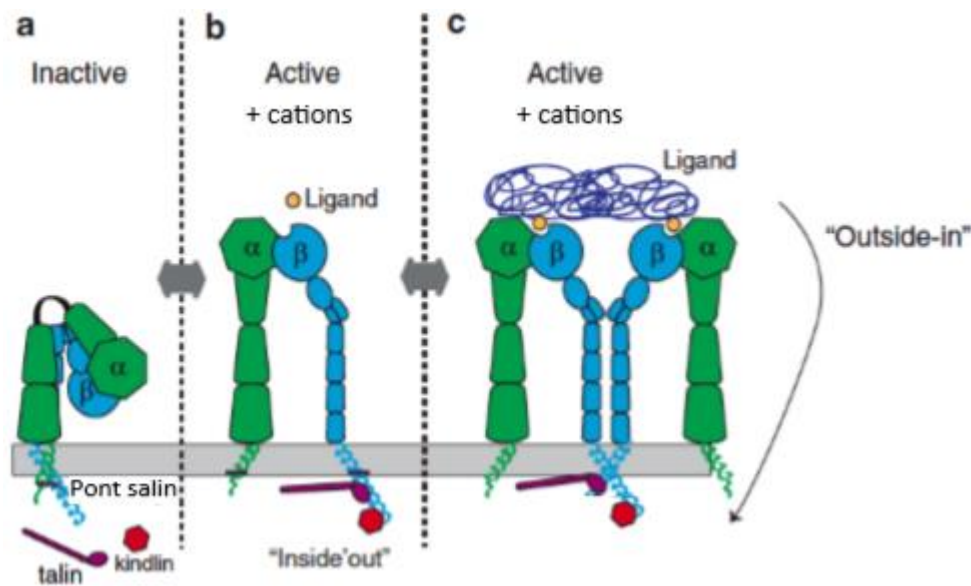


Figure 45: Activation des intégrines [56].

(a) Conformation inactive des intégrines en absence des cations divalents. (b) Signalisation inside-out : la conformation des intégrines est active grâce à la présence des cations. La liaison des protéines taline et kindline aux intégrines leur facilite d'acquérir une conformation active d'une part et leur liaison aux ligands d'autre part. (c) Signalisation outside-in : recrutement et regroupement des intégrines.

Les canaux activés par l'étirement sont des canaux calciques transmembranaires répondant aux contraintes mécaniques. Ils s'ouvrent en réponse à un étirement et permettent un influx d'ions calciques dans le cytoplasme de la cellule. Ils seraient responsables de l'induction d'un certain nombre de mécanismes physiologiques ou pathologiques dépendants du calcium dans la cellule. Ils sont notamment soupçonnés de participer à la transformation cancéreuse, à l'activité métastatique et la migration cellulaire. Vladislav et al. ont déterminé en 2014 qu'ils pourraient entraîner une signalisation via les canaux potassiques dépendants du calcium. Il est également envisageable que cet influx de calcium soit pris en charge par la calmoduline et régule la MLCK, entraînant par une voie de signalisation la contraction de l'actinomyosine et le remodelage cellulaire [251].

Le cytosquelette est composé de nombreuses molécules dont l'actine ainsi que de protéines liées à l'actine (ABP). Il donne sa morphologie à la cellule et subit les forces exercées sur elle. Il est lié indirectement à certaines molécules membranaires comme par exemple au niveau des adhésions focales et il constitue les fibres de stress [252]. Sous l'action des contraintes mécaniques ou via les signalisations force-dépendantes décrites plus haut, le cytosquelette va se remodeler et donc changer l'architecture de la cellule [253]. Le noyau traite des signaux intracellulaires issus de stimuli mais peut répondre directement aux contraintes mécaniques par l'intermédiaire de son « squelette ». Il possède un réseau de

lamines sous sa membrane interne qui se lie à des protéines transmembranaires (comme LAP2, emerine...) et à l'hétérochromatine. La déformation du cytosquelette va avoir un impact directement sur la structure du noyau par les contraintes mécaniques qu'elle exerce sur les complexes LINC (Linkers of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) comme les trimères de SUN et va entraîner des changements de conformations de protéines qui pourront engendrer des interactions altérées, ou provoquer la dépolarisation des lamines nucléaires et donc un remodelage de la chromatine. Fedorchak et al. ont remarqué que les facteurs de transcription induits par les forces (lex-1, Egr-1 ou Pai-1 par exemple) étaient moins exprimés en l'absence de lamines A ou C [254].

Donc, la transmission des signaux de l'environnement extracellulaire (mécaniques, topographiques, biochimiques, électriques) vers la cellule en mettant en place des voies de signalisation intracellulaire induit des différents comportements et réponses cellulaires. Les réponses cellulaires aux différents signaux extracellulaires sont variées: adhérence, étalement, différenciation, prolifération, migration et autres. L'adhérence et l'étalement sont des processus d'attachement des cellules à leur support, et d'induction à la cellule les premiers signaux de survivre [258,259]. La différenciation est un processus par lequel une cellule se spécialise en un type cellulaire spécifique [257]. La prolifération permet aux cellules adhérentes et différenciées de se multiplier. Alors que la migration correspond au processus permettant le déplacement des cellules en fonction des caractéristiques du microenvironnement matriciel [258].

IV.3.2- Protéines de la matrice extracellulaire

En 1948, la FN est découverte sous le nom de « cold-insoluble protein » [259]. Elle est une des macromolécules constituant les MEC et une des premières protéines reconnue par sa grande importance structurellement et fonctionnellement [263, 264].

La FN est une glycoprotéine matricielle d'un poids moléculaire variant de 420 à 500 kDa en fonction des glycosylations qu'elle absorbe et des épissages alternatifs qu'elle subit. Elle est constituée de deux sous-unités homologues reliées entre elles par deux ponts disulfures au niveau du domaine carboxy-terminal. Chaque sous-unité est constituée de domaines de type I (douze modules), II (deux modules), III (quinze modules) qui sont repliés en modules globulaires [48]. Ces trois types de module sont tous repliés en feuillets β antiparallèles intramoléculaires renfermant un cœur hydrophobe [262]. Ainsi, elle possède trois domaines d'épissage alternatif appelés EDA (extradomaine de type III A), EDB (extradomaine de type III B) et le domaine variable IIICS (type III connecting segment) (Figure 46 A).

Cette protéine subit des modifications post-traductionnelles ayant une importante influence sur le comportement cellulaire : la phosphorylation, la glycation, et la glycosylation. La fibronectine intervient dans la régulation des différents comportements cellulaires et dans la stabilisation et l'organisation de la MEC grâce à ses séquences d'interaction qu'elle possède avec les autres constituants moléculaires de la MEC, elle-même, ainsi des séquences d'interaction avec les récepteurs cellulaires. Ces dernières lui permettent d'interagir avec les cellules du microenvironnement.

L'interaction de la FN avec les cellules se fait par l'intermédiaire des récepteurs cellulaires tels que les Ig, les syndécanes, et la transglutaminase. $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha \text{IIb}\beta 3$, $\alpha \nu\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha \nu\beta 5$, $\alpha \nu\beta 6$, $\alpha \nu\beta 8$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 8\beta 1$, ce sont les Ig qui permettent l'interaction entre le module III10 de la fibronectine et les cellules [59, 266]. Les Ig $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$ et $\alpha \text{IIb}\beta 3$ permettent également l'association des cellules avec le module juxtaposé III9 (figure 46 B) [264] et les Ig $\alpha \nu\beta 3$ et $\alpha 5\beta 1$ interagissent avec le module I5. L'Ig $\alpha 4\beta 1$ interagit avec le module III14 et l'Ig $\alpha 9\beta 1$ avec le module EDA [67, 268]. Le module IIICS est reconnu par les Ig $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 4\beta 7$ ainsi les modules III₁₂₋₁₄ sont reconnus par les syndécanes présents à la surface cellulaire [266].

Alors il existe une importante variété des Ig qui reconnaissent la FN mais les Ig $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha \nu\beta 3$ restent parmi les principaux récepteurs liant la FN à côté syndécanes-4. La séquence RGD (Arginine-Glycine Aspartate) située dans le module III10 est reconnue par les Ig $\alpha 5\beta 1$ et la séquence flanquante PHSRN (Proline-Histidine-Serine-Arginine-Asparagine) qui se trouve dans le module juxtaposé III9 [267]. Ainsi, la famille des syndécanes regroupe quatre membres, la fibrillogénèse de la FN et l'adhérence des cellules à la FN s'effectuent via les syndécanes-2 [271, 272]. La formation des structures d'adhérence est initiée par l'interaction de la FN avec les Ig et les syndécanes-4 [270]. Enfin, la transglutaminase (TGase) sert également à l'interaction cellule-FN, il sert comme un récepteur contribuant à l'assemblage fibrillaire de la FN [271].

En conséquence, via ces interactions la FN régule le comportement cellulaire.

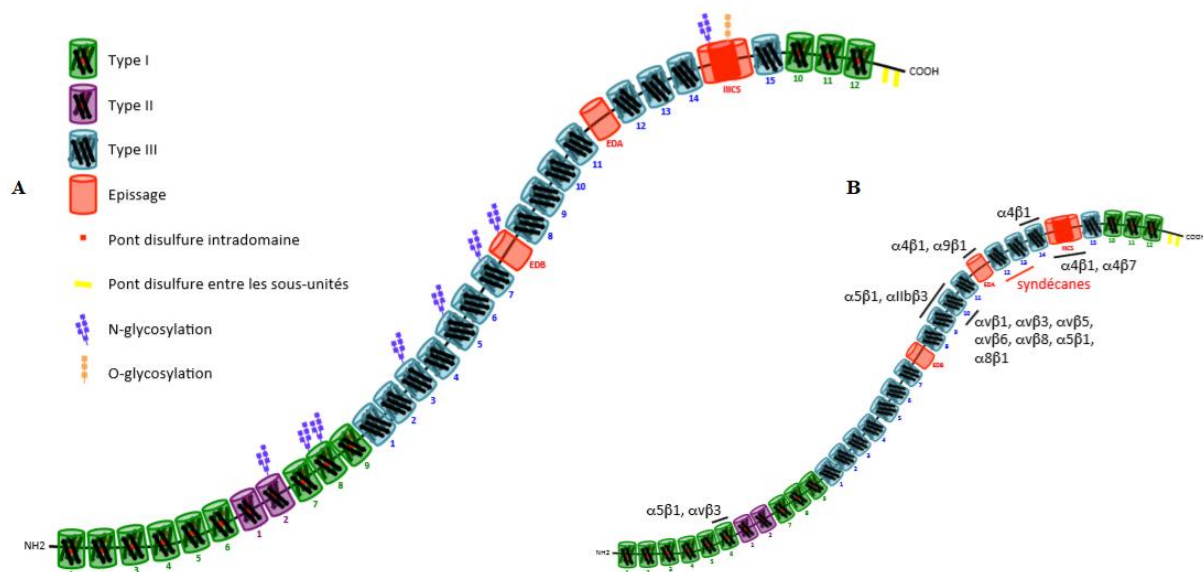


Figure 46: (A) schéma représentant la structure d'un monomère de la fibronectine. (B) schéma représentant les séquences d'interaction cellules-fibronectine [48].

La FN peut présenter sous forme soluble par exemple la FN plasmatique sécrétée par les cellules endothéliales et les hépatocytes ou bien sous forme insoluble dans la MEC, c'est alors la FN tissulaire sécrétée par les cellules endothéliales et épithéliales, les fibroblastes, les CML, les chondrocytes. Et comme mentionne précédemment, Elle présente de nombreux sites de liaison, soit pour des protéines de la MEC (comme, la thrombospondine le collagène), soit pour des récepteurs membranaires (les intégrines), des GAGs (l'héparine et le chondroïtine-sulfate) ou bien pour des protéines du sang circulant (la fibrine) [31].

En plus de son rôle majeur dans l'adhérence cellulaire, elle intervient encore lors des communications cellulaires, l'embryogenèse (aide les cellules à migrer au cours du développement embryonnaire), dans des divers processus pathologiques (inflammation...) et physiologiques (cicatrisation...). Ainsi en se liant avec les récepteurs d'intégrines, elle permet l'activation des voies de transduction du signal amenant par suite à la modification du comportement cellulaire tels que migration, motilité, différenciation, prolifération [67]. Chatakun et al. en 2014, ont mis en évidence l'effet important de la FN sur les ostéoblastes du point de vue de l'adhésion, la prolifération, la différenciation et autres mécanismes [272]. En outre, il a été montré que la FN favorise le processus de la fibrillogénèse du collagène suggérant son rôle majeur dans la maturation de la MEC dans l'os [273].

En outre, les séquences oligopeptidiques actives de la plupart des protéines matricielles contiennent une séquence tripeptidique Arginine-Glycine Aspartate (Arg-Gly-Asp) à laquelle sont assignées des propriétés d'adhérence cellulaire. Parmi les propriétés de ce tripeptide est la forte affinité pour les récepteurs cellulaires de la superfamille des Ig, qui font partie des

CAM (cell adhesion molecules). L'équipe de C. Baquey (Inserm U.443), a montré que l'adhérence de cellules endothéliales est améliorée en cas de fixation de façon covalente des peptides contenant la séquence Arg-Gly-Asp sur une surface de silice [274], les mêmes résultats sont observés sur des gels d'alginate modifiés ne présentant pas les propriétés intrinsèques d'ancrage cellulaire [275].

Dans la FN, la séquence RGD (Arginine-Glycine Aspartate) est située dans le module III10 de cette molécule et elle est bien reconnue par les intégrines $\alpha 5 \beta 1$. Ce tri-peptide s'agit du plus petit fragment que la FN ait besoin pour se lier aux Ig et fixer par suite les cellules [276]. Le peptide RGD peut être linéaire ou cyclique, l'affinité du RGD cyclique pour l'Ig $\alpha v \beta 3$ – un important récepteur qui favorise l'adhésion et l'ostéogenèse des CSMs [277] – est approximativement plus importante de l'ordre de deux fois que celle du RGD linéaire [278]. De plus, la forme cyclique est plus stable que la forme linéaire, ainsi que ces peptides sont thermorésistants et peuvent donc être stérilisés par la chaleur [279]. Les fragments RGD peuvent être fabriqués synthétiquement, ce qui limite le risque de transmission des maladies.

Ainsi, la fibuline, les collagènes, les protéoglycans, les laminines, les thrombospondines, les ténascines, le vitronectine et autres, sont encore des glycoprotéines matricielles (autres que la FN et le RGD) participant au contrôle de plusieurs comportements cellulaires (prolifération, différenciation, polarisation, adhérence...). Chacune de ces molécules a une localisation et un rôle spécifique direct ou indirect dans l'adhésion cellulaire [31]. Une nouvelle famille de protéines contribuant à la régulation de la différenciation et de la croissance cellulaire connue sous l'acronyme CCN référant aux trois premières protéines découvertes dans cette famille : le CYR61 (cystein rich protein), le connective tissue growth factor (CTGF) et le nephroblastoma overexpressed (NOV), elle regroupe encore les protéines WISP1, 2 et 3. Ces protéines CCN sont impliquées dans plusieurs phénomènes biologiques fondamentaux ainsi que dans l'adhérence, la migration et la prolifération cellulaire. Ils sont capables d'interagir notamment avec les intégrines pour influencer au niveau cellulaire. C'est le cas de CYR61 [280], de NOV [281] mais aussi de CTGF [282]. Chacune de ces protéines a ses effets propres grâce à la spécificité de leur liaison de vis-à-vis des différentes Ig.

De plus, il faut noter que plusieurs protéines ont des rôles principaux dans la formation des adhésions focales suite à la liaison de la cellule avec les protéines d'adhérence de la MEC. Ces protéines d'ancrage permettent l'activation des Ig via l'interaction du F-actine dans le cytoplasme avec la sous-unité β de l'Ig [62,283]. Elles sont considérées comme des structures dynamiques pour la constitution des adhésions focales [284]. La figure 47 présente des exemples de ces protéines.

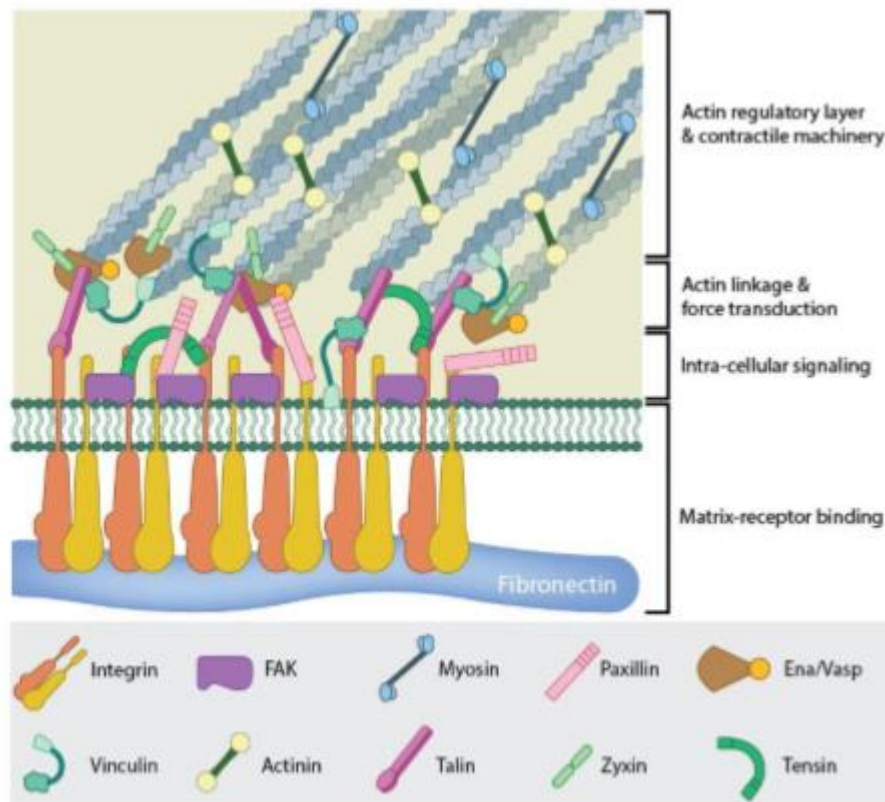


Figure 47: Schéma représentative des protéines impliquées dans la constitution des adhésions focales [118].

IV.3.3- Impact des modifications biologiques

Les cellules qui adhèrent à la MEC peuvent détecter les propriétés mécaniques matricielles grâce aux interactions spécifiques entre les Ig de surface cellulaire d'une part avec les ligands d'adhérence d'autre part [211,288–291]. Engler et al., ont démontré l'importance des propriétés mécaniques de la matrice pour diriger le devenir des CSMs adhérentes sur la surface en variant la rigidité d'hydrogels de Polyacrylamide revêtus par le collagène). Ils ont trouvé qu'un mince hydrogel de polyacrylamide (<1 kPa) favorise une neurogenèse, un hydrogel de rigidité intermédiaire (~10 kPa) favorise une myogenèse, alors que des hydrogels rigides (>30 kPa) favorise l'ostéogenèse [184]. En plus de facteur de rigidité et autres propriétés mécaniques, il a été démontré par plusieurs études l'influence de la composition et la nature des ligands d'adhésion sur un substrat influencent la différenciation des des CSMs [211, 212, 288, 289, 292, 293]. Cooper-White et ses collègues ont montré que des différentes protéines matricielles d'adhésion (FN, laminine, collagène) -selon leur nature et leur mode de présentation à la cellule- greffées sur des substrats d'hydrogel de rigidité différente ont significativement une influence sur l'expression des marqueurs myogéniques et ostéogéniques ainsi qu'elles jouent un rôle important dans la promotion compétitive des résultats de différenciation.

Lee et al. ont cultivé des cellules souches mésenchymateuses sur des gels hydratés à base de polyacrylamide (PAAm) en faisant varier la géométrie du support, la rigidité de la matrice et la nature des ligands déposés à la surface des gels. Ils ont pu démontrer que des CSMs humaines issues de la MO cultivées sur des îlots (circulaires) la FN ont plus largement tendance à s'orienter vers la voie adipogénique qu'en culture classique. De la même façon, les cellules cultivées sur du collagène s'orientent plus facilement vers la voie neurogénique [240]. Ainsi il a été montré que pour tous les ligands d'adhésion, le plus grand pourcentage des cellules étalées ont choisi un destin neurogéniques (figure 48). En effet, en combinant le collagène avec n'importe quelles autres protéines (FN et/ou laminine), il a été obtenu des cellules nerveuses, quelque soit la forme de la cellule et la surface.

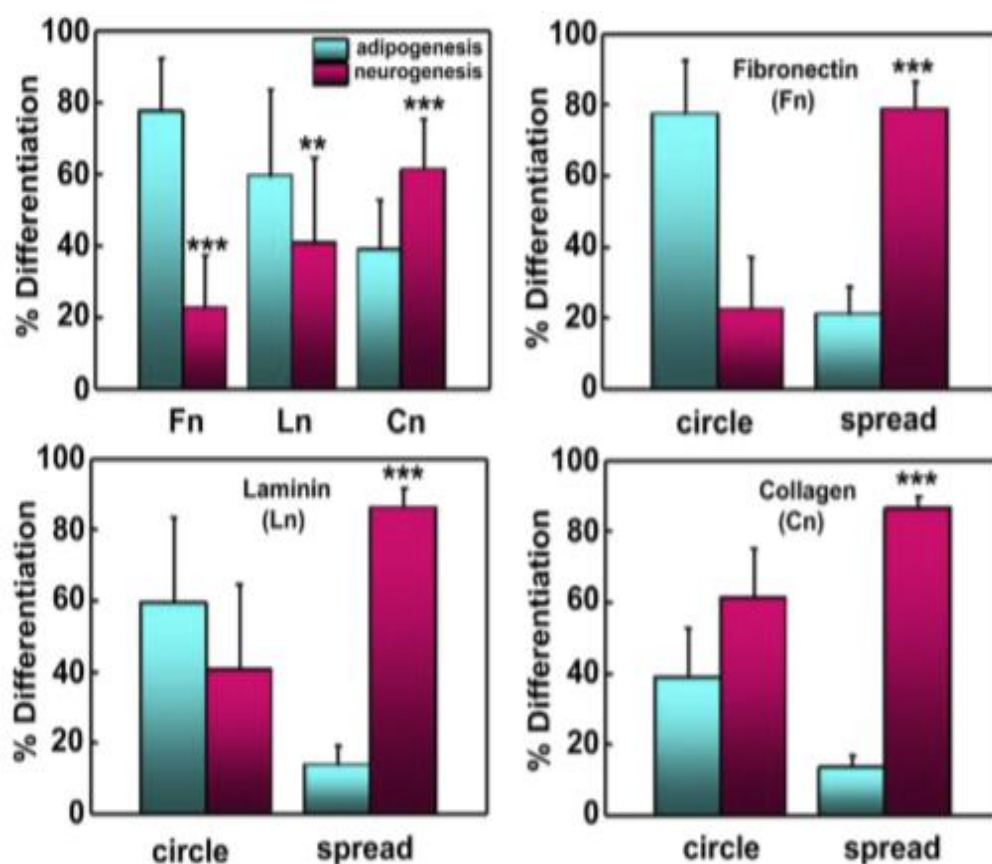


Figure 48: L'impact du nature du ligand (Fn: fibronectine, Ln: laminine, Cn: collagène) sur le comportement cellulaire (adipogenèse ou neurogenèse) sur des géométries circulaires ou étalé [240].

Kilian et al. ont montré comment la modulation de l'expression des marqueurs associés à la neurogenèse, la myogenèse et l'ostéogenèse est fortement lié à la densité et l'affinité des peptides d'adhésion, ce qui conforme l'importance du type, de la nature, de la densité et de la présentation du ligand dans la différenciation des CS. En premier temps, ils ont cultivé des CSMs pendant 10 jours soit sur des films d'or de monocouches (SAM d'alkane-thiolate)

présentant du cycRGD ou linRGD à des densités différentes : haute densité (1%) et faible densité (0.1%), soit sur des films d'or recouverts par la FN, et en détectant le marqueur précoce de l'ostéogenèse AP (alkaline phosphatase) ils ont démontré que la FN et les monocouches présentant le RGD cyclique favorisent l'ostéogenèse (figure 49). Et dans un deuxième temps, et dans les mêmes conditions de la culture des CSMs sur des films d'or portant de la FN ou du cycRGD, ont démontré qu'à une faible densité de ligand, les cellules expriment davantage de marqueurs neurogéniques et myogéniques. De plus, à de faibles densités de ligand, plus l'affinité de liaison est élevée, plus la cellule semble privilégier le devenir neurogénique. Si la densité de ligand est élevée, la cellule a tendance à se masser sur la zone d'adhérence et rester relativement arrondie. A l'inverse, si la densité est faible, elle cherche à atteindre ses ligands et s'étend [208].

Finalement, la réponse biologique qui s'ensuit une modification biologique va dépendre de la densité et de la distribution spatiale des protéines et des peptides favorisant et facilitant l'adhésion cellulaire. Toutefois, ce type de modification par des molécules biologiques a une durée de vie limitée, et il est primordial de pouvoir contrôler de manière optimale la fonctionnalité de ces molécules en fonction du temps.

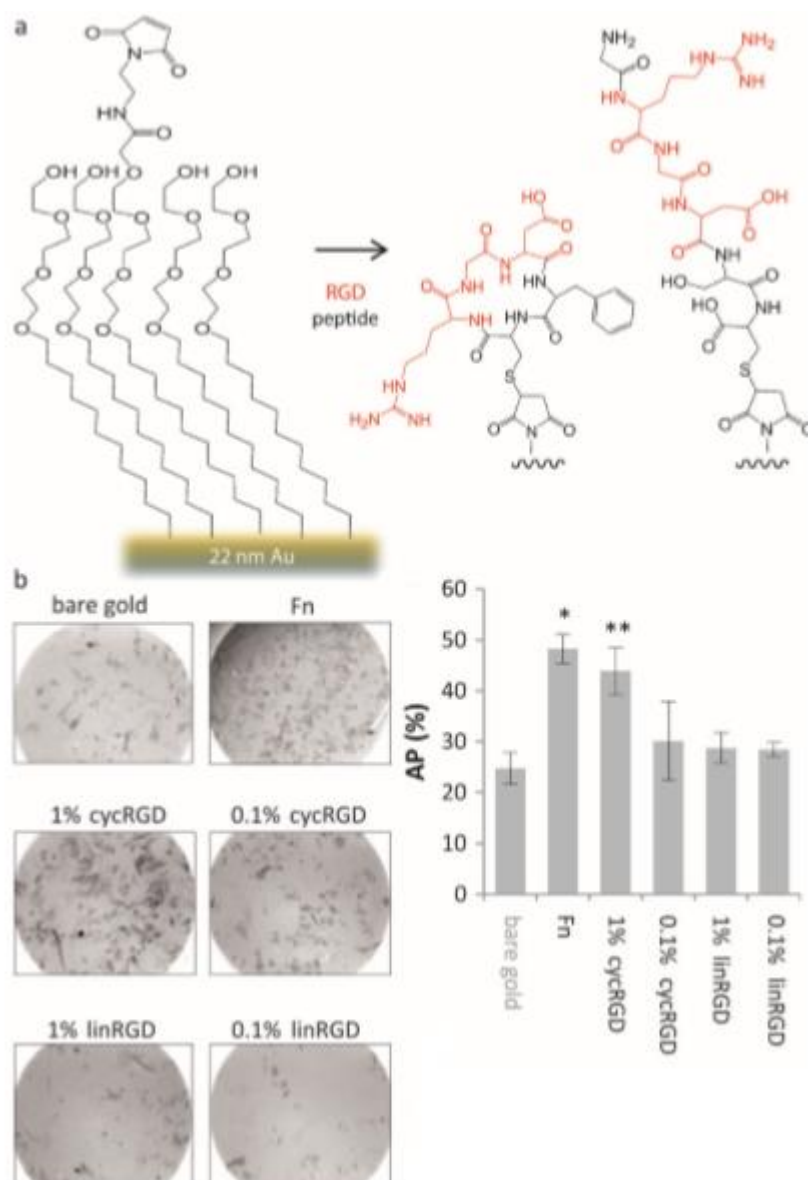


Figure 49: Les molécules d'adhésion et leur affinité de favorisation de l'ostéogenèse des CSMs [208].

(a) Immobilisation des peptides RGD (en rouge) sur les monocouches (SAM) préparées sur des films d'or. (b) gauche : Images à contraste de phase de CSMs colorées pour le marqueur d'ostéogenèse l'AP (alkaline phosphatase, gris foncé) après 10 jours de culture sur les monocouches présentant des cycRGD et linRGD de densités différentes et sur les films d'or recouverts par le fibronectine. Droite : Quantification du pourcentage de cellules exprimant l'AP.

V- Adhésion bactérienne et propriétés de surface

Depuis longtemps, les bactéries ont été étudiées dans leur environnement naturel *in vivo*, dans les conditions contrôlées. Elles sont définies comme des microorganismes vivants unicellulaires dépourvues de noyau et d'organites. Elles mesurent quelques micromètres de long et apparaissent sous diverses formes : sphérique (coque), allongée ou en bâtonnets (bacilles). Elles existent sous deux grandes familles : les bactéries gram positif et les bactéries gram négatif. Cependant, leur grande différence réside principalement dans la structure et l'épaisseur de leur paroi ainsi que dans la coloration que prend le Gram.

V.1- Généralités concernant les bactéries : l'espèce E.coli

La bactérie *Escherichia coli* est découverte pour la première fois par Theodor Escherich dans les selles de nourrissons en 1885. Tout d'abord elle a été nommée *Bacterium coli* commune, et après 70 ans et en hommage des travaux de Theodor Escherich elle devient reconnue par le nom d'*Escherichia coli* (*E. coli*) [291].

Escherichia coli appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et des protéobactéries. Elle est un bacille à Gram négatif, aérobie-anaérobie facultatif (AAF) ayant une catalase et une nitrate réductase, dépourvue d'oxydase ainsi qu'elle est non halophile. *E.coli* est immobile ou mobile possédant une structure non-sporulée et flagellaire péritriche. La température optimale de croissance de cette bactérie est 37°C. Elle est non exigeante, capable de développer sur des milieux ordinaires [292]. Cette bactérie constitue 1% du microbiote aérobie-anaérobie facultatif intestinale de l'Homme et des animaux où elle représente 80 à 90 % des coliformes fécaux ou thermotolérants.

E.coli mesure 2 x 0,5µ, elle possède un chromosome circulaire avec un génome comprenant 4800 gènes dont 1400 entre eux participe à la régulation du métabolisme bactérien. En milieu nutritif, cette bactérie se divise en 2 bactéries filles chaque 20 à 40 minutes. Sa transcription s'effectue directement dans le cytoplasme. La membrane cytoplasmique des bactéries à Gram négatif est formée de 2 bicouches lipidiques (interne et externe) qui sont séparées par une espace péri-plasmique. La bicouche lipidique externe et l'espace péri-plasmique comprennent du peptidoglycane et assurent la forme et la stabilité de la bactérie. *E.coli* se communique avec l'extérieur par l'intermédiaire des canaux, des porines, et des pompes transporteurs, actifs ou passifs et qui sont en général spécifiques d'une molécule donnée. Chez *E.coli* K12 (MG1655), il a été décrit plus de 250 transporteurs. Ce qui caractérise l'*E. coli* ainsi est la présence de différents appendices associés (des flagelles, de fimbriae ou pili) à sa paroi ayant des fonctions importantes. *E. coli* présente une capacité d'interagir avec des surfaces

biotiques ou abiotiques et peut adhérer : soit à des récepteurs cellulaires spécifiques (étape du processus infectieux d'une bactérie), soit sur des surfaces inertes ou encore elles peuvent adhérer entre elles. En outre, elle possède la capacité de formation d'une matrice adhésive et protectrice qui s'appelle "biofilm". Ce mode de vie, ajoutant encore les autres types d'interactions inter-cellulaires sont régis partiellement par un système de communication connu par "le quorum sensing. Ainsi, la détection des variations externes et la transmission des informations au génome bactérien sont effectués par des senseurs protéiques présents dans la membrane de *E.coli* [293].

Cette espèce est versatile incluant des bactéries pathogènes, des bactéries commensales du tube digestif et des bactéries adaptées à l'environnement à la fois [294]. Les *E.coli* commensaux ont des rôles bénéfiques pour la flore intestinale surtout dans le métabolisme des sels biliaires et dans la protection alors que chez les *E.coli* pathogènes on distingue d'une part les entéropathogènes (responsables d'infections intestinales) et les pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) d'autre part. Parmi les entéropathogènes on trouve les souches entéropathogènes (EPEC), entéro-hémorragiques (EHEC), entérotoxigènes (ETEC), entéroinvasives (EIEC), entéro-agrégatives (EAEC) et celles adhérant de façon diffuse (DAEC). L'*E.coli* peut s'adapter face aux différents stress environnementaux brutaux (changements du pH, de la température, ou un épuisement en nutriments) par le phénomène d'homéostasie en disposant pour ce but de senseurs et d'effecteurs permettant aux bactéries de survivre au détriment de leur croissance et leur mobilité [298, 299].

V.2- Etapes d'adhésion bactérienne

L'adhésion bactérienne sur une surface se déroule en deux principales étapes:

- 1- L'étape de transport des bactéries à l'intérieur d'un fluide jusqu'à une surface.
- 2- L'étape d'adhésion proprement dite des bactéries sur la surface.

La première étape est influencée par plusieurs processus physiques : l'écoulement du liquide, les effets de convection du liquide, le mouvement brownien et la sédimentation qui varie en fonction de la nature du liquide contenant les bactéries. Yang et al. [297] ont montré que l'orientation perpendiculaire du flux par rapport à la surface favorise le taux d'adhésion des bactéries qui est plus important que dans le cas d'orientation parallèle. Ainsi, le transport des bactéries vers la surface est facilité par le mouvement du liquide vers la surface. En outre, les propriétés d'adhésion des bactéries sont affectées par la mobilité de la bactérie par son ou ses flagelles. Pratt et Kolter [298] montrent que la formation d'un biofilm d'*E.coli* est favorisée par la présence d'un flagelle alors que Prigent-Combaret et al. n'ont signalé aucune

observation significative de l'influence du flagelle. Peut-être que l'intérêt du flagelle dépend de l'environnement et de la nature de la surface [299].

Cette étape implique une mobilité de deux catégories des bactéries à l'état planctonique : une mobilité passive (la gravité, le mouvement brownien, la convection du milieu ...) qui due au milieu, et une mobilité active (swimming) qui due au déplacement spécifique de la bactérie par sa nage grâce à ses flagelles [300]. Un déplacement des bactéries sur la surface est observable ainsi lorsque celle-ci est en contact avec la surface avant leur adhésion définitive, c'est la motilité. De même pour la forme planctonique, on distingue une motilité passive et une motilité active. Quatre types de motilités actives ont été distingués : le « swarming », le « twitching », le « gliding », le « sliding », mais l'ensemble des mécanismes ne soient pas clairement élucidés même qu'ils ont en commun la capacité de favoriser l'adhésion des bactéries et la formation et le développement des biofilms. Ces quatre types de motilité ne présentent pas chez toutes les espèces bactériennes puisque il y en des types qui exigent l'utilisation de structures dont ne sont pas rencontrées chez toutes les espèces bactériennes. Par exemple, le « swarming » exige une activité du flagelle alors que le « twitching » dépend de l'activité des pili de type IV. [301].

La deuxième étape se divise en deux phases :

1- Phase d'adhésion réversible : Cette phase est définie comme une approche de la surface par la bactérie, elle est soumise aux différents types de forces physiques et chimiques à courtes distances : forces hydrophobes/hydrophiles, électrostatiques attractives ou répulsives entre les deux surfaces et de van der Waals (attractives). Les théories DLVO qui ne prend pas en compte d'une part la nature et les propriétés mêmes de la bactérie, et sa capacité à modifier la composition de sa membrane en fonction de sa perception de surface d'autre part, décrivent cette étape. Pourtant, la bactérie possède plusieurs caractéristiques et différences qui introduisent un biais dans la prévision théorique de leur adhésion : une paroi peu déformable et potentiellement poreuse dont l'externe est plus ou moins protonnée en fonction du pH du milieu et sa composition est liée à la présence ou non d'espèces ioniques, une membrane du nature chimique pas absolument définie à cause de sa dépendance directe de son environnement, dont sa charge est majoritairement négative (fonctions carboxyles, phosphates et amines) dans les environnements biologiques courants (entre pH 5 et pH 7) [302].

2- Phase d'adhésion irréversible : cette phase consiste à la mise en place de l'adhésion irréversible de la bactérie sur la surface en intervenant des forces à courtes distances (liaisons covalentes, liaisons hydrogènes) qui peuvent être complétées par la mise en place de liaisons de type ligands-récepteurs via des protéines membranaires ou des pili [303]. Les pili de type

I, qui sont présents chez la plupart des *E.coli*, peuvent surtout se lier d'une manière spécifique au mannose par l'intermédiaire de l'adhésine FimH [304].

V.3- Formation du biofilm

Plusieurs microorganismes ont la capacité de la formation d'un biofilm qui est une caractéristique propre à eux, où 80 % de la biomasse microbienne se trouve sous forme d'un biofilm. En général, Les biofilms bactériens sont définis comme des amas de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice polymérique. La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes selon un modèle en quatre étapes [305] (Figure 50).

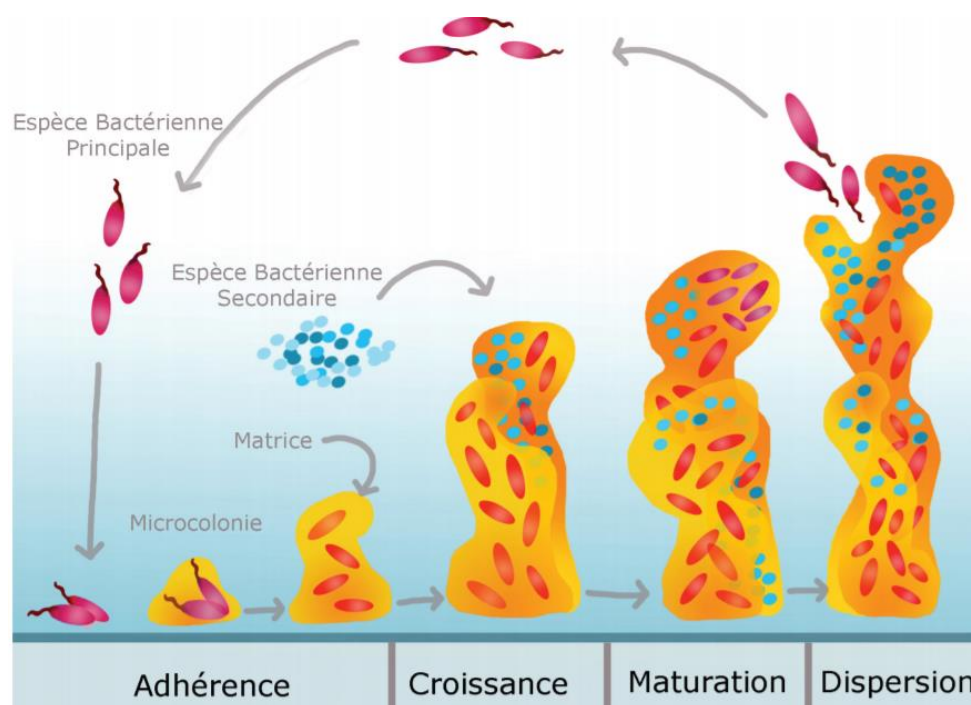


Figure 50: Schéma représentant le développement d'un biofilm en se basant sur quatre étapes [305].

Les éléments essentiels de la structuration du biofilm sont regroupés sous le nom de substances polymères extracellulaires (EPS ; Extracellular Polymeric Substances) qui sont des molécules et des protéines produits par les bactéries pionnières (les premières bactéries adhérees) et permettent la consolidation de leur adhésion sur la surface dont une part importante de ces substances produites sont des polysaccharides (on parle alors d'exopolysaccharides), comme l'acide colanique pour *E.coli* [306].

L'environnement du biofilm en formation, le type d'espèce bactérienne et le milieu nutritif influencent le développement et la structuration du biofilm, alors que la colonisation de la surface est influencée d'une part de mobilité des bactéries à la surface et en suspension surtout par des flagelles ou des pili et de leur aptitude à produire des biosurfactants, par exemple *Serratia liquefaciens*, qui facilite leur dispersion sur la surface d'autre part [307]. La

structure du biofilm permet l'accessibilité des éléments nécessaires à chaque bactérie pour permettre leur prolifération (nutriments, oxygène...), ainsi qu'elle permet l'élimination des déchets d'origine métabolique qui peuvent être à l'origine de ralentissement de la croissance des bactéries s'ils s'accumulaient. Toutes les étapes de formation du biofilm s'accompagnent d'une augmentation de la densité bactérienne et d'un renforcement de la cohésion du biofilm [308].

La population bactérienne à l'intérieur d'un biofilm, et grâce à des mécanismes complexes de communication interbactérienne, peut s'adapter à des variations d'environnement et développer une résistance aux différents stress (naturels ou provoqués par l'introduction d'antibiotiques ou d'agents antibactériens) que la colonie peut. Ainsi, le développement du biofilm le rend moins perméable aux molécules du milieu d'une part, et permet la différenciation du comportement des bactéries tant au niveau de l'expression génique bactérienne qu'au niveau de la vitesse de prolifération au sein du biofilm via la mise en place des mécanismes biologiques (production d'ADN extracellulaire et de protéines) d'autre part [312,313]. Ils aboutissent à la création de bactéries résistantes et persistantes aux agents antibactériens présents [311]. Alors, l'organisation du biofilm formé une souche bactérienne varie en fonction du milieu, de la nature des stress auxquels il s'adapte et qu'il subit [315,316].

V.4- impact des propriétés de surface sur l'adhésion bactérienne

La nature et les propriétés de surface affectent la colonisation bactérienne de la surface. On distingue des propriétés mécaniques, physico-chimiques et topographiques [314].

V.4.1- impact des propriétés mécaniques de surface

Lorsqu'on parle de l'effet des propriétés mécaniques de la surface sur l'adhésion bactérienne, on parle notamment de l'effet du module élastique des matériaux sur telle adhésion, quand même ces effets sont rarement étudiés dans la littérature malgré l'obtention des résultats favorables. Le rôle des propriétés mécaniques de la surface lors de l'adhésion des bactéries *E.coli* K12 a été montré par Cottenye et al. [315]. Le caractère mou d'une surface et d'un module de quelques centaines de kPa a pour effet de limiter l'adhésion des bactéries et par suite de favoriser la mobilité des bactéries à la surface qui peuvent atteindre une distance de plusieurs micromètres en quelques minutes [316]. Guégan et al. ont constaté que la souplesse de la surface est défavorable pour l'adhésion des bactéries ainsi qu'elle contribue au changement de phénotype des bactéries que ce soit Gram positives et Gram négatives [317].

Ces résultats ont observé a une rigidité minimum de 6,6 kPa et en utilisant des taux de réticulation différents d'un gel d'agarose.

L'utilisation d'autres hydrogels par d'autres travaux qui contrôlent la chimie de surface arrivent aux mêmes résultats [321, 322]. Dans ces deux études, la variation de ratio de polymères présent dans la solution initiale aboutit à la variation du module élastique du revêtement. En outre, d'autres chercheurs ont varié le module élastique de quelques kPa à environ 150 kPa via la variation du taux de réticulation de films de PE, par photoréticulation mais sans varier significativement la chimie de surface ou le pH. Ils ont montré que les surfaces exprimant le plus faible module élastique présentent une diminution de l'adhésion bactérienne uniquement pour les bactéries Gram négatives peut-être à cause de la chimie des films obtenus [320].

V.4.2- impact de la chimie de surface

La chimie de surface a un important effet sur le comportement des bactéries notamment par certaines propriétés physico-chimiques qui influencent l'adhésion bactérienne : l'énergie de surface, la charge de surface et l'hydrophobicité de la surface.

L'énergie de surface est un des facteurs ayant un impact sur l'adhésion bactérienne. Plusieurs études révèlent une réduction d'adhésion bactérienne sur des surfaces présentant une faible énergie de surface [321]. Mais, L'énergie de surface de la membrane bactérienne est intéressée par peu de ces études. Quand même, l'énergie de surface du matériau seule ne permet pas de déterminer facilement les règles comportementales qui régissent le couple bactérie-surface. Cependant, les interactions acido-basiques montrent une importance dans l'adhésion bactérienne où elle est limitée en cas d'absence d'interaction acido-basique entre la bactérie et le substrat. Ces interactions ont été mises en évidence dans l'adhésion d'E.coli sur des matériaux polymères [322].

Ainsi, la charge de surface que possède le matériau joue un rôle au cours de l'adhésion des bactéries sur une surface. Nombreux auteurs confirment en partie que la charge positive de surface favorise l'adhésion des bactéries [302]. Terada et al. ont prouvé que les forces électrostatiques attractives existant entre les bactéries et la surface, en cas du charge positive de surface, sont les mécanismes qui mènent à l'adhésion bactérienne [323]. Ceci indique qu'une surface chargée positivement pourrait être un paramètre plus favorable à l'adhésion bactérienne qu'une surface chargée négativement. Gottenbos et al. [324] ont comparé la quantité de bactéries (E.coli et P.aeruginosa) sur des surfaces chargées positivement et autres négativement après plusieurs heures de culture, ils ont trouvé que sur des surfaces de charge

négative, la quantité de bactéries est toujours supérieure à celle des surfaces de charge positive. En effet, les surfaces chargées positivement présentent des importantes forces électrostatiques qui aboutissent à des ruptures membranaires et causent un dysfonctionnement au cours de la multiplication cellulaire, ce qui explique la diminution de la viabilité cellulaire sur telles surfaces. En outre, Rzhapishcheva et al. ont étudié la capacité qu'intervient la bactérie "*Pseudomonas aeruginosa*" pour s'adapter à son environnement qu'on l'appelle la capacité d'adaptation à la charge de surface. Ils ont montré ses capacités à modifier la surface de sa membrane pour s'adapter à une surface de charge négative [325]. Ainsi, au cours du développement du biofilm des bactéries, cette capacité est observée comme une façon de favoriser la formation du biofilm en augmentant l'hydrophobicité bactérienne. Par exemple, lorsque la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* entre en contact avec une surface chargée négativement, la production des exopolysaccharides de la matrice du biofilm augmente ainsi les bactéries *E.coli* montrent une orientation particulière lors de leur adhésion sur de telles surface [326].

Un autre paramètre important dans l'adhésion des bactéries est l'hydrophobicité de la surface. Plusieurs études ont traité le rôle du caractère hydrophile ou hydrophobe dans l'adhésion des bactéries. Certaines entre eux ne révèlent pas une différence entre l'adhésion des bactéries sur des matériaux hydrophiles et hydrophobes [302], alors que d'autres et notamment An et Friedman [327] ont prouvé que l'adhésion de bactéries ayant une membrane hydrophobe est défavorable sur des matériaux hydrophiles tandis que l'adhésion de bactéries avec une membrane hydrophile est difficile sur des matériaux hydrophobes.

En plus, les propriétés de la membrane bactérienne d'hydrophobicité/hydrophilicité ont encore un rôle dans l'adhésion comme montré par D. P. Bakker et al. qui affirment que les bactéries qui possèdent un plus grand caractère hydrophobe à leur surface colonisent une plus grande surface. En outre, Ploux et al. ont montré que l'hydrophobicité n'affecte pas uniquement l'adhésion bactérienne mais encore le développement du biofilm qui peut avoir une structure différente suivant la fonctionnalisation de surface du matériau ($-CH_3$ ou $-NH_2$) [328]. Ainsi ce même équipe de travail a montré la différence de cinétique de prolifération des bactéries au cours du temps en signalant un détachement d'une partie du biofilm (pour la surface fonctionnalisée $-NH_2$) dont dépend de la nature de la chimie de surface. Et à travers une autre étude, il a été montré que les dynamiques et les mécanismes d'adhésion bactérienne se différencient même si les cinétiques de colonisation d'une surface peuvent être identiques et qu'elle soit hydrophobe ou hydrophile. Autres travaux ont ainsi indiqué, en fonction de l'hydrophobicité de surface, des comportements d'adhésion différents [329].

V.4.3- impact de la topographie de surface

L'impact de la topographie de surface sur l'adhésion des bactéries n'est pas tout à fait compris. Une relation entre la microtopographie de surface et sa colonisation par les bactéries a été montrée par nombreuses études (Figure 51) [314].

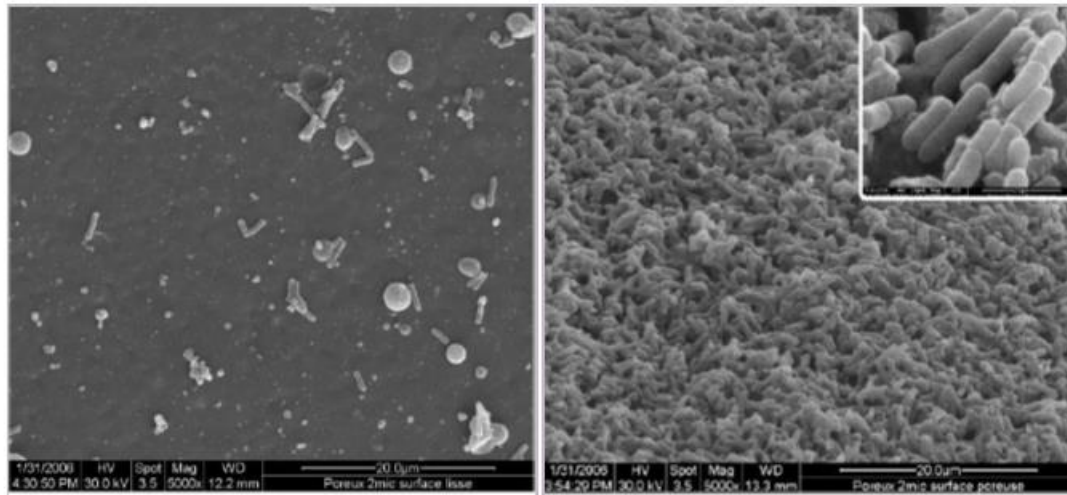


Figure 51: La colonisation bactérienne d'un même groupe bactérien ayant une chimie semblable sur une surface lisse (à gauche) et sur une surface poreuse (à droite). Les images sont prises par microscopie électronique à balayage (MEB) [299].

Flint et al. montrent que pour une rugosité moyenne Ra d'ordre de 0,9 et 1,24 μm l'adhésion bactérienne est élevée [330], alors que dans d'autres études, il a été montré que ce type de topographie n'a pas une influence lorsque celle-ci est comprise entre 10 nm et 900 nm [334,335]. Un groupe de chercheurs ont prouvé que l'organisation, l'échelle et la complexité de la topographie (les structures définies et la rugosité) affecte l'adhésion bactérienne, d'où la difficulté de comprendre les effets de la topographie sur l'adhésion des bactéries. Ils ont montré une adhésion minimale pour une topographie ayant des rayures de 700 nm et un Ra = 0,16 μm [333].

Cependant, certains travaux conduisent à démontrer que les bactéries peuvent arriver aux rainures ou anfractuosités de la surface pour s'y fixer grâce à leurs flagelles [334]. Néanmoins, l'impact de la topographie de surface sur l'adhésion des bactéries n'est que peu décrite et comprise. Des études ont montré que les bactéries ont une orientation vers la topographie nanométrique de la surface en utilisant le protocole démouillage total des surfaces avant l'observation qui est probablement à l'origine de cette orientation [338, 339]. Alors et devant toutes ces contradictions, certains chercheurs essayent de faire une modélisation de l'adhésion bactérienne sur les surfaces topographiées [337].

Chapitre 2 :

**Fonctionnalisation et développement des
cellules souches mésenchymateuses sur des
surfaces homogènes naturelles et
artificielles**

Chapitre 2 : Fonctionnalisation et développement des cellules souches mésenchymateuses sur des surfaces homogènes naturelles et artificielles

I- Introduction

Les Cellules souches mésenchymateuses offrent un large potentiel thérapeutique en raison de leur immunocompatibilité, leur capacité à se différencier en plusieurs types cellulaires importants pour le génie tissulaire et de l'absence de problèmes éthiques liés à leur dérivation. Bien que ces cellules soient très prometteuses, un contrôle et une compréhension précis de la signalisation complexe entre la cellule et la matrice extracellulaire seront importants pour l'application clinique [338].

Depuis de nombreuses années, plusieurs chercheurs biologistes et spécialistes des maladies de cancer ont observé et étudié les différents comportements cellulaires (prolifération, adhésion, différenciation ...). Et comme la culture cellulaire a un grand intérêt dans la compréhension des besoins des cellules et des mécanismes impliqués dans leur devenir d'une part et dans l'orientation de la cellule vers l'une ou l'autre voie de différenciation d'autre part, il serait réducteur de limiter le devenir d'une cellule au seul impact des facteurs présents dans son milieu. Au cours des dernières années, de nombreuses études se sont intéressées au rôle du support de culture [241].

Notre étude s'est orientée vers la création d'un environnement pour les cellules presque similaire de la MEC. Le travail proposé dans cette étude repose alors sur la mise en œuvre d'un procédé de fonctionnalisation chimique de surface homogène appliquée à la biologie cellulaire, en déposant des molécules naturelles (Fibronectine, RGD cyclique) ou artificielles (polyélectrolytes) sur de telles surfaces qui permettent notamment d'étudier l'adhésion cellulaire. L'avantage de ce procédé est de contrôler la chimie de surface et d'étudier les comportements cellulaires résultants de l'impact direct de la chimie de la surface sur la cellule. La faisabilité de cette approche a été démontrée dans plusieurs travaux antérieurs.

L'objectif de ce travail est de :

- concevoir des supports homogènes particuliers fonctionnalisés chimiquement soit naturellement soit artificiellement.
- Mettre un aspect chimique (surface à chimie contrôlée) du support afin d'étudier l'effet de la surface de culture sur les voies cellulaires.

Les principales questions scientifiques relatives à cette étude sont les suivantes :

- Quelle est l'influence de fonctionnalisation chimique sur les substrats ?
- Est-il possible de promouvoir et de comprendre l'influence de ces surfaces développées naturelles ou artificielles sur le comportement cellulaire ?

Pour tenter de répondre à ces questions, l'étude qui suit présente les travaux réalisés pour montrer la faisabilité de notre approche. Par ailleurs, les modifications chimiques des surfaces homogènes sont effectuées par deux méthodes chimiques : la méthode de multicouches de polyélectrolytes et la silanisation en phase gazeuse, suivis par un traitement avec des molécules naturelles pour les surfaces silanisées. Ainsi, des CSMs sontensemencées issues de moelle osseuse humaine sur des telles surfaces. Et ensuite les résultats de culture biologique sont comparés avec des cultures témoins réalisées sur de supports conventionnels (TCPS) et soumises à des milieux induisant la différenciation en adipocytes, chondrocytes et ostéocytes, principaux types cellulaires issus de ces cellules souches.

II- Section expérimentale

II.1- Préparation des surfaces homogènes

Les travaux ont réalisés sur des surfaces de silicium pour les caractérisations physico-chimiques et sur des surfaces de mica pour les études biologiques de 1 centimètre carré.

II.1.1- Préparation des surfaces homogènes naturelles

II.1.1.1- Silanisation en phase gazeuse :

La silanisation en phase gazeuse comprend plusieurs étapes permettant d'obtenir des monocouches greffées de qualité de très bonne reproductibilité. Elle est relativement délicate, ce qui exige lors de manipulations une attention particulière lors du nettoyage, du séchage du réacteur, de la préparation des échantillons et de la manipulation proprement dite des silanes qui sont en général toxiques. La propreté est le facteur majeur et essentiel à la réussite de ce type de manipulations [339].

La figure 52 représente un schéma du notre réacteur de silanisation. Il est constitué de verre pyrex® et sa contenance est d'environ 0,7 dm³. Son fournisseur est la société Techlab (France). Le réacteur possède une double paroi qui permet la circulation d'huile chaude nécessaire à la régulation en température. La conception du réacteur a été étudiée pour qu'un minimum de surface autre que le verre (pyrex®) soit en contact des vapeurs de silanes (les silanes dégradent certaines matières couramment associées à ce type de verrerie comme le PTFE ou certains élastomères employés pour l'étanchéité). Le porte échantillons également en pyrex® est percé sur les deux étages inférieurs facilitant la circulation des vapeurs au sein du réacteur, mais le bouclier supérieur est quant à lui un verre de montre plein, convexe vers le sol pour éviter la retombée de gouttelettes qui peuvent se condenser sur la partie supérieure du couvercle qui est plus froid. Un dispositif de mesure de pression (manomètre de type Bourdon) est disposé sur la partie supérieure permettant au manipulateur un contrôle lors des différentes étapes nécessaires à la synthèse. Le bras du réacteur possède une triple fonction : un lien avec la pompe rotative précédée d'un piège cryogénique, une entrée d'argon (la qualité du gaz doit être excellente pour limiter la présence d'eau et d'huile) et un sas pour introduire le silane surmonté d'un septum.

D'autre part, Hughes et al. ont utilisé un dessiccateur à vide à joint sec. Le vide (vaccum) obtenu a été réalisé par pompage pendant 15-30 minutes suivi d'une incubation à 60°C pendant 18 heures [340]. Nous nous sommes intéressés à leur approche en considérant l'utilisation du même silane dans l'expérience. Un autre type de système de silanisation en

phase gazeuse est décrit par Fiorilly et al. dans leur expérience [341] où ils ont utilisé une chambre à vide en verre associée à une pompe rotative et un système de distribution composé d'un réservoir en verre avec des réactifs, relié à une ligne en acier inoxydable qui permet l'entrée des vapeurs de réactifs dans la chambre de réaction.

Dans le cas présent et avant de commencer l'expérience, le réacteur a été nettoyé avec une solution de piranha (acide sulfurique/eau oxygénée 50% v/v) pendant 20 minutes. Ensuite, il a été rincé avec de l'eau désionisée Mili-Q cinq ou six fois. Le dernier rinçage était avec l'éthanol. Après le réacteur a été connecté avec une pompe afin d'éliminer tout le gaz et l'eau possible d'être existé. Il a été maintenu sous pompe et chauffage à 100°C pendant 24 heures.



Figure 52: Image du réacteur de salinisation en phase gazeuse utilisé dans notre laboratoire.

II.1.1.2- Préparation des échantillons

Des surfaces de silicium (1 cm²), ont été nettoyées ainsi que le réacteur dans un bain de piranha comme décrit ci-dessus également pendant 20 minutes afin d'éliminer les contaminants comme les poussières. La seule différence est que les surfaces ont été rincées seulement avec de l'eau, sans éthanol. Elles ont été très soigneusement séchées à haute température et ensuite ils ont été placés à l'intérieur du réacteur pour un séchage complet pendant plus de 24 heures, tandis que le réacteur atteignait la température de 100 ° C.

Le silane utilisé est le 10 - (carboxymethoxy) decyldimethylchlorosilane (figure 53). Il a été injecté à 0,2 ml suivi d'une vaporisation de 24 heures.

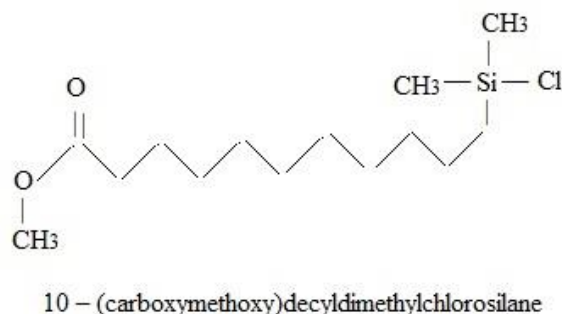


Figure 53: La formule chimique de silane utilisé.

Après la silanisation, les échantillons ont été soumis à une extraction (nettoyage) au soxhlet (bain d'acétone) pendant 24h afin d'éliminer le surplus de silane adsorbé sur les surfaces ainsi les résidus de silane des autres contaminants. Après, le réacteur a été nettoyé provisoirement trois fois avec du chloroforme, rincé avec de l'éthanol et séché à température ambiante.

II.1.1.3- Hydrolyse de l'ester

La liaison Si-O-Si est très sensible à une hydrolyse acide ou basique. Pour éviter le dégreffage du silane, nous avons dû mettre en place les meilleures conditions d'une hydrolyse alcaline qui permet l'hydrolyse de l'ester sans rompre la liaison Si-O-Si. Nous avons alors choisi une solution acide faiblement concentrée, et effectué des essais à température moyenne (50 °C) et à température ambiante, mais la surface a été mise en contact avec la solution pendant un temps court (2 heures).

Pour l'hydrolyse de l'ester, on a préparé 200 ml de solution d'acide chlorhydrique 0,1 N dans un bécher préalablement trempé dans un bain piranha. L'hydrolyse a été réalisée pour seulement deux des échantillons à différentes températures pendant une heure; un échantillon a été soumis à 50 ° C et l'autre à température ambiante.

II.1.1.4- Greffage de la fibronectine et du RGD cyclique

Dans la présente étude, des surfaces de silicium et de mica (1 cm²) ont été utilisées. Ils ont été préalablement nettoyés dans un bain de piranha pendant 30 minutes afin d'éliminer les contaminants.

Pour greffer les molécules naturelles d'intérêt (la fibronectine et le peptide RGD cyclique), les surfaces ont dû être modifiées afin d'y ajouter des groupements d'ancrage. Pour cette raison les groupes d'esters ont été hydrolysés en groupes COOH. La terminaison COOH va nous permettre de mettre en réaction les surfaces avec la FN ou le RGD cyclique avec l'aide du

couple EDC/NHS (1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide/3- (Maleimido) propionique N-ydroxysuccinimide ester) (figure 54).

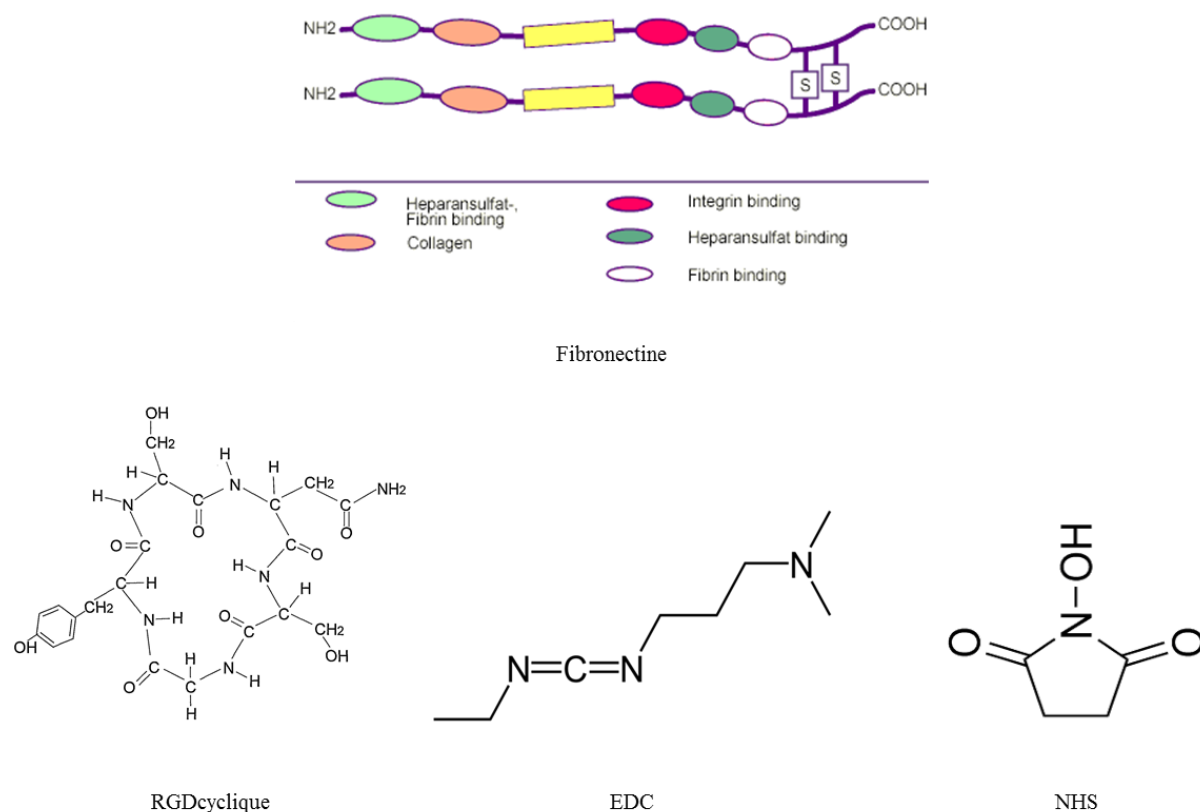


Figure 54: Structures chimiques de la fibronectine, de RGDcyclique, de 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) et de 3- (Maleimido) propionique N-ydroxysuccinimide ester (NHS) utilisés lors du greffage des surfaces silanisées.

Pour ce faire un procédé en deux étapes a été utilisé:

- La première étape consiste à greffer le 10 - (carboxyméthoxy) décyldiméthylchlorosilane, par silanisation en phase gazeuse. Plus précisément, les surfaces ont été nettoyées au piranha puis elles ont été mises en contact avec les vapeurs de silane dans une enceinte à vide sous atmosphère d'argon. L'exposition a été faite pendant 24 heures. Ensuite, un nettoyage Soxhlet à l'aide de l'acétone pure a été fait également pendant 24 heures dans le but d'éliminer les résidus de silane et d'autres contaminants.
- La deuxième étape consiste à greffer la FN et le peptide RGD cyclique. Une fois activées, Les surfaces ont été immédiatement immergées dans une solution aqueuse de NHS (0,05 M) et d'EDC (0,2 M) pendant 3 heures, suivi par un rinçage dans de l'eau Milli-Q. Les surfaces ensuite ont été mises en contact pendant 3 heures à température ambiante avec une solution

de FN/PBS stérile filtré (25 µg/mL) ou de RGD cyclique / PBS stérile filtré (5.10^{-4} mol/L). Enfin, elles ont été rincées dans du PBS stérile filtré et ensuite séchées.

La figure 55 représente les différentes étapes chimiques de préparation des surfaces homogènes naturelles fonctionnalisées par salinisation et greffage des molécules naturelles.

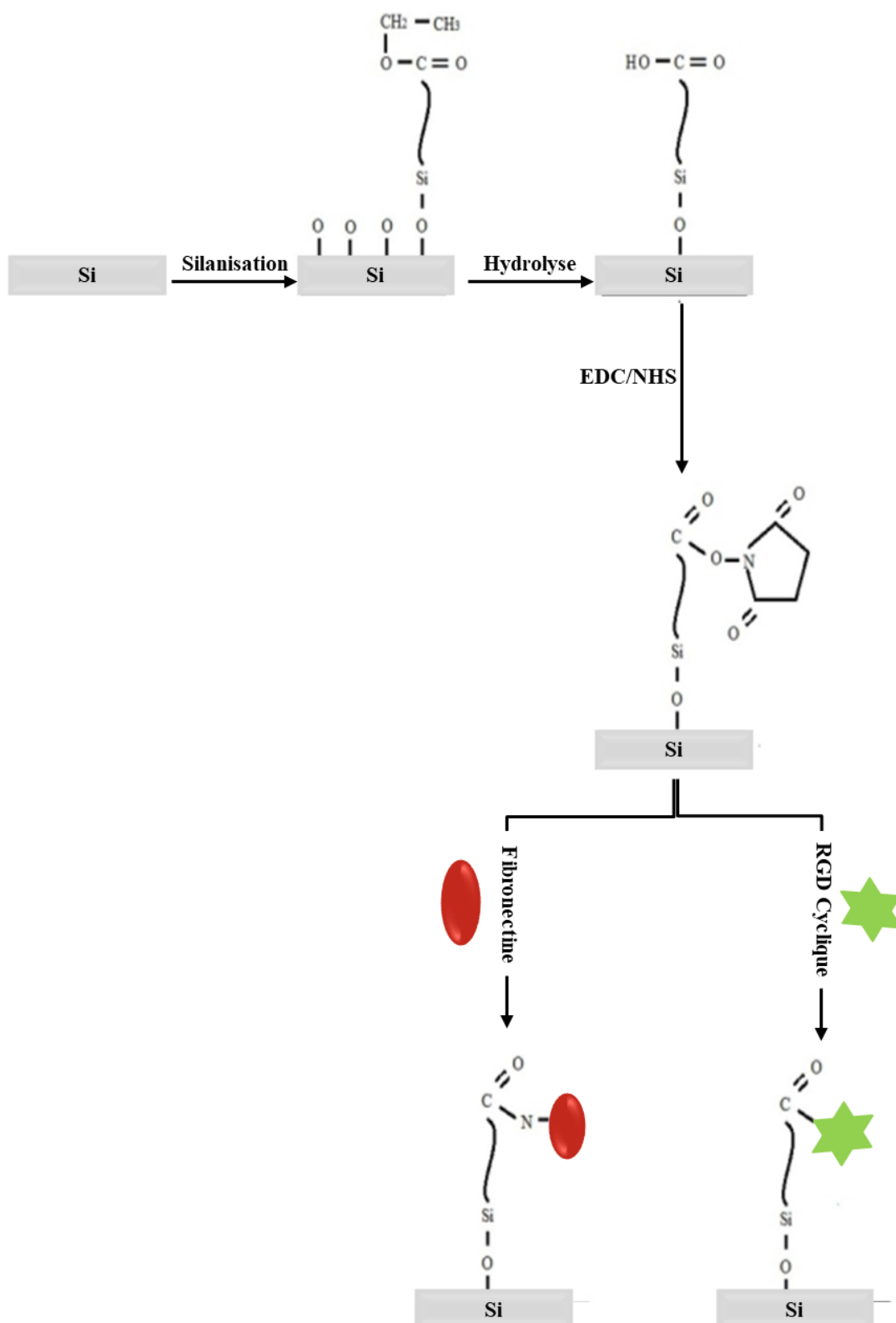


Figure 55: Schéma représentant la silanisation des surfaces de silicium, l'hydrolyse et l'activation de surface avec le couple EDC / NHS en solution aqueuse pour le greffage de fibronectine ou de RGD cyclique.

II.1.2- Préparation des surfaces homogènes artificielles

Un polyélectrolyte est une macromolécule qui lorsqu'elle est mise dans l'eau ou un autre solvant ionisant, se dissocie en une espèce hautement chargée. La méthode d'assemblage multicouche de polyélectrolyte est une assemblage électrostatique de polyélectrolytes et peut être effectué très facilement selon les méthodes qui alternent les polyanions et les polycations tel qu'à chaque étape d'adsorption, il y a une inversion de charge à la surface du substrat, et une solidité de l'édifice se tient entre autre à ces interactions électrostatiques [342].

Les PE sont donc particulièrement intéressants lorsqu'on désire modifier chimiquement la surface du substrat et plus précisément, lorsqu'on désire contrôler la charge d'une surface.

Deux couples de PE (chitosan / poly (sodium 4-styrènesulfonate) et chitosan / acide polyacrylique) ont été déposés sur les surfaces de mica et de silicium, comme l'indique la figure 56.

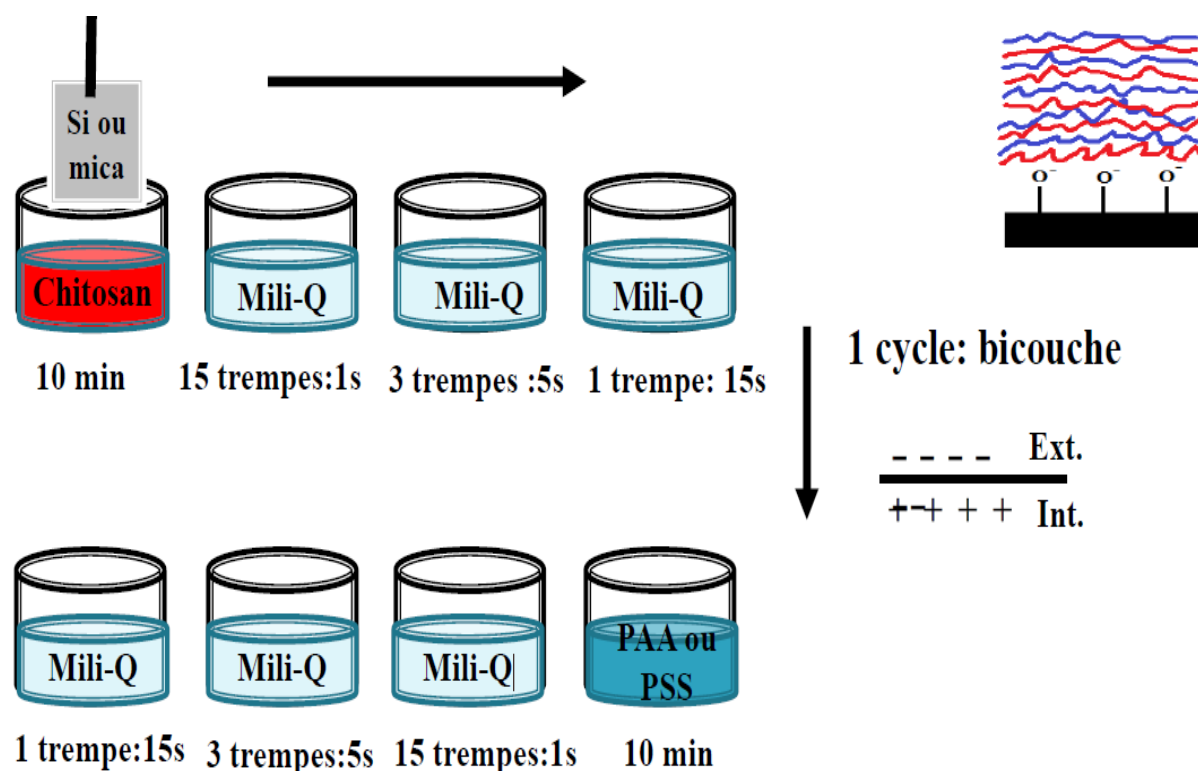


Figure 56: Schéma représentant le protocole de multicouches de polyélectrolytes.

Toutes les surfaces et les verreries utilisées dans cette méthode sont déjà bien nettoyées dans un bain de piranha pour enlever les contaminants et les toutes les lavages sont réalisés dans de l'eau mili-Q.

5, 10, 15 et 20 cycles ont été réalisés, consistant chacun en un dépôt de chitosan (un PE cationique), suivi d'un dépôt de PSS (un PE anionique fort) ou de PAA (un PE anionique faible) de sorte que la couche externe soit anionique (figure 57).

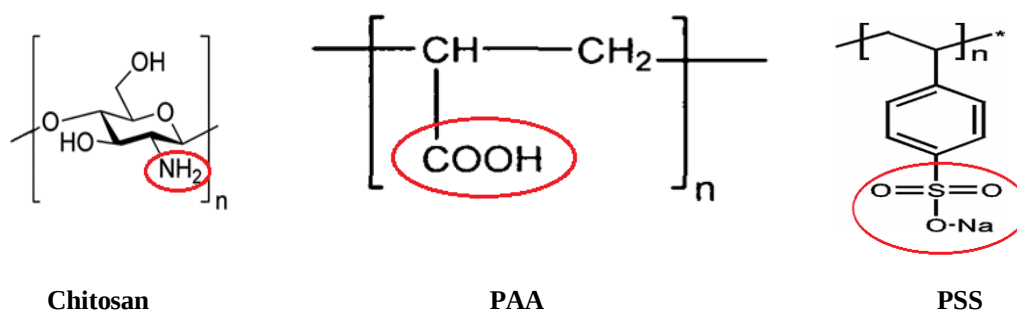


Figure 57: Structures chimiques du chitosane, d'acide polyacrylique (PAA), de poly(sodium 4-styrènesulfonate) (PSS) avec leurs groupements fonctionnels (en rouge).

Chaque solution a été réalisée à une concentration de 10^{-2} mol / l dans un volume final de 50 ml. La solution de chitosan est réalisée à 5% en volume d'acide acétique. Toutes les solutions sont équilibrées à un pH compris entre 6 et 6.5 à l'aide des solutions de HCl (0.5M) et de NaOH (0.5M).

Les surfaces ont ensuite séchées et mises à l'étuve pendant 24 heures à 137 degrés afin d'éliminer les résidus d'acide acétique.

II.2- culture cellulaire

Toutes les manipulations de culture cellulaire furent réalisées en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire en salle blanche. Les cultures furent incubées dans une étuve à 37°C sous une atmosphère à 5% CO₂. Deux types de cellules furent utilisés : une lignée de cellules de carcinome colique Caco2 et une culture primaire de CSMs de MO humaine issues d'un individu de 24 ans. L'entretien des CS fut réalisé avec une solution de trypLE® Express (12604-013 Gibco). Pour l'entretien des Caco2, de la trypsine (25200056 Gibco) et du tampon phosphate stérile (PBS, D8537 Sigma) furent utilisés. Les comptages furent réalisés à l'aide d'un appareil Vicell (Beckman Coulter).

Les CS furentensemencées au troisième passage (P3) dans des plaques 6 puits (Nunclon™ Delta Surface, Cat. no. 140675, Thermo Fisher Scientific, Danemark) à une densité de 2000 cellules par centimètre carré sur des surfaces de mica posées sur un lit d'agarose, ou directement au fond des puits, et dans du milieu α MEM (M4526 Sigma) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 4mM de glutamine, 1% d'une solution «

AntibioticAntimycotic » (A5955 Sigma : solution stock 100X contenant 10000 unités de pénicilline, 10 mg de streptomycine, et 25 µg d'amphotéricine par millilitre), 5 µL de FGF2 à 0.1 mg/mL. Le milieu fut remplacé tous les trois jours par du milieu neuf.

Après 12 jours de culture, les cellules étant arrivées à confluence, les puits sans surface (témoins) furent traités pendant 17 jours avec du milieu de différenciation spécifique adipogénique, ou ostéogénique StemPro® contenant 1% de solution «Antibiot ic-Antimycotic». Les témoins de différenciation chondrogénique ont étéensemencés dans des plaques 24 puits (Falcon™ Multiwell 24 well, Cat. no. 353047, Becton Dickinson, USA) à une densité de 3,5.10⁵ cellules par centimètre carré et immédiatement traités avec du milieu de différenciation chondrogénique StemPro® pendant 17 jours. Le milieu fut remplacé tous les trois jours par du milieu neuf.

La lignée de cellules de carcinome colique (Caco2) a également été utilisée pour tester le protocole d'expérience avant l'ensemencement des CS. Ces cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre dans des plaques 6 puits préalablement tapissées d'agarose. Le milieu de culture utilisé fut du DMEM (D5671 Sigma) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal décomplémenté, 4 mM de Glutamine et 1% de solution «Antibiotic-Antimycotic». Le milieu fut remplacé tous les trois jours par du milieu neuf.

II.3- Estimation du taux de confluence

Les taux de confluence furent déterminés manuellement par la méthode des grilles. Les photographies des cultures furent normalisées et contrastées avec le logiciel GIMP 2.8 et une grille de 408 cases fut appliquée. Le pourcentage de confluence pour chaque photographie fut calculé en déterminant le pourcentage d'occupation de la grille par les cellules. Le pourcentage de confluence pour chaque condition fut obtenu en calculant la moyenne des pourcentages de confluence de 10 photographies. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne ± l'erreur standard à la moyenne.

II.4- Fixation et colorations

Après élimination du milieu de culture, les surfaces et les tapis cellulaires furent rincés deux fois au PBS stérile 1X. Sous une hotte aspirante, 400 µL d'une solution de formaldéhyde 4% furent déposés au fond des puits et les plaques furent laissées 30 minutes à température ambiante. Pour les puits traités avec le milieu adipogénique, de l'isopropanol à 60% fut utilisé à la place du formaldéhyde (400 µL pendant 2 minutes). Le fixateur fut ensuite éliminé et les puits rincées trois fois à l'eau distillée. 400 µL de solution d'Oil Red O (1%), d'Alcian Blue (1%) préparée dans une solution d'HCl 0.1 N, ou d'Alizarin Red S (2%) à pH 4.2 furent

ensuite déposés au fond des puits pour révéler respectivement les gouttelettes lipidiques, les protéoglycanes et le calcium. Les colorants furent laissés 3 minutes au fond des puits avant d'être éliminés puis les surfaces furent rincées à nouveau trois fois à l'eau distillée. L'Alcian Blue fut préalablement rincé avec une solution d'HCl à 0.1 N. Les photographies furent réalisées au microscope inversé en utilisant le filtre bleu.

III- Résultats et discussions

III.1- Caractérisation de surface

Avant de pouvoir étudier l'influence des surfaces sur les CSMs issues de MO, un certain degré de caractérisation physico-chimique était nécessaire.

III.1.1- Angle de contact

La mesure des angles de contact est l'une des premières étapes de caractérisation de surfaces. Aisée à réaliser, elle consiste à déposer une goutte de liquide sur une surface et à mesurer l'angle entre la tangente à cette goutte au point de contact et la surface (angle de contact). La mesure de l'angle de contact renseigne sur l'étalement d'un liquide sur une surface (ici l'étalement de l'eau est étudié) et permet donc de déterminer et de se renseigner sur le profil polaire ou apolaire. Elle permet de vérifier l'hydrophilicité relative de nos surfaces d'intérêt, laquelle était requise pour une bonne adhésion cellulaire. Le mica et le silicium ayant des propriétés physico-chimiques très proches, les mesures furent réalisées sur des surfaces de silicium afin d'économiser le mica. Les mesures ont été réalisées sur un appareil Digidrop (GBX) à l'aide de gouttelettes d'eau calibrées. Trois mesures sont réalisées en triplicat pour chaque surface et la moyenne des trois valeurs fut considérée. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne $\pm$ l'erreur standard de la moyenne.

Les angles de contact avec l'eau des surfaces de silicium silanisées et greffées avec la FN ou le peptide RGD cyclique, et des surfaces de silicium traitées avec des PEM ont été donc mesurés.

Pour les surfaces silanisées et après la fonctionnalisation de la surface en suivant les étapes décrites dans la partie de silanisation en phase gazeuse de section expérimentale, nous avons combiné différentes techniques pour évaluer la bonne efficacité des processus que nous avons utilisés dans ce travail. La figure 54 représente les différentes étapes de fonctionnalisation de surface. Pour s'assurer rapidement du succès de la modification de surface, des mesures d'angle de contact ont été effectuées. A chaque étape de la modification de la surface, le

groupe terminal de la molécule va changer ce qui va influencer l'angle de contact de l'eau avec la surface et par suite il nous donnera donc des informations sur le profil de polarité de l'échantillon. Elle permet également de vérifier l'hydrophilicité relative des surfaces ayant des propriétés physico-chimiques très proches. Ainsi, les résultats des angles de contact pour des surfaces silanisées non hydrolysé, hydrolysé et greffées avec de la FN et le peptide RGD cyclique ainsi que pour des surfaces de silicium non traitées sont tous rassemblés dans le tableau 14.

Tableau 14: Valeurs des angles de contact des surfaces silanisées.

Echantillon	Angle de contact 1		Angle de contact 2	
	<i>Première mesure</i>	<i>Après 3 minutes</i>	<i>Première mesure</i>	<i>Après 3 minutes</i>
silane non hydrolysé	122,5	125,8	122.5	125.8
	121	122	121	122
silane hydrolysé (température ambiante)	80.8	71.5	80.8	71.5
	82,6	71,2	82,6	70,5
silane hydrolysé (50°C)	74.7	60.8	74.1	60.8
	72.9	54	72.4	54
Surface de silicium	Non traitée	Fibronectine	RGDcyclique	
	23±0,530°	39,62±1,648°	26,82±0,808°	

La diminution de l'angle de contact avec l'hydrolyse confirme la création de carboxyl groupe $O = C-OH$ à la surface de silicium. Les angles de contact obtenus, c'est-à-dire 122 ° pour le silane à terminaison ester et 60-70 ° pour le silane à terminaison acide carboxylique (la valeur dépend complètement de la condition d'hydrolyse) sont en accord avec les résultats de Hughes-Chinkhota [340]. Généralement, les surfaces hydrophobes présentent un haut angle de contact avec l'eau, jusqu'à 90 °. Dans leurs résultats, ils soulignent la nature hydrophobe du silane avec des groupes terminaux ester et le fait que sa diminution est liée à l'hydrolyse des groupes ester. Ceci suggère donc que la réaction d'hydrolyse acide a réussi à créer des groupes acides à la surface de nos substrats. De plus, en augmentant le temps de contact de la goutte d'eau sur les surfaces, l'angle de contact diminue, ce qui confirme l'existence d'une interaction entre les groupes chimiques greffés sur la surface des substrats de silicium, en

effet, les groupes d'acide carboxylique sont capables d'interagir avec l'eau par des interactions acide/base contrairement aux groupes esters qui sont inertes.

La liaison Si-O-Si est sensible aux milieux acides, c'est pourquoi nous avons sélectionné 2 conditions, à faible concentration en acide, mais à deux températures différentes (température ambiante et à 50 ° C), les deux substrats ont été mis en contact avec la solution acide pendant 2 heures. Pour vérifier l'influence de l'hydrolyse sur la monocouche de silane, nous avons également effectué des mesures d'angle de contact de l'eau en vue de ses résultats rapides. Comme prévu, nous n'avons noté aucun changement dans les surfaces non traitées et une augmentation visible de l'hydrophilicité dans les deux autres cas. En ce qui concerne les résultats de l'angle de contact avec l'eau, l'angle le plus bas a été observé pour les substrats hydrolysés à 50 ° C, ce qui confirme que dans ces conditions, nous avons créé une plus grande quantité de groupes OH-C = O à la surface de nos substrats. De plus, nous avons observé une différence de 20 ° en 3 minutes seulement après le dépôt de la goutte d'eau, ce qui montre que la surface est beaucoup plus réactive.

Les résultats des angles de contact des surfaces fonctionnalisées par la méthode de PEM, en utilisant deux couples de polyélectrolytes chitosan/PAA et chitosan/PSS et variant le nombre de couches, sont rassemblés dans le tableau 15.

Tableau 15: Valeurs des angles de contact des surfaces à dépôt de polyélectrolytes de différents cycles.

Couple Nombre de cycles	chitosan / PAA	chitosan / PSS
5	55.76	68.2
10	34.96	48.98
15	70.02	55.88
20	63.99	43.78

Les angles de contact des surfaces ayant subi 5, 10, 15, et 20 cycles de dépôts de polyélectrolytes pour les deux couples étant tous inférieurs à 90°. Ces surfaces présentent donc des profils plus apolaires que les surfaces non traitées (23°), lesquels sont supérieurs à ceux des surfaces silanisées greffées avec les molécules naturelles (FN et RGD cyclique) qui révèlent une légère baisse d'hydrophilicité des surfaces. Alors, ces traitements réalisés ont

donc tous affecté le profil polaire du silicium, ce qui suggère que nos surfaces demeurent toutefois suffisamment hydrophiles pour permettre l'adhésion cellulaire.

III.1.2- XRR (Specular X-ray Reflectivity)

Les mesures d'angles de contact nous ont permis de confirmer que nous avons réussi de greffer et d'hydrolyser des molécules dérivées de silane. Mais pour ce travail, il est crucial de greffer une monocouche. En effet, la molécule de silane contient des groupements Si-Cl qui sont capables d'interagir avec les groupes d'ester en fonction des conditions de la réaction. En vue de sa haute résolution, la technique XRR (la réflectivité des rayons X, abréviation de l'anglais « *Specular X-ray Reflectivity* ») a été utilisé pour déterminer si le processus de silanisation en phase gazeuse que nous avons développé permettait le greffage d'une monocouche ou de bicouches

Le silane utilisé contient 10 carbones, en tenant compte du fait que la longueur de la liaison C-C-C est d'environ 2,5 Angstrom, nous nous attendions à une épaisseur d'environ 1,5 nm.

La silanisation en phase gazeuse a été conduite à différentes températures, 100 ° C; 80 ° C, 70 ° C. Une fois mesurées, toutes les couches ont une épaisseur d'environ 3 nm, ce qui signifie qu'une bicouche a été greffée sur la surface et pas une monocouche. Nous avons alors décidé de diminuer à nouveau la température jusqu'à 50 ° C, et les résultats de XRR confirment une épaisseur de monocouches (une épaisseur d'environ 2 nm a été mesurée). Nous avons donc enfin mis en place la silanisation en phase gazeuse pour le greffage d'une monocouche du 10 - (carboxyméthoxy) décyltriméthylchlorosilane (figure 58).

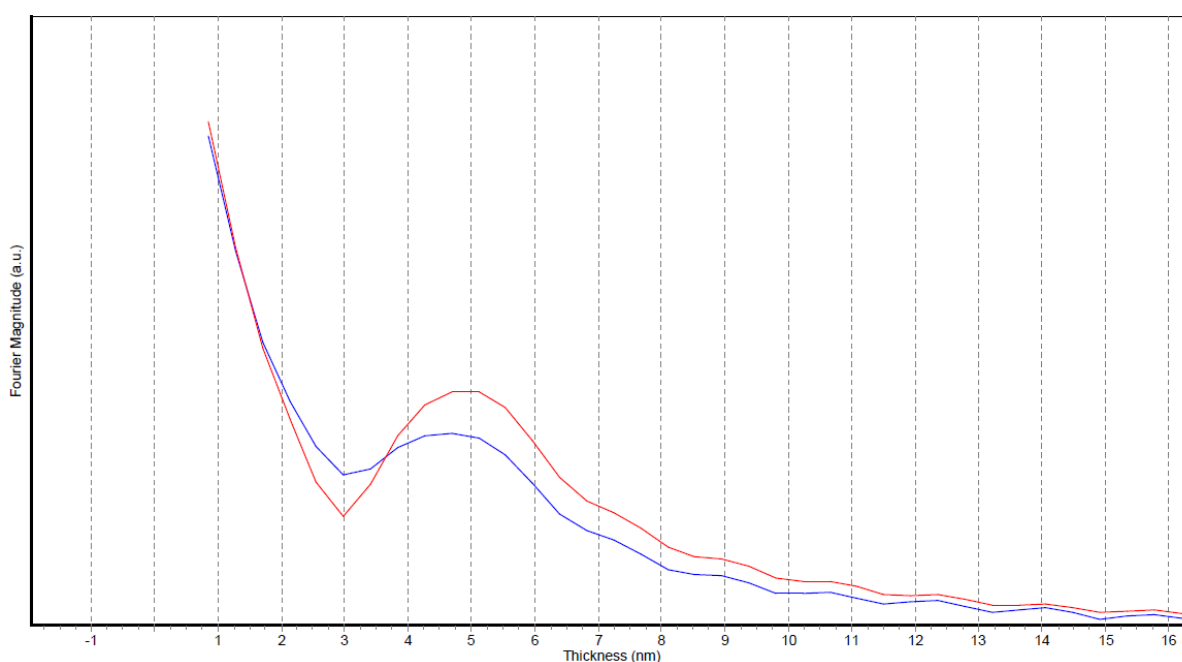


Figure 58: Epaisseur des monocouches de silane mises en place par la silanisation en phase gazeuse mesurée par XRR.

III.1.3- XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy)

La Spectroscopie photoélectronique par rayons X (XPS, abréviation de « *X-ray Photoelectron Spectroscopy* ») a été utilisée pour confirmer la silanisation sur nos surfaces, et montrer le greffage de FN et cycRGD sur les monocouches.

Le spectre de base C 1s (figure 59) de la monocouche greffée par 10 - (carboxyméthoxy) - décyltriméthylchlorosilane présente trois composants principaux. Le pic principal est centré à 284,8 eV est attribué aux atomes de carbone aromatiques. Les deux autres composants qui apparaissent autour de 286,4 et 289 eV sont caractéristiques des carbones aliphatiques liés à l'oxygène [343]. Le premier provient des espèces C-O (groupes C-O et C-OR) et le second des espèces doubles O-C = O (groupes acide carboxylique et ester). Les spectres C 1s du 10 - (carboxyméthoxy) - décyltriméthylchlorosilane après l'hydrolyse alcaline, présentent aussi trois composantes principales mais le pic lié aux liaisons C = O et O-C = O est beaucoup plus prononcée comme on peut le voir dans les spectres du haut de la figure 59 de l'échantillon 2.

Une fois le NHS est greffé à la surface (figure 61), les spectres C1s restent similaires à ceux de la surface de silane hydrolysée (figure 61, échantillon 3). Mais, en analysant l'azote, leur zone d'énergie de liaison respective correspondant au spectre caractéristique de la liaison de l'azote avec le carbone aliphatique (400 e.v) pour la surface de silane dérivée de NHS (figure 60, échantillon 3) a été obtenue. La silanisation a été ainsi confirmé par l'apparence de pic N 1s à 400 e.v [343].

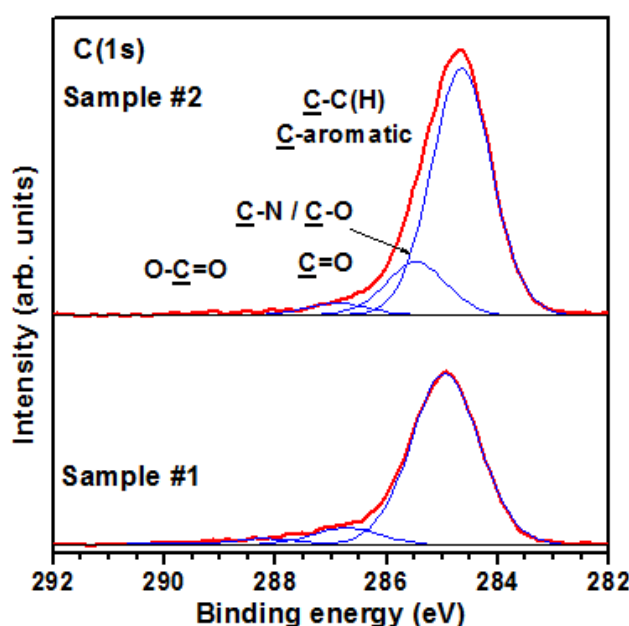


Figure 59: Les spectres C1s des surfaces silane – ester (échantillon 1) et des surfaces silane – acide carboxylique (échantillon 2).

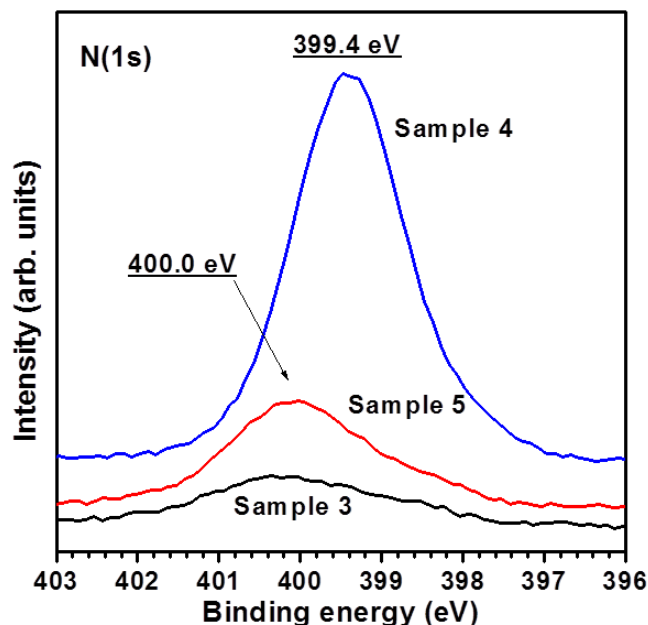


Figure 60: Les spectres N1s des surfaces silane – NHS (échantillon 3), des surfaces après le greffage de RGDcyclique (échantillon 4) et des surfaces après le greffage de la fibronectine (échantillon 5)

Les spectres de base C 1s des échantillons de silane greffés par le RGDcyc et la FN montrent des changements significatifs (figure 61, échantillon 4 et 5 respectivement). Un composant principal est toujours centré à 284,8 eV, qui sont l'empreinte des atomes de carbone aromatiques. Les deux pics qui sont décalés pour apparaître autour de 285,9 et 287,8 eV sont beaucoup plus intenses. Ces deux derniers pics sont caractéristiques des carbones aliphatiques liés à l'azote (C-N) et des carbones aliphatiques impliqués dans le groupe amide (N-C=O), respectivement. De plus, un composant centré à 399,8 eV caractéristique de l'azote impliqué dans le groupe amide (N-C=O) apparu dans le spectre de base N 1s de ces échantillons (figure 60, échantillons 4 et 5). Ces spectres C 1s et N 1s sont ceux qui sont attendus pour le RGDcyc et la fibronectine. Il est donc évident que le procédé que nous avons développé permet le greffage de la FN et du RGDcyc à la surface des surfaces de silicium oxydé.

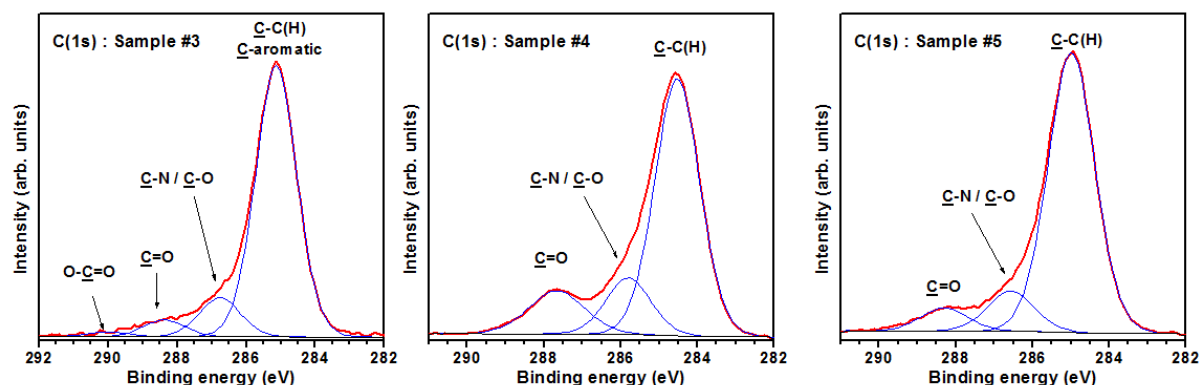


Figure 61: Les spectres C1s des surfaces silane – NHS (échantillon 3), des surfaces après le greffage de RGD cyclique (échantillon 4), des surfaces après le greffage de la fibronectine (échantillon 5).

III.1.4- AFM (Atomic Force Microscopy)

La microscopie à force atomique (AFM, d'après l'anglais « *Atomic Force Microscopy* ») est utilisée pour examiner la morphologie de surface du film. Des images par AFM ont été enregistrées afin d'obtenir des informations sur l'homogénéité des surfaces modifiées car des zones non greffées sur la couche seraient extrêmement nuisibles pour l'application biologique ultérieure des surfaces. Les images topographiques des silanes modifiés par EDC/NHS indiquent que la couche est homogène (les points blancs sont liés aux sels qui sont déposés au cours de la réaction) Ces sels peuvent être éliminés lorsque la surface est immergée dans une solution de PBS comme ils sont plus solubles (figure 62 A). Une fois le RGDcyc est greffé (voir figure 62 B), la surface reste homogène. Comme le RGDcyc est une molécule, aucune modification importante de la surface n'était attendue. Une fois la FN est greffée, la topographie de la surface présente de nouvelles caractéristiques, comme on peut le distinguer sur les figures 62 C et D. De plus, une organisation protéique parallèle peut être clairement observée à petite échelle ou les lignes de cette organisation sont représentées sur la figure 62 D.

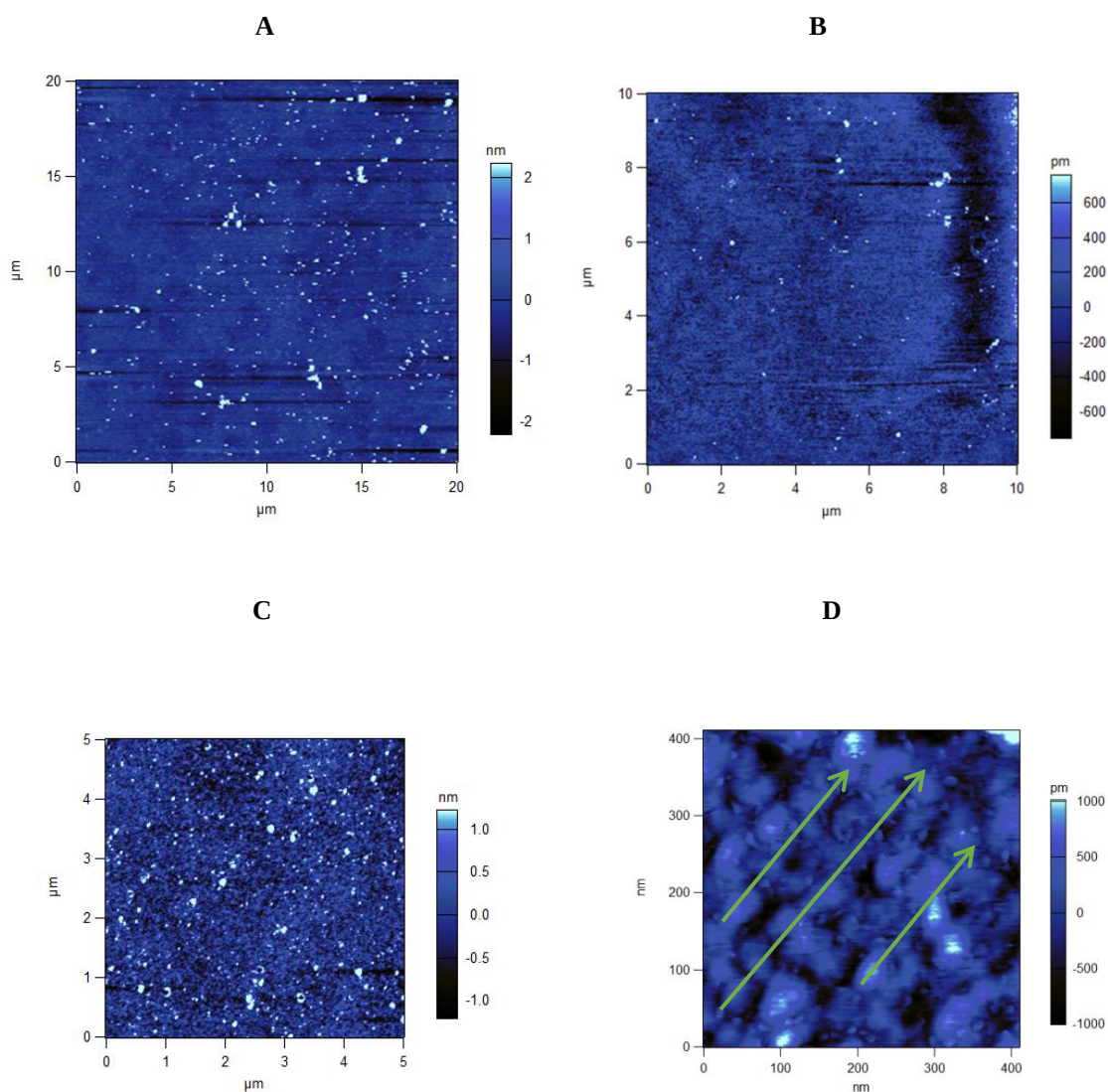


Figure 62: Images d'AFM montrant les surfaces silanisées et modifiées. (A) Silane+EDC/NHS, (B) Silane + EDC/NHS+RGDcyc, (C) Silane+EDC/NHS+fibronectine (grande échelle), (D) Silane+EDC/NHS+fibronectine (petite échelle).

III.2- Etude biologique

III.2.1- Mise à l'épreuve du protocole expérimental

Le nombre de surfaces utilisables et la source de cellules souches étant restreint, il était important de vérifier en amont la méthode de culture employée au cours de ces tests. Des cellules de carcinome colique (Caco2) furent donc d'abord mises en culture sur des surfaces de verre et observées.

Les cellules Caco2 adhèrent et prolifèrent normalement sur le verre dégraissé à l'éthanol à 96% (sur nos surfaces d'intérêt, ce dégraissage est réalisé par le mélange piranha) et les

supports de culture traditionnels (TCPS). En revanche leur adhésion est inhibée sur la couche d'agarose à 1% (figure 63).

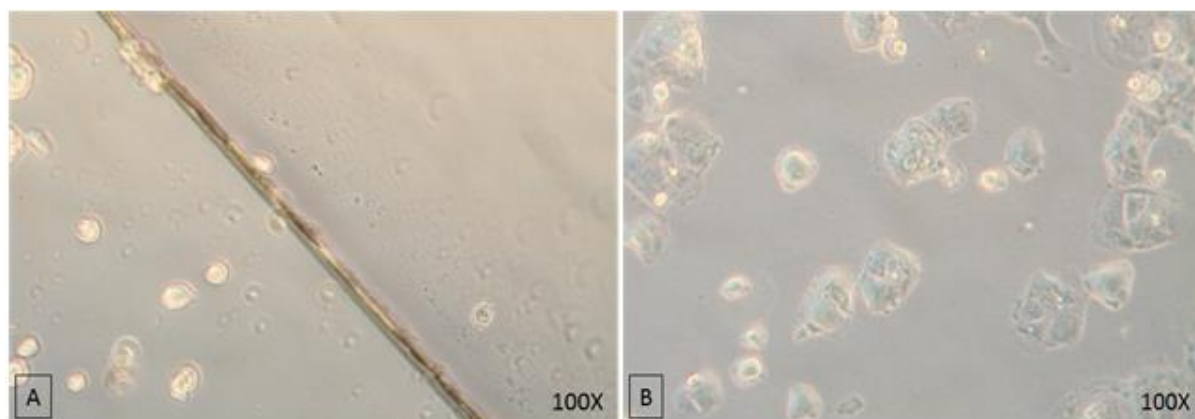


Figure 63: Validation du protocole de culture par les Caco2. (A) L'inhibition de l'adhésion des cellules Caco2 par l'agarose 1%. (B) L'adhérence normale des cellules Caco2 sur le verre dégraissé à l'éthanol à 96%.

III.2.2- Estimation de la confluence cellulaire

La confluence des cellules après 12 jours de culture a été calculée dans les différentes conditions afin d'estimer l'impact des surfaces sur la croissance cellulaire.

Les cellules cultivées sur les surfaces greffées avec la FN sont celles qui donnent le meilleur résultat avec un pourcentage moyen de confluence de 93.25 ± 2.75 %. De plus ces cellules sont les seules à avoir un taux de confluence supérieur aux contrôles. Les autres conditions ne dépassent pas 80% de confluence. Les cellules cultivées sur les surfaces greffées avec le peptide RGD cyclique de la FN présentent un pourcentage de confluence de 57.45 ± 6.45 %. Les cellules cultivées sur les surfaces modifiées avec cinq couches du couple Chitosan/PAA présentent un pourcentage de confluence de 61.00 ± 4.08 %. Enfin, les cellules cultivées sur les surfaces modifiées avec cinq couches du couple Chitosan/PSS) présentent un pourcentage de confluence de 54.75 ± 1.75 % (figure 64). Il est important de noter que les cellules cultivées sur les PEM ont subi un temps de latence pendant les trois premiers jours de culture après ensemencement.

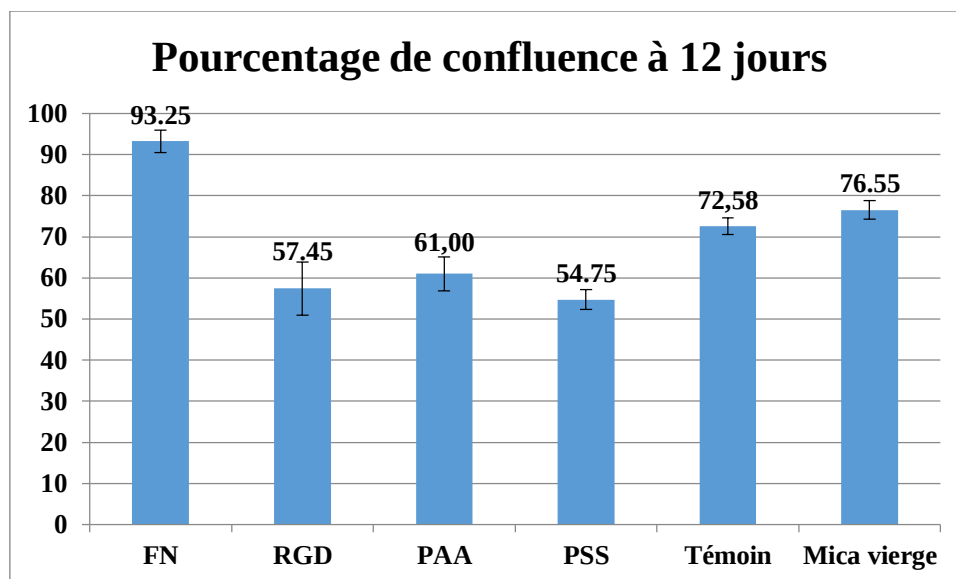


Figure 64: Pourcentage de confluence à 12 jours des CSMs de moelle osseuse.

Après 12 jours de culture, les tapis cellulaires furent photographiés afin d'estimer le pourcentage de confluence des cellules en fonction du traitement de surface.

III.2.3- Comparaison morphologique

Afin de déterminer l'impact des traitements de surface sur la morphologie cellulaire, les phénotypes des CSMs de MO cultivées en condition contrôle, sur des surfaces de mica vierges et sur les surfaces de mica traitées ont été comparés.

Les cellules cultivées sur les surfaces de mica vierges présentent une morphologie allongée de type fibroblastique, similaire à celle des cellules de la condition contrôle (figure 65 A et 65 B) à la différence que celles-ci semblent avoir davantage de difficultés à s'étaler sur le support et ont tendance à conserver un phénotype en aiguille.

Les cellules cultivées sur les surfaces modifiées, qu'il s'agisse des surfaces greffées avec la FN ou le peptide RGD cyclique, ou des surfaces ayant subi un dépôt de PE, présentent une morphologie fibroblastique très nette et étalée (figure 65 C à 65 F). Ces cellules prennent davantage d'espace que cellesensemencées sur les surfaces de mica vierge, leur morphologie étant donc plus proche de celle des cellules en condition contrôle.

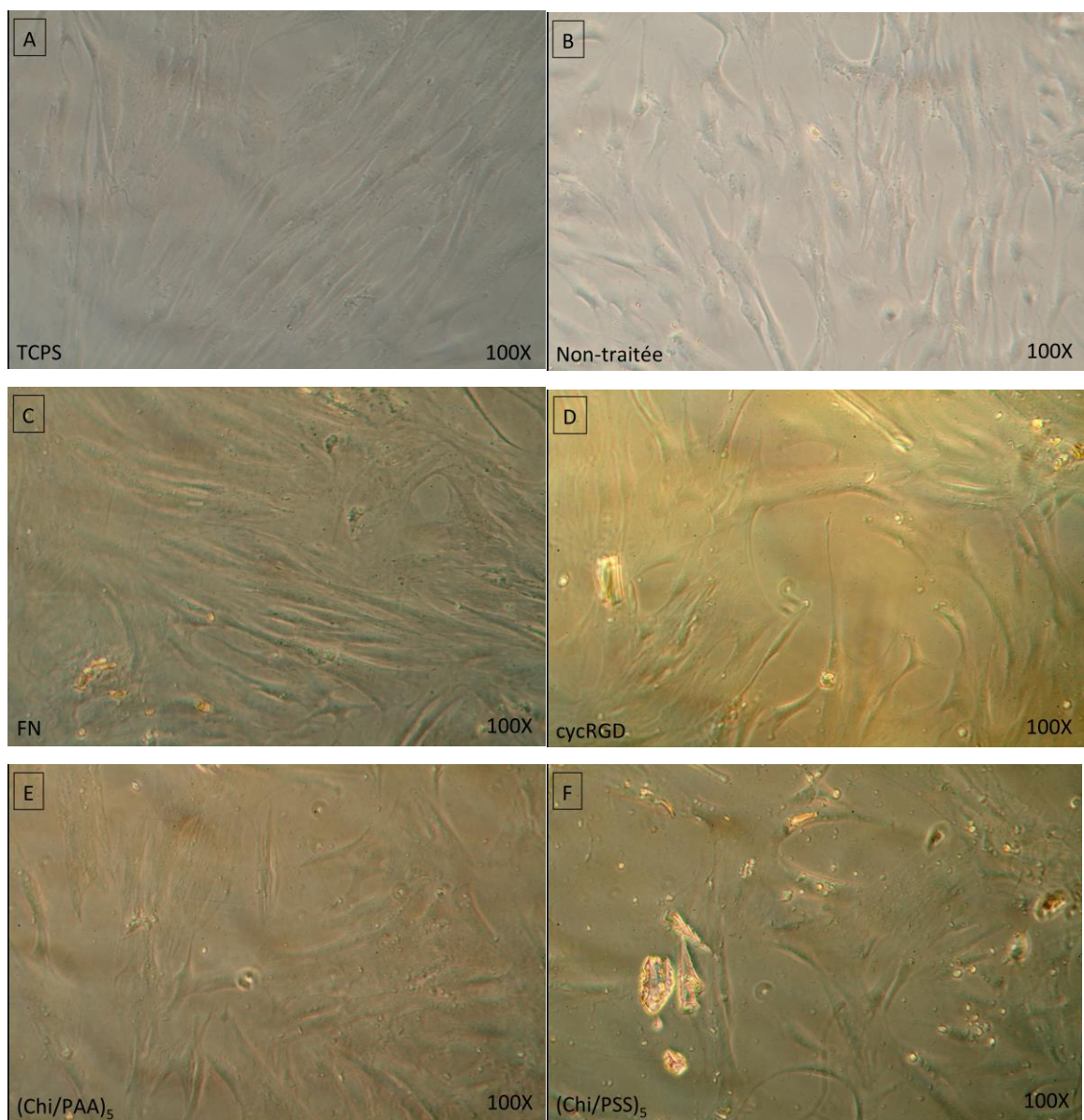


Figure 65: Comparaison morphologique des cellules cultivées sur les surfaces aux différents traitements.

III.2.4- Test de différenciation

Les colorations des surfaces traitées à l'Oil Red O, l'Alcian Blue et l'Alizarin Red S sont restées sans effet. En effet, et contrairement aux puits témoins, ces surfaces, qu'elles aient été greffées avec des molécules naturelles ou qu'elles aient été traitées avec des PE, ne montrent aucune coloration. Les morphologies typiques des adipocytes, des chondrocytes et des ostéoblastes ne sont pas visibles, suggérant une absence de différenciation des CSMs sur ces surfaces et pour ce temps de traitement (figure 66).

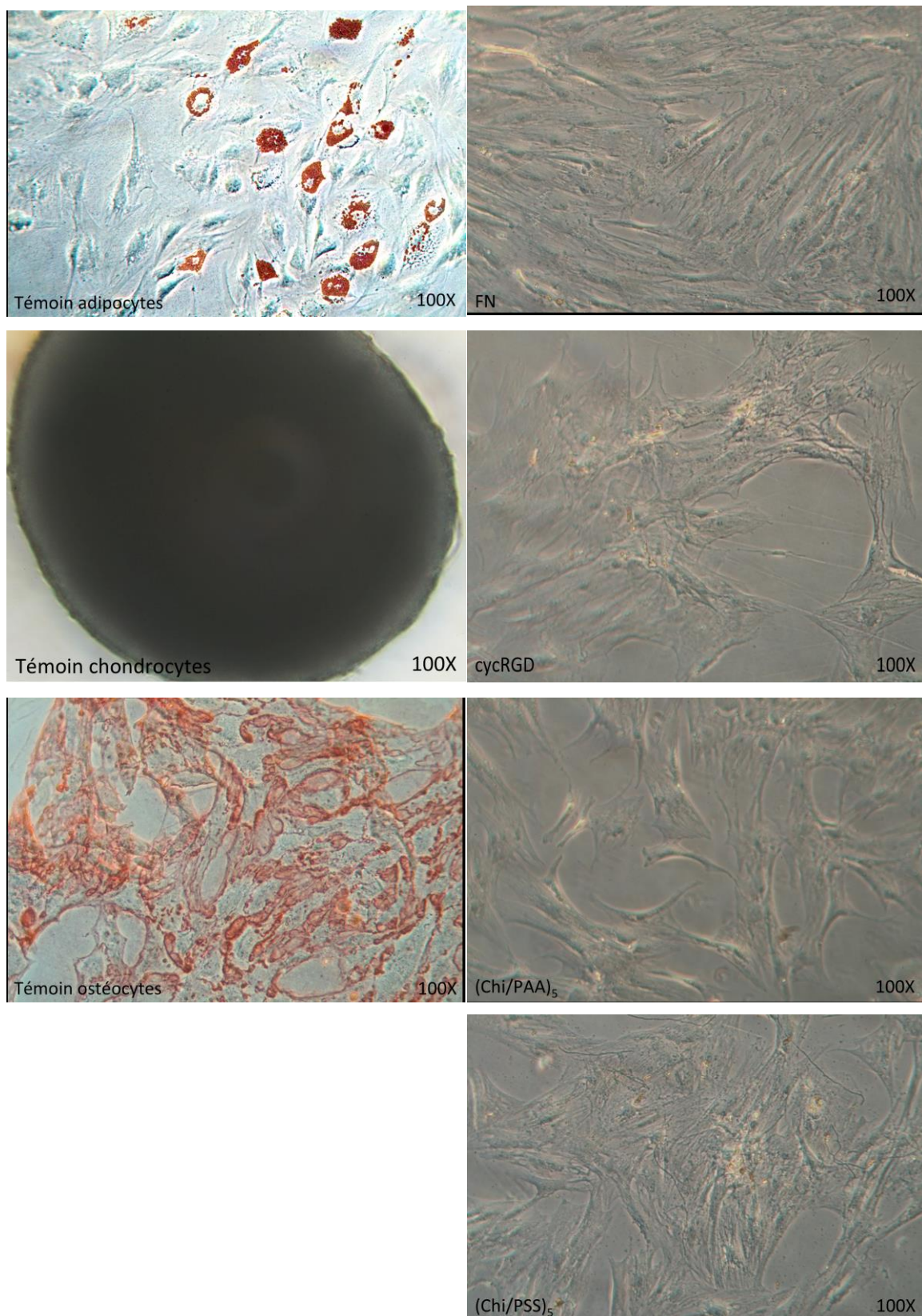


Figure 66: Les différents tests de différenciation via la coloration des surfaces traitées à l'Oil Red O, l'Alcian Blue et l'Alizarin Red S.

III.3- Discussions et perspectives

En condition physiologique, les cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse ont une morphologie de type fibroblastique, c'est-à-dire une forme toute en longueur, et s'étalent sur leur support. Ce phénotype se retrouve sur les cellules cultivées sur le TCPS et sur les surfaces de mica traitées. L'étalement relativement réduit des cellules sur le mica vierge peut s'expliquer par des conditions moins propices à l'adhésion. Malgré un profil hydrophile et bien que permettant l'adhésion stricte et la prolifération cellulaire, cette surface non traitée n'offre pas un environnement parfaitement satisfaisant aux cellules.

Les cellules cultivées sur la fibronectine et le peptide RGD cyclique quant à elles ont accès à des sites de liaison sur lesquels elles adhèrent en condition physiologique, favorisant leur liaison au support et leur étalement dans toutes les directions. Les CSMsensemencées sur la FN semblent avoir mieux proliféré que dans toutes les autres conditions. De plus, elles ont proliféré plus vite que sur les supports de culture classiques, démontrant l'efficacité du traitement de surface avec cette protéine. Les surfaces greffées avec le peptide RGD cyclique n'ont pas étéensemencées de façon très homogène, ce qui peut justifier le plus faible pourcentage de confluence obtenu par la méthode des grilles par rapport aux surfaces greffées avec la FN.

Le temps de latence de 3 jours des cellulesensemencées sur les surfaces traitées par les multicouches de polyélectrolytes peut être responsable de la différence de confluence à 12 jours avec les autres traitements. Pendant ce laps de temps, les cellules ont conservé une morphologie en aiguille, similaire à celle des cellules cultivées sur le mica vierge, et ne se sont pas divisées. Ce temps de latence correspond à une période d'adaptation des cellules à leur support. Une fois adaptées, les cellules se sont étalées et ont proliféré normalement. Le profil plus apolaire de ces surfaces peut expliquer cette latence, les cellules étant capables d'adhérer aux supports mais n'étant pas dans les conditions optimales de croissance. Ces résultats peuvent être directement liés au protocole de dépôt, le pH des différents PE ayant une influence sur la structure finale des multicouches comme l'ont mentionné Aggarwal et al [211].

Les surfaces planes n'ont pas induit de différenciation des CSMs de MO après 12 jours de culture, date à laquelle les cellulesensemencées sur la FN atteignaient leur confluence maximale. Ces résultats, couplés à l'étude morphologique des cellules indiquent que les traitements de surface seuls ne sont pas suffisants pour induire une différenciation de ces cellules. Cette conclusion s'oppose aux résultats de Lee et al [240] qui avaient obtenu un début de différenciation spontanée des CSMs de MO de 10 à 20% sur des hydrogels

d'acrylamide greffés avec la FN. Il est toutefois important de remarquer la différence de rigidité entre ces hydrogels et nos surfaces de mica. D'autre part, si les cellules témoins soumises aux milieux de différenciation se sont engagées dans les voies adipogénique et ostéogénique sous le seul effet des facteurs différenciant, la différenciation chondrogénique a quant à elle nécessité un ensemencement à une densité très élevée. Ce n'est qu'en présence de milieu de différenciation chondrogénique et à cette très haute densité que les cellules se sont réorganisées en micromasses. Cette absence de différenciation peut signifier un maintien de la voie proliférative de ces cellules par les surfaces, ce qui serait particulièrement vrai pour celles greffées avec la FN. D'une façon complémentaire, cela pourrait impliquer un maintien des propriétés souches de ces cellules.

L'étude des surfaces de mica traitées nous a apporté des renseignements essentiels sur le comportement des CSMs de MO sur des supports homogènes. Si ces polyélectrolytes pourraient s'avérer très intéressants notamment pour le détachement facilité et contrôlé des cellules souches sans action enzymatique, la FN semble être de loin la molécule la plus efficace dont nous disposons actuellement. La caractérisation approfondie du profil cellulaire après culture sur ces surfaces doit être sérieusement considérée pour confirmer ou infirmer un maintien des propriétés souches.

La prochaine étape de ce projet sera l'étude des surfaces de chimie et géométrie contrôlées afin de comparer leur impact potentiel sur la différenciation des cellules souches avec les résultats obtenus dans cette partie, mais dans le chapitre 3 on a limité l'étude de l'impact des surfaces de chimie et géométrie contrôlées seulement à l'assemblage des bactéries (*E.coli*) sur telles surfaces bifonctionnelles.

IV- Conclusion et perspective

Comme il a été montré dans la revue bibliographique, toutes les cellules d'organes primaires sont dépendantes de l'ancrage, ce qui nécessite des environnements spécifiques incluant un matériau de support spécifique pour leur développement. Au cours de cette partie de travail, nous réussissons à mettre en place une silanisation en phase gazeuse des surfaces de silicium oxydé ainsi que pour des surfaces de mica. Une monocouche de silane a été obtenue avec succès, ce qui a permis le greffage de molécules biologiques comme le RGD cyclique et la fibronectine. La combinaison de différentes techniques de caractérisation nous a permis de confirmer que les molécules sont greffées d'une manière homogène. Enfin, lorsque les surfaces ont été soumises à des cellules souches, nous avons pu constater que même si ces surfaces ne permettent pas la différenciation des cellules souches, elles sont cytocompatibles, c'est-à-dire qu'elles permettent la croissance des cellules souches et un taux de confluence élevé est obtenu pour les surfaces dérivées de la fibronectine.

Ce travail ouvre la voie à un projet plus générique qui combinera la modification de la chimie et la géométrie de surface pour déterminer les paramètres pouvant jouer un rôle majeur dans le développement et/ou la différenciation des cellules souches.

Chapitre 3 :
Fonctionnalisation et assemblage des
bactéries sur des
surfaces bifonctionnelles naturelles

Chapitre 3 : fonctionnalisation et assemblage des bactéries sur des surfaces bifonctionnelles naturelles

I- Introduction

En milieu naturel, 90% des espèces bactériennes comme les souches E.coli et autres ne vivent pas individuellement en suspension, mais en communautés complexes adhérant à des surfaces, autrement dit le mode de vie dominant des bactéries est probablement en biofilm. Cependant l'étude du développement du biofilm et l'adhérence bactérienne reste un défi, dont un large éventail de facteurs intervient dans l'interface bactéries/matériau qui joue un rôle important dans de nombreux domaines industriels et médicaux [314].

Un grand nombre de travaux publiés ont porté sur l'influence des propriétés de surface sur le comportement des bactéries insistant sur les rôles de la topographie [337, 346, 347], de la chimie [329, 348, 349] et de la fonctionnalité de surface [350– 352]. Et comme ces études et autres sont intéressées au rôle du support de culture sur l'assemblage des bactéries, le travail proposé dans cette étude repose alors sur la mise en œuvre des procédés de modifications chimiques qui interviennent la structure chimique du matériau (silanisation par phase gazeuse), géométriques qui s'effectuent d'une manière mécanique (lithographie électronique) et biologiques qui agissent au niveau protéique (fibronectine, RGD cyclique). Ces techniques de modifications de surfaces de culture permettent notamment d'étudier l'adhésion et l'assemblage des bactéries.

L'objectif de ce travail est de :

- Développer des surfaces homogènes naturelles modifiées chimiquement ainsi des surfaces patternées naturelles (modifiées géométriquement en déposant des molécules naturelles).
- Mettre en évidence l'effet de la surface de culture sur le comportement des bactéries.

Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés alors à deux questions essentielles :

- Quelle est l'influence de l'état de surface sur l'adhésion et la colonisation d'une surface?
- Quels phénomènes vont intervenir sur E. coli lorsque la structure de la surface est variée?

Pour ce but et pour essayer de répondre à ces questions nous avons réalisé une étude approfondie de l'adhésion et de la colonisation de E. coli sur des surfaces à physico-chimie

contrôlée, pour ensuite transposer nos études sur des bactéries non pathogènes (mais cela ne sera pas fait dans le cadre de ce travail).

Par ailleurs, et à côté des surfaces homogènes silanisées, une combinaison d'une étape de nano-fabrication accompagnée d'une étape de silanisation et de purification est effectuée sur des surfaces de mica, suivies finalement par un greffage avec des molécules naturelles (la fibronectine et le RGD cyclique). Ensuite, des souches d'E. coli 2146 sont cultivées sur de telles surfaces. Et après, les résultats de culture bactérienne sur les surfaces traitées sont comparés avec des cultures témoins réalisées sur les surfaces de mica non traitées vierges, afin de pouvoir définir l'influence de la chimie et la géométrie des surfaces et d'étudier les comportements des bactéries résultants de l'impact direct de la modification de la surface sur la souche E.coli.

II- Section expérimentale

II.1- Préparation des surfaces naturelles patternées et homogènes

Dans la présente étude, les surfaces destinées à la culture bactérienne sont de deux types :

- Le premier est patterné ayant subi des modifications géométriques par la technique de la lithographie électronique puis modifié chimiquement par le procédé de la silanisation en phase gazeuse et ensuite greffé par des molécules biologiques (fibronectine et RGD cyclique).
- Le deuxième est homogène et silanisé ayant subi une modification chimique par la technique de la silanisation en phase gazeuse et greffé encore par des molécules biologiques (fibronectine et RGD cyclique).

Pour les études bactériennes, les travaux ont été réalisés sur des surfaces de mica de 1 centimètre carré. Avant ces telles cultures, les surfaces ont préalablement été nettoyées avec l'éthanol pour éliminer toute contamination ou des poussières.

II.1.1- Préparation des surfaces patternées naturelles

II.1.1.1- Lithographie électronique

Le principe de la lithographie électronique est basé sur l'irradiation de films minces de PMMA (poly (méthacrylate de méthyle)) déposés sur un substrat. Le rayonnement électronique induit une scission de la chaîne dans la zone PMMA irradiée, qui peut être éliminée par une dissolution dans un mélange de solvants. Le développement de surfaces (substrats) est une étape critique pour la production de petites structures (motifs) [353, 354]. Une bonne conception de la distribution de masse du PMMA et de sa masse molaire moyenne est également une étape critique pour la résolution finale. Les interactions entre les électrons énergétiques et la matière représentent un point essentiel pour la résolution des motifs (patterns) [353]. Le principal avantage de la lithographie électronique consiste à générer directement des motifs haute résolution à partir d'un logiciel informatique.

En lithographie électronique, des surfaces de silicium et de mica de 2 centimètres carrés ont été utilisées. Les surfaces ont préalablement été trempées dans un bain piranha pendant 30 min pour les nettoyer et éliminer toute contamination par des poussières sous une hotte.

Après les suites des manipulations de lithographie sur ces surfaces nettoyées ont été transférées aux salles rouge et blanche de CC-MiNaLor de l'institut Jean Lamour.

Dans un premier temps et sous une hotte à flux laminaire en salle rouge, les surfaces sont préparées par enrésinement suivant ces différentes étapes :

- Nettoyage des surfaces avec de l'acétone, et comme l'acétone laisse des résidus sur les surfaces alors un deuxième nettoyage par l'isopropanol est nécessaire, puis séchées avec de l'azote gazeux.
- L'enduction centrifuge (plus connue sous son nom anglais de *spin coating*) qui consiste à déposer une couche mince et uniforme sur la surface plane d'un substrat. Une seule couche de résine PMMA/MA a été déposée sur les surfaces, et selon le programme 10 du machine *spin coater* utilisée (vitesse = 5000 tours/min, accélération = 7000 tours/min, temps = 90s), la résine est bien déposée uniformément sur les surfaces de silicium et mica d'une épaisseur d'ordre de 50nm détectée par la technique de profilométrie en utilisant un profilomètre mécanique (Tencor P6).
- Recuit des résines sur une plaque chauffante selon le programme 5 de celle-ci (température = 180°C, temps = 300s).

Dans un deuxième temps, Les surfaces enrésinées passe à la lithographie électronique, une différence réside entre les surfaces de silicium et mica notamment dans la phase qui précède la lithographie. Au contraire des surfaces de silicium qui sont opaques les micas sont transparents, d'où la nécessité de faire un dépôt d'aluminium sur les surfaces de mica avant la lithographie suivie d'une évaporation thermique pour 2-3 heures.

La lithographie des surfaces se passe dans un système de lithographie RAITH 150-II qui offrira des possibilités inédites en termes de résolution (inférieure à 10 nm), parallèlement ce système est connecté à un software « RAITH 150-TWO » qui nous permet de suivre le trajet de l'échantillon à l'intérieur de cet appareil d'une part, et d'ajuster la distance de travail optimale des électrons, régler leur tension et leur champ d'écriture, mesurer le courant des faisceaux (307.92 pA) et fixer la position de l'échantillon d'autre part.

Ensuite, une étape de développement des surfaces est nécessaire pour le repérage des motifs par le microscope optique :

- Les surfaces de silicium sont développées par des solutions de MIBK/IPA (2:3) pendant 1 minute après par l'IPA pendant 30s.
- Pour les surfaces de mica, le dépôt d'aluminium est enlevé avant le développement par une solution de MF319 pendant à peu près 2 minutes jusqu'à que la surface devient transparent du nouveau puis avec de l'eau deionisé pour 30s. Ensuite, elles sont développées de la même manière des surfaces de silicium.

Les figures 67 et 68 représentent le résumé des différentes étapes de la lithographie électronique des surfaces de silicium et des surfaces de mica respectivement.

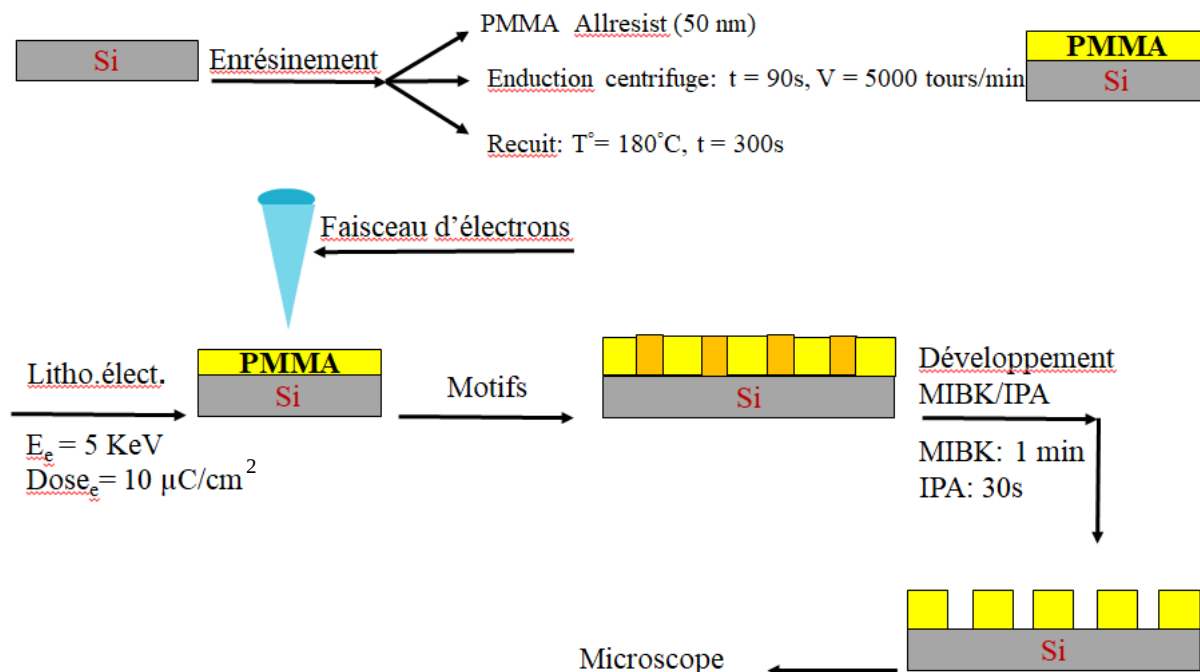


Figure 67: les différentes étapes de la lithographie électronique des surfaces de silicium.

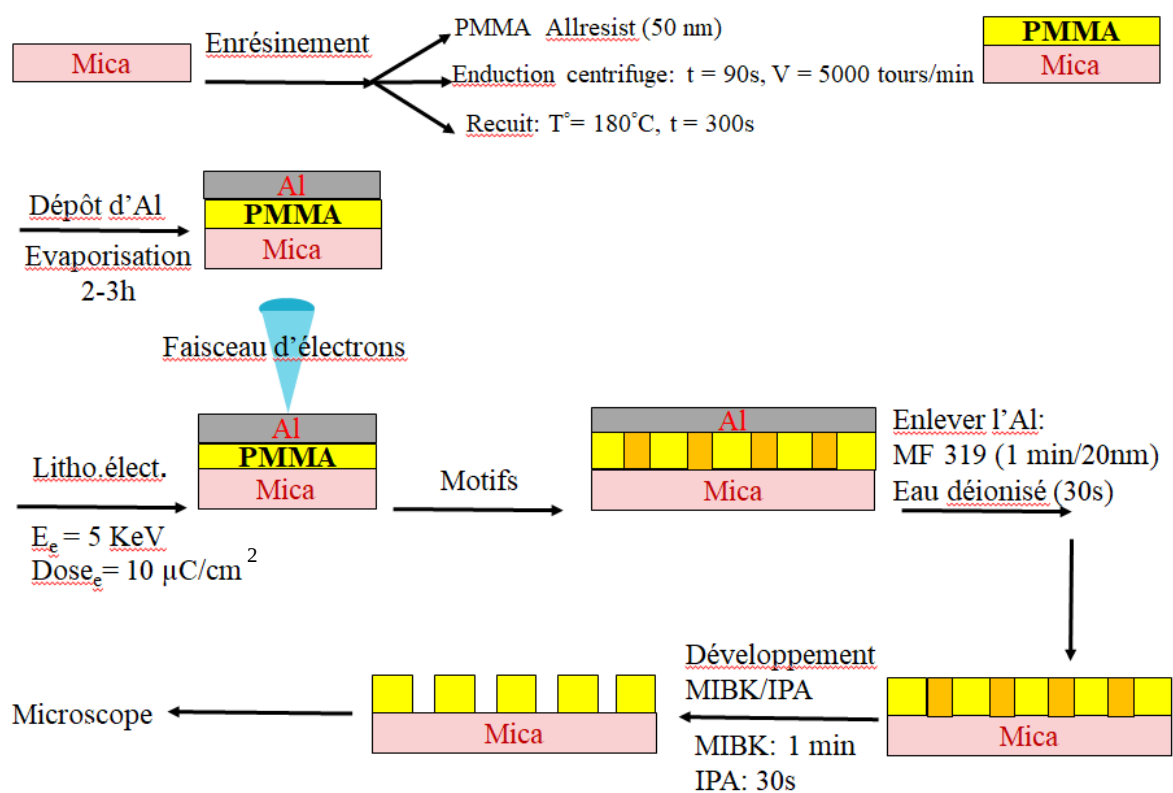


Figure 68: Les différentes étapes de la lithographie électronique des surfaces de mica.

Les motifs repérés par le microscope optique (objectif 50x) sont de forme rectangulaire d'une longueur = 40 μm et d'une largeur = 10 μm .

Quatre types de motifs sont écrits et se différencient par la période entre eux. L'énergie des électrons utilisée est de l'ordre de 5 Kev alors que la dose des électrons est de 10 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$.

La figure 69 représente les différents motifs dessinés par le système de lithographie électronique où la différence en période est bien illustrée dans la figure ci-dessous :

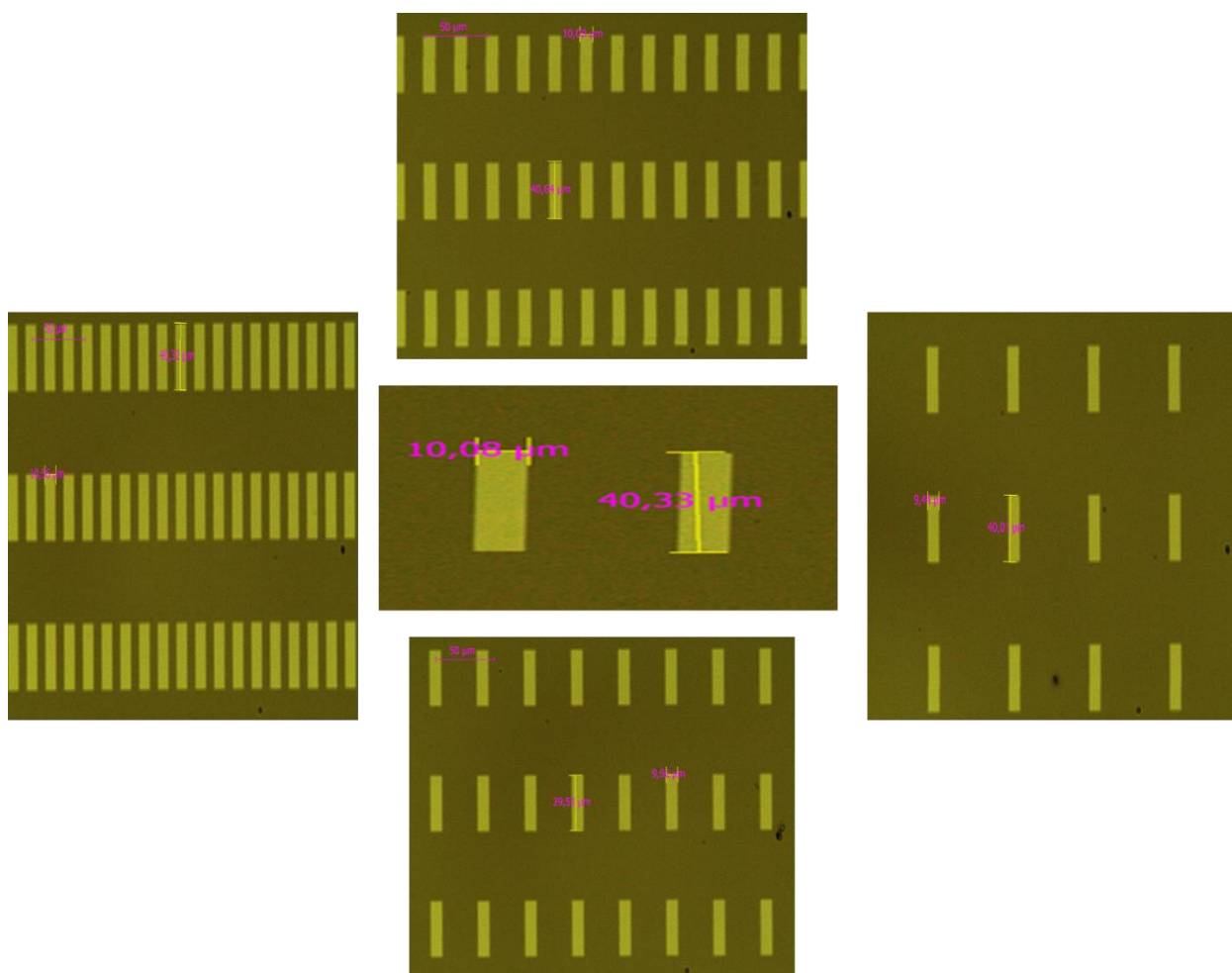


Figure 69: Les différents motifs obtenus par lithographie électronique et repérés par le microscope électronique.

II.1.1.2- Silanisation en phase gazeuse et greffage des molécules naturelles

Toutes nos surfaces patternées sont ensuite seront être silanisées par la technique de la silanisation en phase gazeuse puis greffées par les molécules d'adhésion naturelles (la fibronectine et le RGD cyclique).

Dans ce contexte, les composés à base de silane, qui sont bien connus pour former des monocouches stables sur des surfaces portant des hydroxyles, comme le dioxyde de silicium hydraté peuvent sembler plus attrayants. Les monocouches d'alkylsilane peuvent être préparées à partir de la solution, ou de la phase vapeur à partir de chloro ou alcoxy-silanes

mono ou trifonctionnels, des films denses pouvant être obtenus dans des conditions appropriées.

De plus, la post-modification chimique des monocouches de silane greffé permet d'obtenir une large gamme de fonctionnalités chimiques. Différentes méthodes sont possibles pour structurer les monocouches de silane. En raison de la sensibilité des silanes à l'humidité, les méthodes d'estampage n'ont pas été développées pour ces composés. En outre, l'estampage des silanes a généralement été limité à l'échelle du micron, sauf pour les rapports rares. De même, la nanolithographie (dip-pen) n'est que rarement utilisée pour les silanes, car elle repose sur la formation d'un ménisque d'eau entre l'extrémité et la surface pour transporter les molécules.

Par conséquent, la plupart des méthodes de structuration des monocouches de silane reposent sur la modification postérieure ou la dégradation locale d'une monocouche homogène préalablement formée, soit par écriture directe avec des faisceaux d'électrons, des faisceaux d'ions ou d'atomes et des sondes proximales, soit par exposition des monocouches aux UV ou X-ray à travers les masques appropriés. Des caractéristiques nanométriques ont parfois été rapportées, mais ces techniques souffrent généralement de la gamme limitée de fonctionnalités chimiques accessibles [339].

Contrastant avec ces méthodes précédentes, notre route pour construire des groupements chimiques d'ancrage sur silicium ou d'autres surfaces portant OH, comprend d'abord une approche utilisant la lithographie par faisceau d'électrons (lithographie électronique), pour définir des nano-structures dans un masque de polymère moulé sur le substrat, puis une silanisation en phase gazeuse du substrat à travers les nanostructures du masque.

Pour obtenir les substrats patternés, la lithographie électronique utilisée est décrite au-dessus dans la partie II.1.1.1 de ce chapitre. En résumé un film de PMMA/MA est irradié afin de créer des zones solubles (ce qui conduit à la création d'un masque), ensuite l'auto-assemblage de monocouche de silane est effectuée. Le masque est retiré via une extraction soxhlet. Ceci permet de libérer la surface de silane et ainsi greffer une seconde monocouche de silane, terminée par des groupements PEO, connus pour leur propriété antiadhésive (figure 70). La technique de la silanisation en phase gazeuse est décrite dans la partie II.1.1 du chapitre 2.

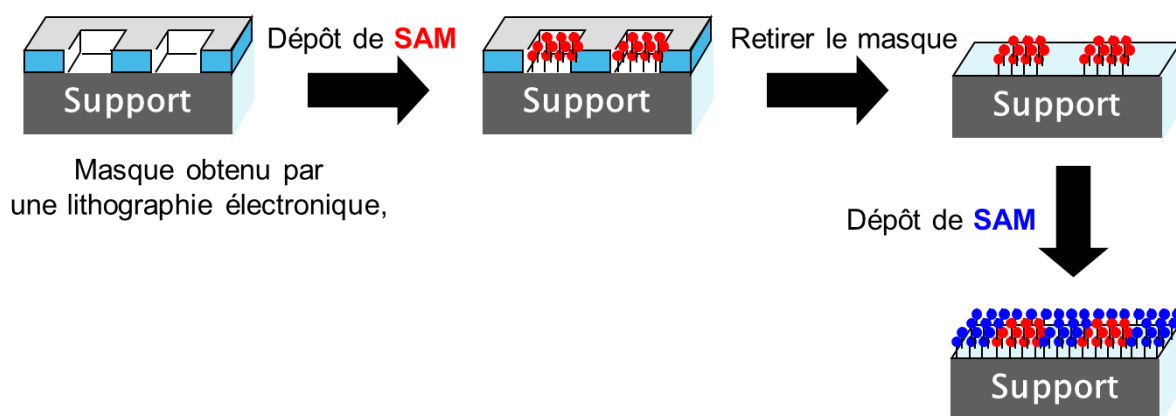


Figure 70: Une vue schématique du processus suivi pour obtenir les surfaces à motifs et silanisées.

Ensuite, ces surfaces sont greffées par des molécules naturelles (la fibronectine et le RGD cyclique) suivant les mêmes étapes décrites dans la partie II.1.1.4 du chapitre 2.

II.1.2- Préparation des surfaces homogènes naturelles

Les surfaces homogènes destinées à la culture bactérienne ont subi une silanisation en phase gazeuse (figure 71), puis greffées par la fibronectine et le RGD cyclique suivant le même protocole décrit dans la partie II.1.1 du chapitre 2.



Figure 71: Une vue schématique du processus suivi pour obtenir les surfaces homogènes silanisées.

II.2- culture bactérienne

II.2.1- Souche bactérienne

E. coli est une bactérie à Gram négative, en forme de bâtonnet. Elle est anaérobie facultative. Elle fait partie de la microflore intestinale microbienne et certaines souches sont à l'origine d'infections humaines. Notre étude est portée sur la souche bactérienne *E. coli* (E2146). La souche utilisée est fournie gracieusement par l'équipe du professeur Jean-Marc Ghigo de l'institut pasteur de Paris (Unité Génétique des Biofilms). C'est un modèle génétique modifié construit à partir de la souche *E. coli* K12 provenant de la collection ATTC MG 1655 (*E. coli* centre de stock génétique #6300). Elle est fluorescente grâce à l'expression du gène *gfpmut3* transfecté dans leur génome et qui leur permet d'exprimer la protéine GFP (Green fluorescent Protein). En outre, elles sont génétiquement programmées pour présenter une résistance

spécifique à certains antibiotiques : l'ampicilline, Kanamycine et le chloramphénicol pour cette souche (E2146). La souche (E2146) est caractérisée par la production exclusive de fimbrie de type 1. Elle ne possède de flagelle.

II.2.2- Préservation et culture : en général

E.coli E2146 est conservé à une température de -80°C dans un stock tampon composé de 920 µL de la culture bactérienne et de 390 µL de glycérol / eau (v/v : 50/50).

Le milieu nutritif est Luria-Bertani LB (Miller, Fluka) dont la composition est (g/l): tryptone 10, extrait de levure 5, NaCl 10.

Les milieux de culture à 25 g/l (LB) et 2,5 g/l (LB /10) sont préparés dans de l'eau désionisée (Millipore Corp., Milli-Q). Le pH des solutions: ~7.

La gélose LB est préparée avec 25 g/l de poudre LB et 15 g/l de gélose bactérienne ou directement avec 35 g/l de poudre de la gélose LB prête.

Les solutions sont agitées puis autoclavées à 121°C pendant 15 minutes.

Les antibiotiques sont nécessaires pour les stocks de travail et les sous-cultures (mais pas pour les cultures):

- Ampicilline (amp): solution mère dans l'éthanol à 50% à 100 mg/l, conservation à 20°C, utilisée à 100 µg/ml final.
- Kanamycin (Km) : solution mère dans l'eau à 25 mg/l, conservation à 4°C, utilisée à 50 µg/ml final.

Un stock de colonies bactériennes sur la gélose LB avec les antibiotiques amp et Km est ainsi préparé. Un glaçon est introduit dans 50 g de milieu LB stérile, puis la suspension bactérienne est déposée sur la gélose LB dans la boîte de Pétri. La boîte de Pétri est ensuite incubée à 37°C pendant 24 h, puis conservée à 4°C pendant une semaine.

La croissance est contrôlée par des mesures de densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) dans des semi-microcuvettes en polystyrène (usage unique, volume utile: 1 ml). La référence: le milieu dans lequel les bactéries vont étudier.

II.2.3- Elaboration du biofilm bactérien

Toutes les manipulations ont été réalisées en milieu stérile près d'une flamme de bec bunsen et l'ensemble du matériel utilisé fut autoclaver pendant 15 min à 121°C.

Pour la réalisation de la suspension bactérienne, le milieu nutritif utilisé est le LB de concentration massique 25 g/l. Deux types de cultures ont été préparés pour l'élaboration du biofilm : La première dite pré-culture, elle a été préparée en mélangeant 0,5 g de LB dans 20 ml d'eau Milli-Q, la seconde est le milieu de culture LB a été préparé en mélangeant 5 g de

LB avec 200 ml d'eau Milli-Q. Ainsi une préparation d'eau physiologique (0.9% NaCl : 1.8 g de NaCl dans 200 ml d'eau Milli-Q) et des blancs (références pour la mesure de DO) de LB et de l'eau physiologique est ainsi exigée.

Une colonie bactérienne est inoculée dans 20 mL de la pré-culture de LB stérile avec des antibiotiques (20 µL d'ampiciline à 100 mg/mL et 40 µL de Kanamycine à 25 mg/mL) dans un erlenmeyer de 100 mL. L'utilisation de ces antibiotiques est intéressante du fait que la souche utilisée présente une résistance spécifique à ces antibiotiques. La pré-culture est ensuite incubée dans un bain-marie pendant 16 h à 37°C +/- 1°C sous agitation (160 rpm).

Après 16 h de croissance, une quantité nécessaire de la pré-culture est ajoutée dans 200 mL de LB stérile dans un erlenmeyer de 500 ml afin d'obtenir une DO₆₀₀ initiale de 0,05 +/- 0,01. La culture est ensuite incubée à 37°C sous agitation (160 rpm) dans un bain-marie pendant environ 2 h. L'erlenmeyer contenant la culture bactérienne est enlevé du bain-marie lorsque le DO₆₀₀ atteint une valeur entre 0,5 et 0,6 (en général après environ 2 h de croissance). La culture est transférée alors dans un tube à centrifuger de 250 ml. Un autre tube de même masse est nécessaire. La culture est centrifugée pendant 10 minutes, à 5000 g et 4°C. Le surnageant est délicatement éliminé dans une poubelle, et le culot est remis en suspension et homogénéisé à l'aide 10 ml d'eau physiologique (0,9% de NaCl) en l'agitant très bien jusqu'au que la suspension bactérienne disparaisse sans former des agrégats. Ensuite le tout a été versé dans 200 ml d'eau physiologique et une nouvelle DO a été pris qui devrait être 0.5 +/- 0.02. L'eau physiologique est utilisée pour transférer les bactéries et le changement de milieu est important pour éviter aucune influence sur l'adhésion bactérienne. Cette suspension sera utilisée pour l'élaboration du biofilm.

L'étape suivante fut de mettre 2 ml de la dernière suspension sur nos surfaces de mica préparées et qui sont déjà placées dans des plaques à 6 puits. L'ensemble a été mis dans une étuve à 37°C pendant 3 h. Toutefois, et dans le cas où on est obligé à laisser les surfaces dans l'étuve plus de 3 h (par exemple une nuit complète) et pour éviter que les bactéries ne soient tuées, on doit ajouter aux surfaces (avant de mettre les 2 ml de suspension) 40 µL d'une solution du sucre (solution de glucose à 20%). Dans notre cas, on les laisse pour environ 24 h.

II.3- Coloration des bactéries : Marquage au backlight

LIVE/DEAD Back Light est une méthode développée par Molecular Probes qui permet de différencier et de dénombrer les cellules viables et mortes. Le principe est basé sur une double coloration par l'intermédiaire de deux fluorophores : Syto9 et l'iodure de propidium (PI). SYTO9 cible les acides nucléiques, mais il est capable de traverser la membrane

cellulaire des cellules mortes et vivantes [354]. Il colore donc, en vert, la totalité des cellules d'un échantillon. Le PI est un agent intercalant de l'ADN, une fois lié à ce dernier, le PI émet une fluorescence rouge (ou orange). Ce fluorochrome ne peut pénétrer dans les cellules que si les membranes sont altérées, donc seules les cellules mortes ou endommagées sont colorées en rouge (ou orange).

Toutes nos manipulations du marquage au backlight furent réalisées en conditions stériles sous une PSM (poste de sécurité microbiologique) en salle grise. L'humidité des surfaces de mica avant de mettre le marqueur est une condition importante pour éviter d'endommager les membranes des bactéries ainsi le travail doit être à l'abri puisque le backlight est un marqueur très sensible à la lumière. Avant le marquage des bactéries E.coli par 100 µL de backlight par surface humide, on effectue un double rinçage avec de l'eau Milli-Q autoclavée stérile puis avec du PBS stérile chacune pour 5 s. La durée du marquage est de l'ordre de 20 min. Ensuite les surfaces marquées ont été rincées avec de l'eau stérile (2 ml). L'étape qui a suivi, fut de bien sécher les surfaces, ensuite de les poser sur une lame de verre. Les photographies furent réalisées au microscope à épifluorescence (objectif*100).

II.4- Estimation du taux de recouvrement et de la taille des bactéries

Les taux de recouvrement et de la taille bactérienne furent déterminés par le logiciel Analy SIS. Les photographies des cultures bactérienne furent modifiées (luminosité et contraste) avec le programme Microsoft Office Picture Manager. Le pourcentage de recouvrement fut calculé en déterminant le pourcentage d'occupation de la photographie par les bactéries. Le pourcentage de recouvrement et la taille bactérienne pour chaque condition fut obtenu en calculant la moyenne des taux de recouvrement de 10 photographies, le même pour la taille. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne $\pm$ l'erreur standard à la moyenne.

III- Résultats et discussions

III.1- Caractérisation de surface

Avant de commencer la culture bactérienne et étudier l'impact des surfaces modifiées sur l'assemblage des bactéries E.coli, une caractérisation physico-chimique était nécessaire. Cette caractérisation était la même effectuée sur les surfaces utilisées pour l'étude de développement des CSMs issues de MO dont les résultats sont mentionnés dans la partie III.1 des résultats et discussions du chapitre 2.

Des mesure des angles de contact avec l'eau des surfaces de silicium silanisées et greffées avec la fibronectine ou le peptide RGD cyclique ont été effectuées, dans le but d'affirmer rapidement du succès de la modification de nos surfaces, de préciser le profil de polarité de l'échantillon et de vérifier l'hydrophilicité relative des surfaces. Par la technique XRR, nous avons déterminé que la silanisation en phase gazeuse pour le greffage d'une monocouche du 10 - (carboxyméthoxy) décyldiméthylchlorosilane a été mis en place. La technique XPS nous permet de confirmer la silanisation sur nos surfaces, et montrer le greffage de FN et de RGD cyclique sur les monocouches. L'AFM est utilisée pour examiner la morphologie, l'homogénéité et la topographie des surfaces.

III.2- Etude biologique

Le nombre de surfaces utilisables pour la culture bactérienne était limité.

III.2.1- Estimation du taux de recouvrement et de la taille des bactéries

Comme on a mentionné avant, l'estimation du taux de recouvrement et de la taille des bactéries ont été déterminés à l'aide du logiciel Analy SIS. Cette estimation a été effectuée sur les différentes surfaces après 24h de culture (adhésion bactérienne) dans l'étuve à 37°C (dernière étape de la culture bactérienne) en vue d'étudier l'influence de la modification des surfaces (chimique et topographique) sur l'assemblage des bactéries d'E.coli.

Les bactéries adhérentes sur les surfaces de mica greffées avec la FN soit homogènes ou patternées sont celles qui donnent le meilleur résultat avec un pourcentage moyen de recouvrement de $64,01 \% \pm 12 \%$ pour les surfaces patternées supérieur à celui des surfaces homogènes qui est de $57,63 \% \pm 6 \%$. En ce qui concerne les surfaces greffées avec le RGD cyclique, elles ne dépassent pas 50 % de recouvrement. Elles présentent un pourcentage de recouvrement égale à $38,34 \% \pm 10 \%$ pour les surfaces patternées ainsi supérieur à celui des surfaces homogènes qui est de $26,00 \% \pm 16 \%$.

Ainsi, ce taux de recouvrement sur les surfaces patternées greffées avec la FN ($64,01 \% \pm 12\%$) est plus grand que celui des surfaces patternées greffées avec le RGD cyclique ($38,34 \% \pm 10 \%$). De même, il est sur les surfaces homogènes greffées avec la FN ($57,63 \% \pm 6 \%$) supérieur à celui des surfaces homogènes greffées avec le RGD cyclique ($26,00 \% \pm 16 \%$) (Figure 72).

De plus, toutes ces surfaces modifiées présentent un taux de recouvrement supérieur aux contrôles (mica vierge) qui présentent un taux de recouvrement beaucoup trop faible ($3,35 \% \pm 2 \%$).

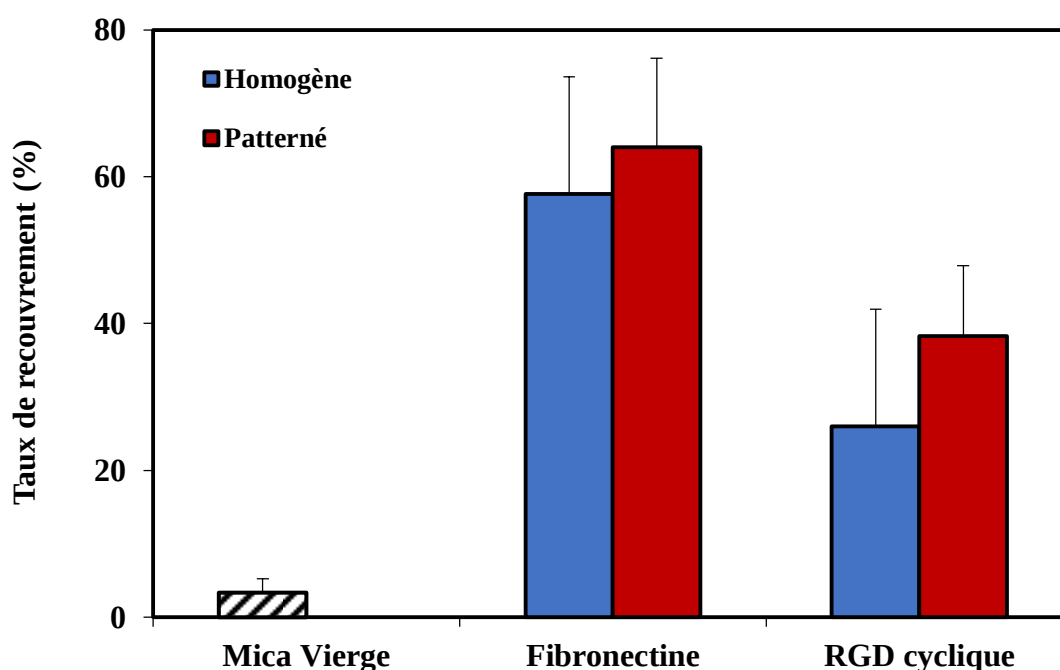


Figure 72: Taux de recouvrement des bactéries E.coli après 24h d'adhésion bactérienne sur des surfaces de mica vierge et des surfaces de mica modifiées.

Relativement à la taille bactérienne, les surfaces de mica vierges présentent une taille plus petite ($1.86 \pm 0.24 \mu\text{m}$) en comparaison à celles des surfaces traitées que ce soit des surfaces homogènes ou patternées greffées avec la FN ou le peptide RGD cyclique.

Les bactéries adhérentes sur des surfaces patternées greffées de FN ($3.21 \pm 0.40 \mu\text{m}$) ou de RGD cyclique ($2.66 \pm 0.34 \mu\text{m}$), présentent une taille plus grande en comparaison respective à celles sur des surfaces homogènes ($2.66 \pm 0.18 \mu\text{m}$ pour la FN et $2.11 \pm 0.38 \mu\text{m}$ pour le RGD cyclique), en notant que sur le même type de surface (patternée ou homogène), la FN donne le meilleur résultat par rapport au RGD cyclique (figure73).

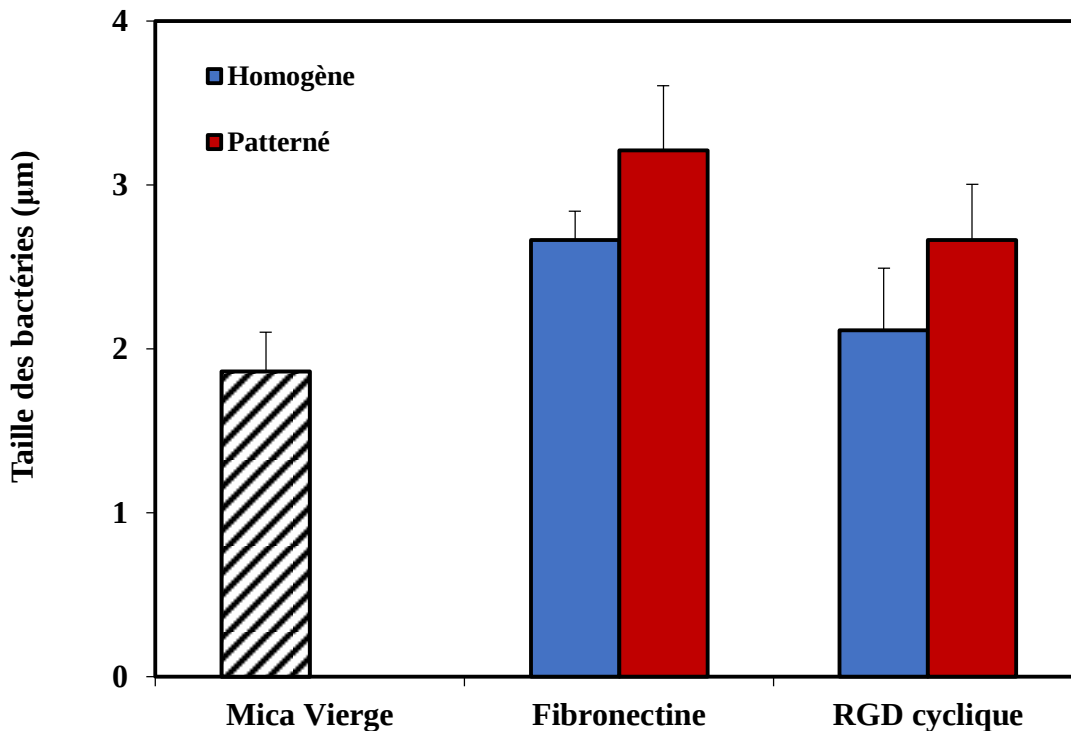


Figure 73: Taille des bactéries E.coli après 24h d'adhésion bactérienne sur des surfaces de mica vierge et des surfaces de mica modifiées.

III.2.2- Comparaison morphologique

En raison de déterminer l'influence des traitements de surface sur la morphologie bactérienne (forme, taille,...) et l'adhésion des bactéries, les phénotypes des bactéries E. coli cultivées en condition contrôle, sur des surfaces de mica vierges et sur les surfaces de mica traitées (homogènes ou patternées silanisées greffées par la FN ou RGD cyclique) ont été comparés.

La plupart de nos bactéries présentent une membrane perméable altérée, d'où leur coloration orangée. Cependant, E. coli est une bactérie autofluorescente grâce à l'expression du gène *gfpmut3* transféré dans leur génome et qui leur permet d'exprimer la protéine GFP. Selon le type de surface, la taille, la forme et le taux d'adhésion de la bactérie diffèrent.

Les bactéries E.coli cultivées sur les surfaces de mica vierges (figure 74 A) et sur les autres surfaces aux différents traitements présentent une morphologie bâtonnet. Les E.coli cultivées sur les surfaces de mica vierges recouvrent faiblement ces surfaces par rapport aux surfaces modifiées soit aux surfaces homogènes silanisées et greffées avec le peptide RGD cyclique (figure 74 B) ou la FN (figure 74 D) ou soit aux surfaces ayant subi une lithographie électronique et silanisées greffées avec le peptide RGD cyclique (figure 74 C) ou la FN (figure 74 E).

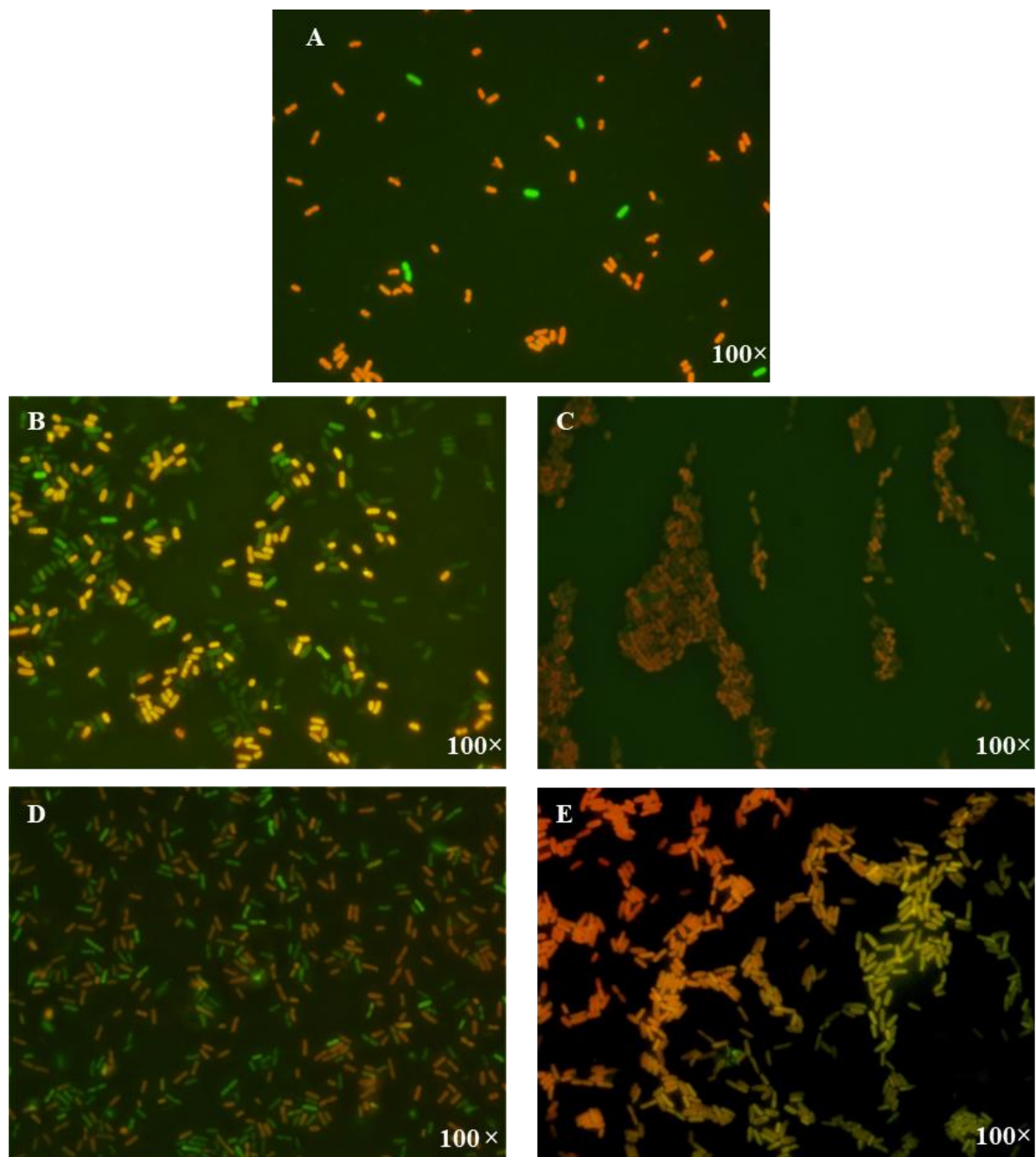


Figure 74: Comparaison morphologique des E.coli cultivées sur les surfaces aux différents traitements.
 (A) mica vierge, (B) mica homogène silanisée greffée avec le RGD cyclique, (C) mica patternée silanisée greffée avec le RGD cyclique, (D) mica homogène silanisée greffée avec la fibronectine, (E) mica patternée silanisée greffée avec la fibronectine.

Ces bactéries prennent davantage de recouvrement sur les surfaces patternées que sur celles homogènes et notamment pour celles greffées avec la fibronectine. Les bactéries E.coli s'assemblent suivant des lignes parallèles sur les surfaces lithographiées greffées avec le RGD cyclique (figure 75 A) ou la FN (figure 75 B), avec un taux de recouvrement plus grand pour les dernières.

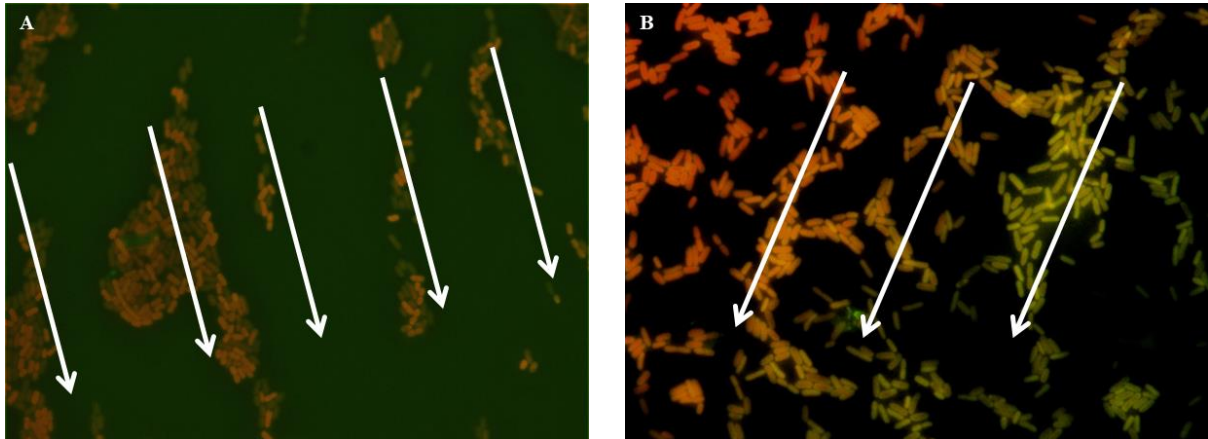


Figure 75: Comparaison morphologique et l'alignement parallèle des E.coli cultivées sur les surfaces ayant modifiées par lithographie électronique greffées par le RGD cyclique (A) ou la fibronectine (B).

III.3- Discussions et perspectives

Le phénotype bâtonnet, connu pour les souches *E. coli*, se retrouve sur les bactéries *E. coli* cultivées sur les surfaces de mica vierge ainsi que sur les surfaces de mica traitées.

En condition *in vitro*, la souche d'*E. coli* 2146 adhère à l'ensemble des surfaces avec lesquelles elle a été mise en contact. La prolifération relativement réduite des bactéries sur le mica vierge peut s'expliquer par des conditions moins propices à l'adhésion. Cette surface non traitée n'offre pas un environnement parfaitement agréable aux bactéries.

Les bactéries se trouvant sur des surfaces modifiées quant à elles présentent une meilleure adhésion. Les bactéries sur la fibronectine semblent avoir mieux proliférées que dans toutes autres conditions, en particulier sur la surface patternée. De plus, leurs tailles apparaissent plus grandes, démontrant ainsi l'efficacité du traitement avec cette protéine. Les surfaces greffées avec le RGD cyclique présentent une moins bonne prolifération, ce qui suggère une affinité inférieure des bactéries pour ce peptide. En outre, il est toutefois important de signaler la différence de nature de la surface. Ainsi, les surfaces homogènes dénotent une adhérence moins satisfaisante par rapport aux surfaces patternées. Cependant la taille bactérienne rentre dans la moyenne dans l'ensemble des surfaces bien qu'elle paraît plus grande sur certaines que sur d'autres. De plus une influence de la micro-structuration sur la concentration des bactéries sur la surface a été remarqué et semble avoir un avantage majeur où il est à remarquer que lorsque les bactéries sont confinées sur des surfaces plus petites (patternées), elles ont tendance à plus se regrouper ce qui peut encourager, dans des conditions de contact plus longues, à de meilleures chance de fabrication de biofilms et d'envisager de pouvoir les obtenir plus rapidement. Ce qui nous permet de dire qu'un effet de confinement a été mis en évidence pour les surfaces modifiées topographiquement. Ces résultats peuvent être directement liés à la nature et les propriétés de surface mécaniques, physico-chimiques et topographiques ayant une influence sur la colonisation bactérienne de la surface comme l'ont mentionné dans plusieurs études [314].

L'étude des surfaces de mica modifiées apporte des renseignements essentiels sur le comportement des bactéries et sur leur morphologie principalement sur leurs tailles. Le traitement avec la fibronectine semble être de loin le plus efficace dont nous disposons dans notre étude. Des recherches plus poussées de l'adhésion bactérienne sur ce type de surface doit être sérieusement considérées afin de pouvoir confirmer ou infirmer la capacité de produire de meilleurs résultats.

IV- Conclusion et perspective

La bibliographie a montré l'existence d'une relation entre les propriétés de surface et la colonisation par les bactéries. A travers ce travail et pour une surface donnée, nous avons pu montrer que l'adhésion bactérienne va varier non seulement en fonction de la nature chimique du groupement fonctionnel à la surface, mais aussi de la géométrie de la surface. Cette étude préliminaire commencée dans le cadre de ce travail avait donc pour objectif de mettre en évidence l'influence de la chimie et de la micro-structuration de surfaces. Ce que nous avons pu démontrer en mettant en évidence la meilleure croissance d'E.coli sur les surfaces greffées avec la fibronectine dans un premier temps. Et dans un second temps, lorsque les groupements sont uniquement greffés sur une micro-surface, les bactéries se regroupent toutes sur ces micro-surfaces. Cela ouvre de nouvelles perspectives quant à l'étude de l'assemblage des bactéries.

Par ailleurs, et comme il y a des études qui montrent l'effet de la chimie de la surface sur le comportement des bactéries et notamment sur l'adhésion bactérienne tels que la charge de la surface [302, 323–326] et la variation de ratio et de taux de réticulation des polyélectrolytes [320], ce qui ouvre la perspective d'étudier l'effet de modification de surface par la méthode de multicouches de polyélectrolytes sur ces souches bactériennes comme celle utilisée avec les cellules souches mésenchymateuses dans le chapitre 2.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Dans cette thèse, l'objectif initial était de développer des surfaces fonctionnelles, de mettre en évidence les paramètres chimiques, géométriques et biologiques de la surface puis d'étudier l'influence de ces paramètres sur le comportement des cellules souches (mésenchymateuses) et des bactéries (*E.coli*). Rappelons que la stratégie générale de ce travail repose sur :

- Le développement des surfaces homogènes et bifonctionnelles naturelles basées sur le greffage covalent des molécules naturelles (fibronectine, RGD cyclique).
- Le développement des surfaces homogènes artificielles basées sur l'assemblage électrostatique des polyélectrolytes (chit/PAA et chit/PSS).
- Le contrôle du comportement cellulaire et des bactéries.

Notre objectif de contrôler et étudier l'impact des surfaces modifiées sur le devenir des CSMs est atteint grâce au développement des procédés de fonctionnalisation chimique de surfaces homogènes conférant à nos surfaces un aspect chimique : surfaces à chimie contrôlée. Ces procédés consistent en premier temps au greffage des molécules naturelles à des surfaces traitées chimiquement par une silanisation en phase gazeuse, et au dépôt des molécules artificielles tels que des polyélectrolytes. La caractérisation physico-chimique par mesure des angles de contact de ces surfaces a montré que nos surfaces sont suffisamment hydrophiles pour permettre l'adhésion cellulaire, les résultats de XRR ont montré qu'on a réussi à greffer une monocouche de silane par silanisation en phase gazeuse alors que ceux de XPS ont confirmé la silanisation sur nos surfaces et le greffage de la FN et le RGD cyclique sur les monocouches de silane. Les résultats d'AFM nous permettent de distinguer la nouvelle morphologie homogène de la surface après traitement, une organisation protéique parallèle remarquable des FN est observée sur nos surfaces. Une comparaison entre les surfaces naturelles et artificielles a été ensuite menée après l'ensemencement des CSMs, elle a prouvé la cytocompatibilité de nos surfaces permettant la croissance des CSMs mais ne permettent pas leur différenciation avec un taux de confluence élevée pour les surfaces traitées avec la FN.

Dans l'étude de l'impact de la modification de surface sur le comportement de la souche *E.coli*, nous nous intéresserons à des différents procédés de fonctionnalisation de surface, la silanisation en phase gazeuse combinée aux techniques de structuration de surface (lithographie électronique) pour développer de nouvelles surfaces bifonctionnelles qui nous permettent de mettre en évidence l'impact de la surface de culture sur l'adhésion et la colonisation des bactéries. Ces procédés de fonctionnalisation donnent un nouvel aspect à nos

surfaces : surfaces à chimie et géométrie contrôlées. Nos résultats suggèrent que l'adhésion des E.coli est affectée non seulement par la chimie de la surface (surfaces homogènes silanisées greffées par la FN et le RGD cyclique) mais aussi par la géométrie de la surface (surfaces patternées silanisées greffées par la FN et le RGD cyclique). Ainsi il a été démontré que les surfaces greffées avec la fibronectine présentent les milieux les plus favorables pour la croissance et la taille d'E.coli. En plus il a été montré qu'un effet de confinement a été observé sur les surfaces patternées, la micro-structuration présente une influence sur la concentration des bactéries sur la surface.

Pour conclure, notre étude a permis de développer des procédés de fonctionnalisation chimiques, géométriques et biologiques. Ces procédés participent au changement de propriétés de la surface et ont été développés afin d'aller plus loin dans la compréhension des relations existantes entre la surface du support et le comportement des systèmes vivants (cellules souches, bactéries) et quelle que soit la méthode de fonctionnalisation, elle a amené à améliorer les propriétés de surface permettant soit la croissance des CSMs, soit l'adhésion et la colonisation des bactéries E.coli, même si les pourcentages sont différents entre un procédé et un autre. Ceci permet de créer des nouveaux champs scientifiques et d'élargir le nouveau technologique et les interactions entre les différents domaines : la biologie, la chimie, la physique, l'ingénierie dans le but de participation aux enjeux de la médecine régénérative.

Ce travail ouvre plusieurs pistes et perspectives d'études :

- Ce travail nous a permis de montrer la croissance des CSMs sur des surfaces homogènes. Il serait judicieux de transposer les études effectuées sur les surfaces planes aux surfaces patternées, et de relier les différents processus mis en jeu au rôle du support de culture dans le comportement de ce type de cellules.
- Il serait intéressant d'utiliser des types de cellules souches autres que les CSMs issues de la moelle osseuse utilisées dans ce travail, pour savoir si les cellules souches d'autres origines gardent les mêmes comportements vis-à-vis de la fonctionnalisation des surfaces.
- Il serait important d'étudier l'impact d'autres types de modifications de surfaces (autres que ceux utilisés dans notre travail) sur le comportement d'E.coli, et de transposer cette étude sur l'E.coli (bactérie pathogène) sur des bactéries non pathogènes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] M. C. Chiti, M. M. Dolmans, J. Donnez, et C. A. Amorim, « Fibrin in Reproductive Tissue Engineering: A Review on Its Application as a Biomaterial for Fertility Preservation », *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 45, n° 7, p. 1650-1663, juill. 2017.
- [2] M. Mousa, N. D. Evans, R. O. C. Oreffo, et J. I. Dawson, « Clay nanoparticles for regenerative medicine and biomaterial design: A review of clay bioactivity », *Biomaterials*, vol. 159, p. 204-214, mars 2018.
- [3] M. T. Calejo, T. Ilmarinen, H. Skottman, et M. Kellomäki, « Breath figures in tissue engineering and drug delivery: State-of-the-art and future perspectives », *Acta Biomater.*, vol. 66, p. 44-66, janv. 2018.
- [4] H. W. Ooi, S. Hafeez, C. A. van Blitterswijk, L. Moroni, et M. B. Baker, « Hydrogels that listen to cells: a review of cell-responsive strategies in biomaterial design for tissue regeneration », *Mater Horiz*, vol. 4, n° 6, p. 1020-1040, 2017.
- [5] C. Merceron, C. Vinatier, J. Clouet, S. Collic-Jouault, P. Weiss, et J. Guicheux, « Cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux et biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire du cartilage », *Rev. Rhum.*, vol. 75, n° 10-11, p. 942-944, nov. 2008.
- [6] J.-M. Dubernard *et al.*, « Outcomes 18 Months after the First Human Partial Face Transplantation », *N. Engl. J. Med.*, vol. 357, n° 24, p. 2451-2460, déc. 2007.
- [7] L. Lantieri *et al.*, « Repair of the lower and middle parts of the face by composite tissue allotransplantation in a patient with massive plexiform neurofibroma: a 1-year follow-up study », *The Lancet*, vol. 372, n° 9639, p. 639-645, août 2008.
- [8] S. Gaujoux, J. Larghero, et P. Cattani, « L'ingénierie tissulaire, bientôt une solution au remplacement d'organe ? », *J. Chir. (Paris)*, vol. 146, n° 2, p. 109-111, avr. 2009.
- [9] T. Poghosyan, S. Gaujoux, R. Sfeir, J. Larghero, et P. Cattani, « Bioartificial Oesophagus in the Era of Tissue Engineering », *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 52, p. S16-S17, mai 2011.
- [10] R. Langer et J. Vacanti, « Tissue engineering », *Science*, vol. 260, n° 5110, p. 920-926, mai 1993.
- [11] T. Poghosyan *et al.*, « L'ingénierie tissulaire de l'œsophage : états des lieux et perspectives », *J. Chir. Viscérale*, vol. 153, n° 1, p. 21-30, févr. 2016.
- [12] Center for Health Engineering (CIS), Mines Saint-Etienne, « Développement de procédés additifs pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse », 30-mars-2016.

- [13] A. Erices, P. Conget, et J. J. Minguell, « Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood », *Br. J. Haematol.*, vol. 109, n° 1, p. 235-242, avr. 2000.
- [14] L. Galois, A.-M. Freyria, D. Herbage, et D. Mainard, « Ingénierie tissulaire du cartilage : état des lieux et perspectives », *Pathol. Biol.*, vol. 53, n° 10, p. 590-598, déc. 2005.
- [15] P. Hardouin, K. Anselme, B. Flautre, F. Bianchi, G. Bascoulergue, et B. Bouxin, « Ingénierie tissulaire et maladies du squelette », *Rev. Rhum.*, vol. 67, n° 7, p. 498-504, sept. 2000.
- [16] A. Atala, S. B. Bauer, S. Soker, J. J. Yoo, et A. B. Retik, « Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty », *The Lancet*, vol. 367, n° 9518, p. 1241-1246, avr. 2006.
- [17] P. Macchiarini *et al.*, « Clinical transplantation of a tissue-engineered airway », *The Lancet*, vol. 372, n° 9655, p. 2023-2030, déc. 2008.
- [18] J. P. Vacanti et R. Langer, « Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation », *The Lancet*, vol. 354, p. S32-S34, juill. 1999.
- [19] E. Lavik et R. Langer, « Tissue engineering: current state and perspectives », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 65, n° 1, juill. 2004.
- [20] R. N. B. Bhandari *et al.*, « Liver Tissue Engineering: A Role for Co-culture Systems in Modifying Hepatocyte Function and Viability », *Tissue Eng.*, vol. 7, n° 3, p. 345-357, juin 2001.
- [21] S. MacNeil, « Progress and opportunities for tissue-engineered skin », *Nature*, vol. 445, n° 7130, p. 874-880, févr. 2007.
- [22] A. C. MacIntosh, V. R. Kearns, A. Crawford, et P. V. Hatton, « Skeletal tissue engineering using silk biomaterials », *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 2, n° 2-3, p. 71-80, mars 2008.
- [23] X. Hu, W. Lui, L. Cui, M. Wang, et Y. Cao, « Tissue Engineering of Nearly Transparent Corneal Stroma », *Tissue Eng.*, vol. 11, n° 11-12, p. 1710-1717, nov. 2005.
- [24] S. Rimmer *et al.*, « Epithelialization of hydrogels achieved by amine functionalization and co-culture with stromal cells », *Biomaterials*, vol. 28, n° 35, p. 5319-5331, déc. 2007.
- [25] T. Matikainen et J. Laine, « Placenta—an alternative source of stem cells », *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 207, n° 2, p. 544-549, sept. 2005.
- [26] Y. Miyahara *et al.*, « Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction », *Nat. Med.*, vol. 12, n° 4, p. 459-465, avr. 2006.

- [27] D. Dallari, « Enhanced Tibial Osteotomy Healing with Use of Bone Grafts Supplemented with Platelet Gel or Platelet Gel and Bone Marrow Stromal Cells », *J. Bone Jt. Surg. Am.*, vol. 89, n° 11, p. 2413, nov. 2007.
- [28] A. Nieponice *et al.*, « Patch Esophagoplasty: Esophageal Reconstruction Using Biologic Scaffolds », *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 97, n° 1, p. 283-288, janv. 2014.
- [29] J. Huxley-Jones, S. M. Foord, et M. R. Barnes, « Drug discovery in the extracellular matrix », *Drug Discov. Today*, vol. 13, n° 15-16, p. 685-694, août 2008.
- [30] J. Labat-Robert et L. Robert, « Introduction: matrix biology in the 21st century. From a static-rheological role to a dynamic-signaling function », *Pathol. Biol.*, vol. 53, n° 7, p. 369-371, sept. 2005.
- [31] C. de Jaeger et P. Cherin, « Matrice extracellulaire, physiologie et vieillissement vasculaire », *Médecine Longévité*, vol. 4, n° 1, p. 41-53, mars 2012.
- [32] B. C. Isenberg et J. Y. Wong, « Building structure into engineered tissues », *Mater. Today*, vol. 9, n° 12, p. 54-60, déc. 2006.
- [33] F. Ramirez, L. Y. Sakai, H. C. Dietz, et D. B. Rifkin, « Fibrillin microfibrils: multipurpose extracellular networks in organismal physiology », *Physiol. Genomics*, vol. 19, n° 2, p. 151-154, oct. 2004.
- [34] A. Bailey, « Molecular mechanisms of ageing in connective tissues », *Mech. Ageing Dev.*, vol. 122, n° 7, p. 735-755, mai 2001.
- [35] S. P. Sugrue, « Response of basal epithelial cell surface and Cytoskeleton to solubilized extracellular matrix molecules », *J. Cell Biol.*, vol. 91, n° 1, p. 45-54, oct. 1981.
- [36] J. Labat-Robert, M. Bihari-Varga, et L. Robert, « Extracellular matrix », *FEBS Lett.*, vol. 268, n° 2, p. 386-393, août 1990.
- [37] A. Naba, S. Hoersch, et R. O. Hynes, « Towards definition of an ECM parts list: An advance on GO categories », *Matrix Biol.*, vol. 31, n° 7-8, p. 371-372, sept. 2012.
- [38] S. Ricard-Blum, « The Collagen Family », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, n° 1, p. a004978-a004978, janv. 2011.
- [39] « Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 22.3, Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix. », .
- [40] R. S. Jope et G. V. . Johnson, « The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3 », *Trends Biochem. Sci.*, vol. 29, n° 2, p. 95-102, févr. 2004.
- [41] G. V. Rayasam, V. K. Tulasi, R. Sodhi, J. A. Davis, et A. Ray, « Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake: GSK3: a therapeutic target for diabetes », *Br. J. Pharmacol.*, vol. 156, n° 6, p. 885-898, mars 2009.

- [42] K. R. Levental *et al.*, « Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling », *Cell*, vol. 139, n° 5, p. 891-906, nov. 2009.
- [43] « Goldman, L., & Ausiello, D. A. (Eds.). (2008). Cecil medicine (Vol. 702). Philadelphia^ ePA PA: Saunders Elsevier. », .
- [44] V. Stambolic et J. R. Woodgett, « Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 β in intact cells via serine 9 phosphorylation », *Biochem. J.*, vol. 303, n° 3, p. 701-704, nov. 1994.
- [45] L. M. Shaw et B. R. Olsen, « FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices », *Trends Biochem. Sci.*, vol. 16, p. 191-194, janv. 1991.
- [46] A. K. Baldwin, A. Simpson, R. Steer, S. A. Cain, et C. M. Kielty, « Elastic fibres in health and disease », *Expert Rev. Mol. Med.*, vol. 15, janv. 2013.
- [47] D. Y. Li *et al.*, « Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis », *Nature*, vol. 393, n° 6682, p. 276-280, mai 1998.
- [48] « Bascetin, R. (2014). Etude de l'auto-assemblage de la fibronectine plasmatique humaine: mécanismes et réponses cellulaires (Doctoral dissertation, Université de Cergy Pontoise). »
- [49] R. V. Iozzo, « MATRIX PROTEOGLYCANS: From Molecular Design to Cellular Function », *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 67, n° 1, p. 609-652, juin 1998.
- [50] N. S. Gandhi et R. L. Mancera, « The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins », *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 72, n° 6, p. 455-482, déc. 2008.
- [51] S.-H. Kim, J. Turnbull, et S. Guimond, « Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor », *J. Endocrinol.*, vol. 209, n° 2, p. 139-151, mai 2011.
- [52] R. O. Hynes et A. Naba, « Overview of the Matrisome--An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, n° 1, p. a004903-a004903, janv. 2012.
- [53] R.-Q. Qian et R. W. Glanville, « Alignment of Fibrillin Molecules in Elastic Microfibrils Is Defined by Transglutaminase-Derived Cross-Links », *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 36, n° 50, p. 15841-15847, déc. 1997.
- [54] M. Bignon *et al.*, « Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane », *Blood*, vol. 118, n° 14, p. 3979-3989, oct. 2011.
- [55] « 1st MBE (Matrix Biology Europe) conference », Rotterdam, The Netherlands, 2014.

- [56] R. Zent et A. Pozzi, Éd., *Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer*. New York, NY: Springer New York, 2010.
- [57] I. D. Campbell et M. J. Humphries, « Integrin Structure, Activation, and Interactions », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, n° 3, p. a004994-a004994, mars 2011.
- [58] M. Leiss, K. Beckmann, A. Girós, M. Costell, et R. Fässler, « The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 20, n° 5, p. 502-507, oct. 2008.
- [59] R. O. Hynes, « Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines », *Cell*, vol. 110, n° 6, p. 673-687, sept. 2002.
- [60] N. M. Alves, I. Pashkuleva, R. L. Reis, et J. F. Mano, « Controlling Cell Behavior Through the Design of Polymer Surfaces », *Small*, vol. 6, n° 20, p. 2208-2220, oct. 2010.
- [61] R. Zaidel-Bar, S. Itzkovitz, A. Ma'ayan, R. Iyengar, et B. Geiger, « Functional atlas of the integrin adhesome », *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, n° 8, p. 858-867, août 2007.
- [62] B. Geiger, A. Bershadsky, R. Pankov, et K. M. Yamada, « Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 2, n° 11, p. 793-805, nov. 2001.
- [63] M. J. P. Biggs et M. J. Dalby, « Focal adhesions in osteoneogenesis », *Proc. Inst. Mech. Eng. [H]*, vol. 224, n° 12, p. 1441-1453, déc. 2010.
- [64] T. Geiger et R. Zaidel-Bar, « Opening the floodgates: proteomics and the integrin adhesome », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 24, n° 5, p. 562-568, oct. 2012.
- [65] T. N. Wight, « Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 14, n° 5, p. 617-623, oct. 2002.
- [66] R. Pankov, « Fibronectin at a glance », *J. Cell Sci.*, vol. 115, n° 20, p. 3861-3863, oct. 2002.
- [67] E. A. M. Verderio, T. Johnson, et M. Griffin, « Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing: Review article », *Amino Acids*, vol. 26, n° 4, juill. 2004.
- [68] A. Rey, « Les cellules souches sont-elles bien nommées ? », *médecine/sciences*, vol. 19, n° 6-7, p. 645-645, juin 2003.
- [69] « Margossian, T. (2013). Caractérisation des Cellules Souches Mésoenchymateuses du sang placentaire et de la gelée de Wharton (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat d'université. Univesité de Lorraine, 2013. »

- [70] C. Martinaud *et al.*, « Les cellules souches mésenchymateuses : des cellules pour la médecine régénérative du futur ? », *Rev. Francoph. Lab.*, vol. 2010, n° 427, p. 47-59, déc. 2010.
- [71] M. Owen, « Marrow stromal stem cells », *J. Cell Sci.*, vol. 1988, n° Supplement 10, p. 63-76, févr. 1988.
- [72] A. I. Caplan, « Mesenchymal stem cells », *J. Orthop. Res.*, vol. 9, n° 5, p. 641-650, sept. 1991.
- [73] M. Dominici *et al.*, « Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement », *Cytotherapy*, vol. 8, n° 4, p. 315-317, 2006.
- [74] « Roubéix, C. (2014). Intérêt des cellules souches mésenchymateuses dans la thérapie du glaucome (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI) ».
- [75] M. Krampera, J. Galipeau, Y. Shi, K. Tarte, et L. Sensebe, « Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells—The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal », *Cytotherapy*, vol. 15, n° 9, p. 1054-1061, sept. 2013.
- [76] L. da Silva Meirelles, « Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues », *J. Cell Sci.*, vol. 119, n° 11, p. 2204-2213, mai 2006.
- [77] D. T. Covas *et al.*, « Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts », *Exp. Hematol.*, vol. 36, n° 5, p. 642-654, mai 2008.
- [78] S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, et K. Bieback, « Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue », *Stem Cells*, vol. 24, n° 5, p. 1294-1301, mai 2006.
- [79] « Yu, H. (2017). Évaluation des caractéristiques des hydrogels d'alginate supplémentés en acide hyaluronique ou en hydroxyapatite lors de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton (Doctoral dissertation, Université de Lorraine) ».
- [80] M. F. Pittenger, « Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells », *Science*, vol. 284, n° 5411, p. 143-147, avr. 1999.
- [81] H. Yoshimura, T. Muneta, A. Nimura, A. Yokoyama, H. Koga, et I. Sekiya, « Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle », *Cell Tissue Res.*, vol. 327, n° 3, p. 449-462, févr. 2007.

- [82] B. A. Bunnell, B. T. Estes, F. Guilak, et J. M. Gimble, « Differentiation of Adipose Stem Cells », in *Adipose Tissue Protocols*, vol. 456, K. Yang, Éd. Totowa, NJ: Humana Press, 2008, p. 155-171.
- [83] W. J. F. M. Jurgens *et al.*, « Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies », *Cell Tissue Res.*, vol. 332, n° 3, p. 415-426, juin 2008.
- [84] C. Y. Tay, P. Sathiyathan, S. W. L. Chu, L. W. Stanton, et T. T. Wong, « Identification and Characterization of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Trabecular Meshwork of the Human Eye », *Stem Cells Dev.*, vol. 21, n° 9, p. 1381-1390, juin 2012.
- [85] L. J. Bray, C. F. Heazlewood, D. J. Munster, D. W. Hutmacher, K. Atkinson, et D. G. Harkin, « Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cell cultures derived from the limbus of human and rabbit corneas », *Cytotherapy*, vol. 16, n° 1, p. 64-73, janv. 2014.
- [86] F. Rossignoli *et al.*, « Isolation, Characterization, and Transduction of Endometrial Decidual Tissue Multipotent Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Menstrual Blood », *BioMed Res. Int.*, vol. 2013, p. 1-14, 2013.
- [87] O. G. Davies, P. R. Cooper, R. M. Shelton, A. J. Smith, et B. A. Scheven, « A comparison of the in vitro mineralisation and dentinogenic potential of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, bone marrow and dental pulp », *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 33, n° 4, p. 371-382, juill. 2015.
- [88] M. Crisan *et al.*, « A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs », *Cell Stem Cell*, vol. 3, n° 3, p. 301-313, sept. 2008.
- [89] R. Liao, O. Pfister, M. Jain, et F. Mouquet, « The Bone Marrow—Cardiac Axis of Myocardial Regeneration », *Prog. Cardiovasc. Dis.*, vol. 50, n° 1, p. 18-30, juill. 2007.
- [90] T. Asahara, C. Kalka, et J. M. Isner, « Stem cell therapy and gene transfer for regeneration », *Gene Ther.*, vol. 7, p. 451-457, avr. 2000.
- [91] E. L. Herzog, « Plasticity of marrow-derived stem cells », *Blood*, vol. 102, n° 10, p. 3483-3493, juill. 2003.
- [92] F. Ulloa-Montoya, C. M. Verfaillie, et W.-S. Hu, « Culture systems for pluripotent stem cells », *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 100, n° 1, p. 12-27, juill. 2005.
- [93] L. Li et T. Xie, « STEM CELL NICHE: Structure and Function », *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 21, n° 1, p. 605-631, nov. 2005.
- [94] D. L. Jones et A. J. Wagers, « No place like home: anatomy and function of the stem cell niche », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, n° 1, p. 11-21, janv. 2008.

- [95] Y. Katayama *et al.*, « Signals from the Sympathetic Nervous System Regulate Hematopoietic Stem Cell Egress from Bone Marrow », *Cell*, vol. 124, n° 2, p. 407-421, janv. 2006.
- [96] U. Nekanti, V. B. Rao, A. G. Bahirvani, M. Jan, S. Totey, et M. Ta, « Long-Term Expansion and Pluripotent Marker Array Analysis of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells », *Stem Cells Dev.*, vol. 19, n° 1, p. 117-130, janv. 2010.
- [97] S. Méndez-Ferrer *et al.*, « Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche », *Nature*, vol. 466, n° 7308, p. 829-834, août 2010.
- [98] C. Shi et E. G. Pamer, « Monocyte recruitment during infection and inflammation », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, n° 11, p. 762-774, nov. 2011.
- [99] C. M. Schürch, C. Riether, et A. F. Ochsenbein, « Cytotoxic CD8⁺ T Cells Stimulate Hematopoietic Progenitors by Promoting Cytokine Release from Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells », *Cell Stem Cell*, vol. 14, n° 4, p. 460-472, avr. 2014.
- [100] C. Shi *et al.*, « Bone Marrow Mesenchymal Stem and Progenitor Cells Induce Monocyte Emigration in Response to Circulating Toll-like Receptor Ligands », *Immunity*, vol. 34, n° 4, p. 590-601, avr. 2011.
- [101] A.-M. Rodriguez *et al.*, « Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse », *J. Exp. Med.*, vol. 201, n° 9, p. 1397-1405, mai 2005.
- [102] L. Song et R. S. Tuan, « Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow », *FASEB J.*, vol. 18, n° 9, p. 980-982, juin 2004.
- [103] K. Mareschi *et al.*, « Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: evidence for expression of neural markers and eag K⁺ channel types », *Exp. Hematol.*, vol. 34, n° 11, p. 1563-1572, nov. 2006.
- [104] M. L. M. Khoo, B. Shen, H. Tao, et D. D. F. Ma, « Long-Term Serial Passage and Neuronal Differentiation Capability of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells », *Stem Cells Dev.*, vol. 17, n° 5, p. 883-896, oct. 2008.
- [105] P. Antonitsis, E. Ioannidou-Papagiannaki, A. Kaidoglou, et C. Papakonstantinou, « In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine », *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, vol. 6, n° 5, p. 593-597, juill. 2007.
- [106] S.-N. Shu, « Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells », *World J. Gastroenterol.*, vol. 10, n° 19, p. 2818, 2004.

- [107] L.-B. Chen, « Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells », *World J. Gastroenterol.*, vol. 10, n° 20, p. 3016, 2004.
- [108] H. Aslan *et al.*, « Osteogenic Differentiation of Noncultured Immunoisolated Bone Marrow-Derived CD105⁺ Cells », *Stem Cells*, vol. 24, n° 7, p. 1728-1737, juill. 2006.
- [109] B. Johnstone, T. M. Hering, A. I. Caplan, V. M. Goldberg, et J. U. Yoo, « In Vitro Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells », *Exp. Cell Res.*, vol. 238, n° 1, p. 265-272, janv. 1998.
- [110] R. G. Young, D. L. Butler, W. Weber, A. I. Caplan, S. L. Gordon, et D. J. Fink, « Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair », *J. Orthop. Res.*, vol. 16, n° 4, p. 406-413, juill. 1998.
- [111] P. E. Westerweel et M. C. Verhaar, « Directing Myogenic Mesenchymal Stem Cell Differentiation », *Circ. Res.*, vol. 103, n° 6, p. 560-561, sept. 2008.
- [112] S. P. Bruder, N. Jaiswal, et S. E. Haynesworth, « Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation », *J. Cell. Biochem.*, vol. 64, n° 2, p. 278-294, févr. 1997.
- [113] B. Sacchetti *et al.*, « Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment », *Cell*, vol. 131, n° 2, p. 324-336, oct. 2007.
- [114] U. Lakshmipathy et C. Verfaillie, « Stem cell plasticity », *Blood Rev.*, vol. 19, n° 1, p. 29-38, janv. 2005.
- [115] B. Chelluboina, D. H. Dinh, et K. K. Veeravalli, « Transdifferentiation of differentiated stem cells contributes to remyelination », *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 6, n° 1, déc. 2015.
- [116] M. Pokrywczynska *et al.*, « Transdifferentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into the Islet-Like Cells: the Role of Extracellular Matrix Proteins », *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, vol. 63, n° 5, p. 377-384, oct. 2015.
- [117] L. Song et R. S. Tuan, « Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow », *FASEB J.*, vol. 18, n° 9, p. 980-982, juin 2004.
- [118] « Fitzpatrick, V. (2017). Micro-impression de BMP-2 et fibronectine sur des matériaux mous: un outil pour recréer la niche de cellules souches in vitro (Doctoral dissertation, Université Grenoble Alpes) ».
- [119] A. Mantovani, « MSCs, Macrophages, and Cancer: A Dangerous Ménage-à-Trois », *Cell Stem Cell*, vol. 11, n° 6, p. 730-732, déc. 2012.

- [120] L. Chen, E. E. Tredget, P. Y. G. Wu, et Y. Wu, « Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing », *PLoS ONE*, vol. 3, n° 4, p. e1886, avr. 2008.
- [121] S. H. J. Mei *et al.*, « Mesenchymal Stem Cells Reduce Inflammation while Enhancing Bacterial Clearance and Improving Survival in Sepsis », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 182, n° 8, p. 1047-1057, oct. 2010.
- [122] K. Németh *et al.*, « Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2–dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production », *Nat. Med.*, vol. 15, n° 1, p. 42-49, janv. 2009.
- [123] M. Krampera, « Mesenchymal stromal cell ‘licensing’: a multistep process », *Leukemia*, vol. 25, n° 9, p. 1408-1414, sept. 2011.
- [124] R. S. Waterman, S. L. Tomchuck, S. L. Henkle, et A. M. Betancourt, « A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype », *PLoS ONE*, vol. 5, n° 4, p. e10088, avr. 2010.
- [125] J. L. Chan, « Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon- γ », *Blood*, vol. 107, n° 12, p. 4817-4824, juin 2006.
- [126] R. Ramasamy, C. K. Tong, H. F. Seow, S. Vidyadaran, et F. Dazzi, « The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function », *Cell. Immunol.*, vol. 251, n° 2, p. 131-136, 2008.
- [127] R. Meisel, « Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation », *Blood*, vol. 103, n° 12, p. 4619-4621, févr. 2004.
- [128] C. Menard *et al.*, « Clinical-Grade Mesenchymal Stromal Cells Produced Under Various Good Manufacturing Practice Processes Differ in Their Immunomodulatory Properties: Standardization of Immune Quality Controls », *Stem Cells Dev.*, vol. 22, n° 12, p. 1789-1801, juin 2013.
- [129] G. Ren *et al.*, « Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide », *Cell Stem Cell*, vol. 2, n° 2, p. 141-150, févr. 2008.
- [130] R. H. Lee *et al.*, « Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-inflammatory Protein TSG-6 », *Cell Stem Cell*, vol. 5, n° 1, p. 54-63, juill. 2009.

- [131] S. Aggarwal, « Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses », *Blood*, vol. 105, n° 4, p. 1815-1822, févr. 2005.
- [132] H. Choi, R. H. Lee, N. Bazhanov, J. Y. Oh, et D. J. Prockop, « Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- B signaling in resident macrophages », *Blood*, vol. 118, n° 2, p. 330-338, juill. 2011.
- [133] M. Di Nicola, « Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli », *Blood*, vol. 99, n° 10, p. 3838-3843, mai 2002.
- [134] O. DelaRosa et E. Lombardo, « Modulation of Adult Mesenchymal Stem Cells Activity by Toll-Like Receptors: Implications on Therapeutic Potential », *Mediators Inflamm.*, vol. 2010, p. 1-9, 2010.
- [135] Y. Shi, J. Su, A. I. Roberts, P. Shou, A. B. Rabson, et G. Ren, « How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses », *Trends Immunol.*, vol. 33, n° 3, p. 136-143, mars 2012.
- [136] P. Kharaziha *et al.*, « Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I–II clinical trial »:, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 21, n° 10, p. 1199-1205, oct. 2009.
- [137] D. García-Olmo, M. García-Arranz, D. Herreros, I. Pascual, C. Peiro, et J. A. Rodríguez-Montes, « A Phase I Clinical Trial of the Treatment of Crohn's Fistula by Adipose Mesenchymal Stem Cell Transplantation: », *Dis. Colon Rectum*, vol. 48, n° 7, p. 1416-1423, juill. 2005.
- [138] M. Duijvestein *et al.*, « Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study », *Gut*, vol. 59, n° 12, p. 1662-1669, déc. 2010.
- [139] M. Christopeit, M. Schendel, J. Föll, L. P. Müller, G. Keysser, et G. Behre, « Marked improvement of severe progressive systemic sclerosis after transplantation of mesenchymal stem cells from an allogeneic haploidentical-related donor mediated by ligation of CD137L », *Leukemia*, vol. 22, n° 5, p. 1062-1064, mai 2008.
- [140] S. Guiducci *et al.*, « Autologous Mesenchymal Stem Cells Foster Revascularization of Ischemic Limbs in Systemic Sclerosis: A Case Report », *Ann. Intern. Med.*, vol. 153, n° 10, p. 650, nov. 2010.
- [141] J. Xu *et al.*, « Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjogren syndrome », *Blood*, vol. 120, n° 15, p. 3142-3151, oct. 2012.

- [142] E. Zappia, « Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy », *Blood*, vol. 106, n° 5, p. 1755-1761, sept. 2005.
- [143] Y. Nemoto *et al.*, « Bone marrow-mesenchymal stem cells are a major source of interleukin-7 and sustain colitis by forming the niche for colitogenic CD4 memory T cells », *Gut*, vol. 62, n° 8, p. 1142-1152, août 2013.
- [144] J. Dalal, K. Gandy, et J. Domen, « Role of mesenchymal stem cell therapy in Crohn's disease », *Pediatr. Res.*, vol. 71, n° 4-2, p. 445-451, avr. 2012.
- [145] K. Le Blanc *et al.*, « Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells », *The Lancet*, vol. 363, n° 9419, p. 1439-1441, mai 2004.
- [146] K. Le Blanc *et al.*, « Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study », *The Lancet*, vol. 371, n° 9624, p. 1579-1586, mai 2008.
- [147] R. Yañez, M. L. Lamana, J. García-Castro, I. Colmenero, M. Ramírez, et J. A. Bueren, « Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Have In Vivo Immunosuppressive Properties Applicable for the Control of the Graft-Versus-Host Disease », *Stem Cells*, vol. 24, n° 11, p. 2582-2591, nov. 2006.
- [148] L. M. Ball *et al.*, « Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease », *Br. J. Haematol.*, vol. 163, n° 4, p. 501-509, nov. 2013.
- [149] W. N. Brennen, S. R. Denmeade, et J. T. Isaacs, « Mesenchymal stem cells as a vector for the inflammatory prostate microenvironment », *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 20, n° 5, p. R269-R290, août 2013.
- [150] S.-W. Yoo *et al.*, « Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model », *Exp. Mol. Med.*, vol. 40, n° 4, p. 387, 2008.
- [151] F. Dong, J. Harvey, A. Finan, K. Weber, U. Agarwal, et M. S. Penn, « Myocardial CXCR4 Expression Is Required for Mesenchymal Stem Cell Mediated Repair Following Acute Myocardial Infarction », *Circulation*, vol. 126, n° 3, p. 314-324, juill. 2012.
- [152] R. Manuguerra-Gagné *et al.*, « Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Promotes Tissue Regeneration in a Glaucoma Model Through Laser-Induced Paracrine Factor Secretion and Progenitor Cell Recruitment », *STEM CELLS*, vol. 31, n° 6, p. 1136-1148, juin 2013.

- [153] T. Kinnaird, « Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote In Vitro and In Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms », *Circ. Res.*, vol. 94, n° 5, p. 678-685, mars 2004.
- [154] S.-C. Hung, R. R. Pochampally, S.-C. Chen, S.-C. Hsu, et D. J. Prockop, « Angiogenic Effects of Human Multipotent Stromal Cell Conditioned Medium Activate the PI3K-Akt Pathway in Hypoxic Endothelial Cells to Inhibit Apoptosis, Increase Survival, and Stimulate Angiogenesis », *STEM CELLS*, vol. 25, n° 9, p. 2363-2370, sept. 2007.
- [155] Y. Wu, L. Chen, P. G. Scott, et E. E. Tredget, « Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis », *Stem Cells*, vol. 25, n° 10, p. 2648-2659, oct. 2007.
- [156] R. A. Boomsma et D. L. Geenen, « Mesenchymal Stem Cells Secrete Multiple Cytokines That Promote Angiogenesis and Have Contrasting Effects on Chemotaxis and Apoptosis », *PLoS ONE*, vol. 7, n° 4, p. e35685, avr. 2012.
- [157] R. Estrada, N. Li, H. Sarojini, J. An, M.-J. Lee, et E. Wang, « Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61 », *J. Cell. Physiol.*, vol. 219, n° 3, p. 563-571, juin 2009.
- [158] M. Takahashi *et al.*, « Adipose tissue-derived stem cells inhibit neointimal formation in a paracrine fashion in rat femoral artery », *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, vol. 298, n° 2, p. H415-H423, févr. 2010.
- [159] A. I. Caplan et D. Correa, « The MSC: An Injury Drugstore », *Cell Stem Cell*, vol. 9, n° 1, p. 11-15, juill. 2011.
- [160] A. Bura *et al.*, « Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia », *Cytotherapy*, vol. 16, n° 2, p. 245-257, févr. 2014.
- [161] C. Mias *et al.*, « Mesenchymal Stem Cells Promote Matrix Metalloproteinase Secretion by Cardiac Fibroblasts and Reduce Cardiac Ventricular Fibrosis After Myocardial Infarction », *Stem Cells*, vol. 27, n° 11, p. 2734-2743, nov. 2009.
- [162] C. Alfarano *et al.*, « Intraparenchymal Injection of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Reduces Kidney Fibrosis after Ischemia-Reperfusion in Cyclosporine-Immunosuppressed Rats », *Cell Transplant.*, vol. 21, n° 9, p. 2009-2019, sept. 2012.
- [163] A. Uccelli, L. Moretta, et V. Pistoia, « Mesenchymal stem cells in health and disease », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, n° 9, p. 726-736, sept. 2008.
- [164] D. Giunti *et al.*, « Mesenchymal Stem Cells Shape Microglia Effector Functions Through the Release of CX3CL1 », *Stem cells*, vol. 30, n° 9, p. 2044-2053, sept. 2012.

- [165] N. B. Isele *et al.*, « Bone marrow stromal cells mediate protection through stimulation of PI3-K/Akt and MAPK signaling in neurons », *Neurochem. Int.*, vol. 50, n° 1, p. 243-250, janv. 2007.
- [166] I. Rosová, M. Dao, B. Capoccia, D. Link, et J. A. Nolta, « Hypoxic Preconditioning Results in Increased Motility and Improved Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells », *Stem Cells*, vol. 26, n° 8, p. 2173-2182, août 2008.
- [167] J. M. Canals, « Brain-Derived Neurotrophic Factor Regulates the Onset and Severity of Motor Dysfunction Associated with Enkephalinergic Neuronal Degeneration in Huntington's Disease », *J. Neurosci.*, vol. 24, n° 35, p. 7727-7739, sept. 2004.
- [168] S. Stemberger, A. Jamnig, N. Stefanova, G. Lepperdinger, M. Reindl, et G. K. Wenning, « Mesenchymal Stem Cells in a Transgenic Mouse Model of Multiple System Atrophy: Immunomodulation and Neuroprotection », *PLoS ONE*, vol. 6, n° 5, p. e19808, mai 2011.
- [169] S. Mora-Lee *et al.*, « Therapeutic Effects of hMAPC and hMSC Transplantation after Stroke in Mice », *PLoS ONE*, vol. 7, n° 8, p. e43683, août 2012.
- [170] « Rammal, H. (2014). Comparaison de la capacité de différenciation en cellules endothéliales, de deux types de cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton et de la moelle osseuse (Doctoral dissertation, Université de Lorraine). »
- [171] M. Allel, B. Ahmed, « «Structures et Propriétés des Biomatériaux», cours en ligne, Université d'Oran des Sciences et de la Technologie Mohamed Boudiaf USTO-MB, Faculté de Physique ». 2014-2015.
- [172] E. B. Hunziker, « Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 10, n° 6, p. 432-463, juin 2002.
- [173] D. Nesic, R. Whiteside, M. Brittberg, D. Wendt, I. Martin, et P. Mainilvarlet, « Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease☆ », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 58, n° 2, p. 300-322, mai 2006.
- [174] N. Henry *et al.*, « Médecine régénératrice du disque intervertébral: De la physiopathologie à l'application clinique », *médecine/sciences*, vol. 30, n° 12, p. 1091-1100, déc. 2014.
- [175] A. M. Lincoff, J. G. Furst, S. G. Ellis, R. J. Tuch, et E. J. Topol, « Sustained Local Delivery of Dexamethasone by a Novel Intravascular Eluting Stent to Prevent Restenosis in

the Porcine Coronary Injury Model », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 29, n° 4, p. 808-816, mars 1997.

[176] G. C. Reilly et A. J. Engler, « Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation », *J. Biomech.*, vol. 43, n° 1, p. 55-62, janv. 2010.

[177] J. Elisseeff, A. Ferran, S. Hwang, S. Varghese, et Z. Zhang, « The Role of Biomaterials in Stem Cell Differentiation: Applications in the Musculoskeletal System », *Stem Cells Dev.*, vol. 15, n° 3, p. 295-303, juin 2006.

[178] Y. Feng, M. Borrelli, S. Reichl, S. Schrader, et G. Geerling, « Review of Alternative Carrier Materials for Ocular Surface Reconstruction », *Curr. Eye Res.*, vol. 39, n° 6, p. 541-552, juin 2014.

[179] M. Tallawi *et al.*, « Strategies for the chemical and biological functionalization of scaffolds for cardiac tissue engineering: a review », *J. R. Soc. Interface*, vol. 12, n° 108, p. 20150254, juill. 2015.

[180] L. Krishna *et al.*, « Nanostructured scaffold as a determinant of stem cell fate », *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 7, n° 1, déc. 2016.

[181] P. Gunatillake, R. Mayadunne, et R. Adhikari, « Recent developments in biodegradable synthetic polymers », in *Biotechnology Annual Review*, vol. 12, Elsevier, 2006, p. 301-347.

[182] « Laydi, F. E. (2013). Effet de la nature des biomatériaux sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (Doctoral dissertation, Université de Lorraine) ».

[183] S. Even-Ram, V. Artym, et K. M. Yamada, « Matrix Control of Stem Cell Fate », *Cell*, vol. 126, n° 4, p. 645-647, août 2006.

[184] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, et D. E. Discher, « Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification », *Cell*, vol. 126, n° 4, p. 677-689, août 2006.

[185] B. L. Beckstead, S. Pan, A. D. Bhrany, A. M. Bratt-Leal, B. D. Ratner, et C. M. Giachelli, « Esophageal epithelial cell interaction with synthetic and natural scaffolds for tissue engineering », *Biomaterials*, vol. 26, n° 31, p. 6217-6228, nov. 2005.

[186] Y. Zhu, M. B. Chan-Park, et K. Sin Chian, « The growth improvement of porcine esophageal smooth muscle cells on collagen-grafted poly(DL-lactide-co-glycolide) membrane », *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 75B, n° 1, p. 193-199, oct. 2005.

[187] C. E. Schmidt et J. M. Baier, « Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering », *Biomaterials*, vol. 21, n° 22, p. 2215-2231, nov. 2000.

[188] S. Tottey, M. Corselli, E. M. Jeffries, R. Londono, B. Peault, et S. F. Badylak, « Extracellular Matrix Degradation Products and Low-Oxygen Conditions Enhance the

Regenerative Potential of Perivascular Stem Cells », *Tissue Eng. Part A*, vol. 17, n° 1-2, p. 37-44, janv. 2011.

[189] M. Geiger, « Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2 », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, n° 12, p. 1613-1629, nov. 2003.

[190] T. R. Kuklo, A. T. Groth, R. C. Anderson, H. M. Frisch, et R. B. Islinger, « Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for grade III open segmental tibial fractures from combat injuries in Iraq », *J. Bone Joint Surg. Br.*, vol. 90-B, n° 8, p. 1068-1072, août 2008.

[191] F. Grinnell, « Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices », *Trends Cell Biol.*, vol. 13, n° 5, p. 264-269, mai 2003.

[192] A. Mizuno *et al.*, « Severe Osteoporosis in Mice Lacking Osteoclastogenesis Inhibitory Factor/Osteoprotegerin », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 247, n° 3, p. 610-615, juin 1998.

[193] A. de Mel, G. Jell, M. M. Stevens, et A. M. Seifalian, « Biofunctionalization of Biomaterials for Accelerated in Situ Endothelialization: A Review », *Biomacromolecules*, vol. 9, n° 11, p. 2969-2979, nov. 2008.

[194] M. S. Kim *et al.*, « Adhesion Behavior of Human Bone Marrow Stromal Cells on Differentially Wettable Polymer Surfaces », *Tissue Eng.*, vol. 13, n° 8, p. 2095-2103, août 2007.

[195] G. Decher, J. D. Hong, et J. Schmitt, « Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces », *Thin Solid Films*, vol. 210-211, p. 831-835, avr. 1992.

[196] G. Decher, « Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites », *Science*, vol. 277, n° 5330, p. 1232-1237, août 1997.

[197] Y. Lvov, G. Decher, H. Haas, H. Möhwald, et A. Kalachev, « X-ray analysis of ultrathin polymer films self-assembled onto substrates », *Phys. B Condens. Matter*, vol. 198, n° 1-3, p. 89-91, avr. 1994.

[198] C. Picart, « Polyelectrolyte Multilayer Films: From Physico-Chemical Properties to the Control of Cellular Processes », *Curr. Med. Chem.*, vol. 15, n° 7, p. 685-697, mars 2008.

[199] S. S. Shiratori et M. F. Rubner, « pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes », *Macromolecules*, vol. 33, n° 11, p. 4213-4219, mai 2000.

- [200] J. B. Schlenoff, « Charge Balance and Transport in Ion-Paired Polyelectrolyte Multilayers », in *Multilayer Thin Films*, G. Decher et J. B. Schlenoff, Éd. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012, p. 281-320.
- [201] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, et G. M. Whitesides, « Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology », *Chem. Rev.*, vol. 105, n° 4, p. 1103-1170, avr. 2005.
- [202] S. M. Barlow et R. Raval, « Complex organic molecules at metal surfaces: bonding, organisation and chirality », *Surf. Sci. Rep.*, vol. 50, n° 6-8, p. 201-341, août 2003.
- [203] J. A. A. W. Elemans, S. Lei, et S. De Feyter, « Molecular and Supramolecular Networks on Surfaces: From Two-Dimensional Crystal Engineering to Reactivity », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 48, n° 40, p. 7298-7332, sept. 2009.
- [204] A. Pallandre, K. Glinel, A. M. Jonas, et B. Nysten, « Binary Nanopatterned Surfaces Prepared from Silane Monolayers », *Nano Lett.*, vol. 4, n° 2, p. 365-371, févr. 2004.
- [205] F. Schreiber, « Structure and growth of self-assembling monolayers », *Prog. Surf. Sci.*, vol. 65, n° 5-8, p. 151-257, nov. 2000.
- [206] A. Ulman, « Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers », *Chem. Rev.*, vol. 96, n° 4, p. 1533-1554, janv. 1996.
- [207] S. R. Wasserman, Y. T. Tao, et G. M. Whitesides, « Structure and reactivity of alkylsiloxane monolayers formed by reaction of alkyltrichlorosilanes on silicon substrates », *Langmuir*, vol. 5, n° 4, p. 1074-1087, juill. 1989.
- [208] K. A. Kilian et M. Mrksich, « Directing Stem Cell Fate by Controlling the Affinity and Density of Ligand-Receptor Interactions at the Biomaterials Interface », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 51, n° 20, p. 4891-4895, mai 2012.
- [209] G. A. Hudalla et W. L. Murphy, « Chemically well-defined self-assembled monolayers for cell culture: toward mimicking the natural ECM », *Soft Matter*, vol. 7, n° 20, p. 9561, 2011.
- [210] M. Yamato, C. Konno, M. Utsumi, A. Kikuchi, et T. Okano, « Thermally responsive polymer-grafted surfaces facilitate patterned cell seeding and co-culture », *Biomaterials*, vol. 23, n° 2, p. 561-567, janv. 2002.
- [211] N. Aggarwal, N. Altgärde, S. Svedhem, G. Michanetzis, Y. Missirlis, et T. Groth, « Tuning Cell Adhesion and Growth on Biomimetic Polyelectrolyte Multilayers by Variation of pH During Layer-by-Layer Assembly: Tuning Cell Adhesion and Growth on Biomimetic Polyelectrolyte ... », *Macromol. Biosci.*, vol. 13, n° 10, p. 1327-1338, oct. 2013.

- [212] S. R. Pattabhi, A. M. Lehaf, J. B. Schlenoff, et T. C. S. Keller, « Human mesenchymal stem cell osteoblast differentiation, ECM deposition, and biomineralization on PAH/PAA polyelectrolyte multilayers: PAH/PAA POLYELECTROLYTE MULTILAYERS », *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 103, n° 5, p. 1818-1827, mai 2015.
- [213] A. M. Lehaf, H. H. Hariri, et J. B. Schlenoff, « Homogeneity, Modulus, and Viscoelasticity of Polyelectrolyte Multilayers by Nanoindentation: Refining the Buildup Mechanism », *Langmuir*, vol. 28, n° 15, p. 6348-6355, avr. 2012.
- [214] A. T. Nguyen, S. R. Sathe, et E. K. F. Yim, « From nano to micro: topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance », *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 28, n° 18, p. 183001, mai 2016.
- [215] R. G. Flemming, C. J. Murphy, G. A. Abrams, S. L. Goodman, et P. F. Nealey, « Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior », *Biomaterials*, vol. 20, n° 6, p. 573-588, mars 1999.
- [216] D. M. Le, K. Kulangara, A. F. Adler, K. W. Leong, et V. S. Ashby, « Dynamic Topographical Control of Mesenchymal Stem Cells by Culture on Responsive Poly(ϵ -caprolactone) Surfaces », *Adv. Mater.*, vol. 23, n° 29, p. 3278-3283, août 2011.
- [217] F. Jiang et J. A. Doudna, « CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms », *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 46, n° 1, p. 505-529, mai 2017.
- [218] A. Urciuolo *et al.*, « Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration », *Nat. Commun.*, vol. 4, n° 1, déc. 2013.
- [219] X. Guo, Z.-M. Cai, et Y.-T. Gui, « Progress in the research of germ cell from human embryonic stem cells », *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, vol. 37, n° 1, p. 17-21, janv. 2006.
- [220] E. Hadjipanayi, V. Mudera, et R. A. Brown, « Guiding cell migration in 3D: A collagen matrix with graded directional stiffness », *Cell Motil. Cytoskeleton*, vol. 66, n° 3, p. 121-128, mars 2009.
- [221] J. P. Winer, P. A. Janmey, M. E. McCormick, et M. Funaki, « Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Become Quiescent on Soft Substrates but Remain Responsive to Chemical or Mechanical Stimuli », *Tissue Eng. Part A*, vol. 15, n° 1, p. 147-154, janv. 2009.
- [222] G. Halder, S. Dupont, et S. Piccolo, « Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, n° 9, p. 591-600, sept. 2012.
- [223] M. Arnold *et al.*, « Activation of Integrin Function by Nanopatterned Adhesive Interfaces », *ChemPhysChem*, vol. 5, n° 3, p. 383-388, mars 2004.

- [224] S. Gerecht, C. J. Bettinger, Z. Zhang, J. T. Borenstein, G. Vunjak-Novakovic, et R. Langer, « The effect of actin disrupting agents on contact guidance of human embryonic stem cells », *Biomaterials*, vol. 28, n° 28, p. 4068-4077, oct. 2007.
- [225] H. Lin et A. C. Spradling, « Fusome asymmetry and oocyte determination in *Drosophila* », *Dev. Genet.*, vol. 16, n° 1, p. 6-12, 1995.
- [226] O. F. Harandi et V. R. Ambros, « Control of stem cell self-renewal and differentiation by the heterochronic genes and the cellular asymmetry machinery in *Caenorhabditis elegans* », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, n° 3, p. E287-E296, janv. 2015.
- [227] M. J. Dalby *et al.*, « The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder », *Nat. Mater.*, vol. 6, n° 12, p. 997-1003, déc. 2007.
- [228] H. J. Anderson, J. K. Sahoo, R. V. Ulijn, et M. J. Dalby, « Mesenchymal Stem Cell Fate: Applying Biomaterials for Control of Stem Cell Behavior », *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 4, mai 2016.
- [229] E. Engel, E. Martínez, C. A. Mills, M. Funes, J. A. Planell, et J. Samitier, « Mesenchymal stem cell differentiation on microstructured poly (methyl methacrylate) substrates », *Ann. Anat. - Anat. Anz.*, vol. 191, n° 1, p. 136-144, janv. 2009.
- [230] D. Ingber, « Extracellular matrix and cell shape: Potential control points for inhibition of angiogenesis », *J. Cell. Biochem.*, vol. 47, n° 3, p. 236-241, nov. 1991.
- [231] D. E. Ingber, « The mechanochemical basis of cell and tissue regulation », *Mech. Chem. Biosyst. MCB*, vol. 1, n° 1, p. 53-68, mars 2004.
- [232] T. Lecuit et P.-F. Lenne, « Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, n° 8, p. 633-644, août 2007.
- [233] S. H. McBride et M. L. Knothe Tate, « Modulation of Stem Cell Shape and Fate A: The Role of Density and Seeding Protocol on Nucleus Shape and Gene Expression », *Tissue Eng. Part A*, vol. 14, n° 9, p. 1561-1572, sept. 2008.
- [234] H. A. Awad, M. Quinn Wickham, H. A. Leddy, J. M. Gimble, et F. Guilak, « Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds », *Biomaterials*, vol. 25, n° 16, p. 3211-3222, juill. 2004.
- [235] « Hernandez, J. B. (2008). Anisotropie magnétique induite par modulation de surface et étude de la propagation de parois de domaines dans des nanostructures magnétiques (Doctoral dissertation, Université Henri Poincaré-Nancy I). »
- [236] « Riahi, H. (2013). Propriétés du réseau kagomé artificiel: micromagnétisme, chiralités et cristaux de charges émergents (Doctoral dissertation, Université de Lorraine). »

- [237] S. Hsu, C.-Y. Chen, P. S. Lu, C.-S. Lai, et C.-J. Chen, « Oriented Schwann cell growth on microgrooved surfaces », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 92, n° 5, p. 579-588, déc. 2005.
- [238] Z. A. Cheng, O. F. Zouani, K. Glinel, A. M. Jonas, et M.-C. Durrieu, « Bioactive Chemical Nanopatterns Impact Human Mesenchymal Stem Cell Fate », *Nano Lett.*, vol. 13, n° 8, p. 3923-3929, août 2013.
- [239] D. Zhang et K. A. Kilian, « The effect of mesenchymal stem cell shape on the maintenance of multipotency », *Biomaterials*, vol. 34, n° 16, p. 3962-3969, mai 2013.
- [240] J. Lee, A. A. Abdeen, D. Zhang, et K. A. Kilian, « Directing stem cell fate on hydrogel substrates by controlling cell geometry, matrix mechanics and adhesion ligand composition », *Biomaterials*, vol. 34, n° 33, p. 8140-8148, nov. 2013.
- [241] K. A. Kilian, B. Bugarija, B. T. Lahn, et M. Mrksich, « Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, n° 11, p. 4872-4877, mars 2010.
- [242] R. McBeath, D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju, et C. S. Chen, « Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment », *Dev. Cell*, vol. 6, n° 4, p. 483-495, avr. 2004.
- [243] A. J. Engler, F. Rehfeldt, S. Sen, et D. E. Discher, « Microtissue Elasticity: Measurements by Atomic Force Microscopy and Its Influence on Cell Differentiation », in *Methods in Cell Biology*, vol. 83, Elsevier, 2007, p. 521-545.
- [244] H. Shin, S. Jo, et A. G. Mikos, « Biomimetic materials for tissue engineering », *Biomaterials*, vol. 24, n° 24, p. 4353-4364, nov. 2003.
- [245] J. D. Krutty, S. K. Schmitt, P. Gopalan, et W. L. Murphy, « Surface functionalization and dynamics of polymeric cell culture substrates », *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 40, p. 164-169, août 2016.
- [246] S. Dupont, « Role of YAP/TAZ in cell-matrix adhesion-mediated signalling and mechanotransduction », *Exp. Cell Res.*, vol. 343, n° 1, p. 42-53, avr. 2016.
- [247] G. Halder, S. Dupont, et S. Piccolo, « Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, n° 9, p. 591-600, sept. 2012.
- [248] Y. Sun, C. S. Chen, et J. Fu, « Forcing Stem Cells to Behave: A Biophysical Perspective of the Cellular Microenvironment », *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 41, n° 1, p. 519-542, juin 2012.
- [249] T. D. Ross *et al.*, « Integrins in mechanotransduction », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 25, n° 5, p. 613-618, oct. 2013.

- [250] M. A. Schwartz et D. W. DeSimone, « Cell adhesion receptors in mechanotransduction », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 20, n° 5, p. 551-556, oct. 2008.
- [251] V. I. Chubinskiy-Nadezhdin, Y. A. Negulyaev, et E. A. Morachevskaya, « Functional coupling of ion channels in cellular mechanotransduction », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 451, n° 3, p. 421-424, août 2014.
- [252] C. Ciobanasu, B. Faivre, et C. Le Clainche, « Integrating actin dynamics, mechanotransduction and integrin activation: The multiple functions of actin binding proteins in focal adhesions », *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 92, n° 10-11, p. 339-348, oct. 2013.
- [253] A. J. Steward, D. R. Wagner, et D. J. Kelly, « Exploring the roles of integrin binding and cytoskeletal reorganization during mesenchymal stem cell mechanotransduction in soft and stiff hydrogels subjected to dynamic compression », *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 38, p. 174-182, oct. 2014.
- [254] G. R. Fedorchak, A. Kaminski, et J. Lammerding, « Cellular mechanosensing: Getting to the nucleus of it all », *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 115, n° 2-3, p. 76-92, août 2014.
- [255] F. Chamaraux, O. Ali, S. Keller, F. Bruckert, et B. Fourcade, « Physical model for membrane protrusions during spreading », *Phys. Biol.*, vol. 5, n° 3, p. 036009, sept. 2008.
- [256] M. Socol, C. Lefrou, F. Bruckert, D. Delabougli, et M. Weidenhaupt, « Synchronization of Dictyostelium discoideum adhesion and spreading using electrostatic forces », *Bioelectrochemistry*, vol. 79, n° 2, p. 198-210, oct. 2010.
- [257] G. Keller, « Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine », *Genes Dev.*, vol. 19, n° 10, p. 1129-1155, mai 2005.
- [258] R. J. Petrie, A. D. Doyle, et K. M. Yamada, « Random versus directionally persistent cell migration », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, n° 8, p. 538-549, août 2009.
- [259] P. R. Morrison, J. T. Edsall, et S. G. Miller, « Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XVIII. The Separation of Purified Fibrinogen from Fraction I of Human Plasma. », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 70, n° 9, p. 3103-3108, sept. 1948.
- [260] R. O. Hynes et K. M. Yamada, « Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins », *J. Cell Biol.*, vol. 95, n° 2 Pt 1, p. 369-377, nov. 1982.
- [261] J. E. Schwarzbauer, « Identification of the fibronectin sequences required for assembly of a fibrillar matrix », *J. Cell Biol.*, vol. 113, n° 6, p. 1463-1473, juin 1991.
- [262] J. R. Potts et I. D. Campbell, « Fibronectin structure and assembly », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 6, n° 5, p. 648-655, oct. 1994.
- [263] G. Niu et X. Chen, « Why integrin as a primary target for imaging and therapy », *Theranostics*, vol. 1, p. 30-47, 2011.

- [264] J. L. Sechler *et al.*, « A novel fibronectin binding site required for fibronectin fibril growth during matrix assembly », *J. Cell Biol.*, vol. 154, n° 5, p. 1081-1088, sept. 2001.
- [265] K. S. Midwood, Y. Mao, H. C. Hsia, L. V. Valenick, et J. E. Schwarzbauer, « Modulation of Cell–Fibronectin Matrix Interactions during Tissue Repair », *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, vol. 11, n° 1, p. 73-78, sept. 2006.
- [266] N. Yang, R. Mosher, S. Seo, D. Beebe, et A. Friedl, « Syndecan-1 in Breast Cancer Stroma Fibroblasts Regulates Extracellular Matrix Fiber Organization and Carcinoma Cell Motility », *Am. J. Pathol.*, vol. 178, n° 1, p. 325-335, janv. 2011.
- [267] J. L. Sechler, S. A. Corbett, et J. E. Schwarzbauer, « Modulatory Roles for Integrin Activation and the Synergy Site of Fibronectin during Matrix Assembly », *Mol. Biol. Cell*, vol. 8, n° 12, p. 2563-2573, déc. 1997.
- [268] C. M. Klass, J. R. Couchman, et A. Woods, « Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan », *J. Cell Sci.*, vol. 113 (Pt 3), p. 493-506, févr. 2000.
- [269] V. Kostourou et V. Papalazarou, « Non-collagenous ECM proteins in blood vessel morphogenesis and cancer », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1840, n° 8, p. 2403-2413, août 2014.
- [270] M. R. Morgan, M. J. Humphries, et M. D. Bass, « Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, n° 12, p. 957-969, déc. 2007.
- [271] S. S. Akimov et A. M. Belkin, « Cell-surface transglutaminase promotes fibronectin assembly via interaction with the gelatin-binding domain of fibronectin: a role in TGFbeta-dependent matrix deposition », *J. Cell Sci.*, vol. 114, n° Pt 16, p. 2989-3000, août 2001.
- [272] P. Chatakun *et al.*, « The effect of five proteins on stem cells used for osteoblast differentiation and proliferation: a current review of the literature », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 71, n° 1, p. 113-142, janv. 2014.
- [273] K. E. Kadler, A. Hill, et E. G. Canty-Laird, « Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 20, n° 5, p. 495-501, oct. 2008.
- [274] M. C. Porté Durrieu *et al.*, « Development of RGD peptides grafted onto silica surfaces: XPS characterization and human endothelial cell interactions », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 46, n° 3, p. 368-375, sept. 1999.
- [275] J. A. Rowley et D. J. Mooney, « Alginate type and RGD density control myoblast phenotype », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 60, n° 2, p. 217-223, mai 2002.

- [276] P. R. Patel *et al.*, « Synthesis and Cell Adhesive Properties of Linear and Cyclic RGD Functionalized Polynorbornene Thin Films », *Biomacromolecules*, vol. 13, n° 8, p. 2546-2553, août 2012.
- [277] N. Huebsch *et al.*, « Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate », *Nat. Mater.*, vol. 9, n° 6, p. 518-526, juin 2010.
- [278] C. Mas-Moruno, F. Rechenmacher, et H. Kessler, « Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation », *Anticancer Agents Med. Chem.*, vol. 10, n° 10, p. 753-768, déc. 2010.
- [279] P. W. Kämmerer, M. Heller, J. Brieger, M. O. Klein, B. Al-Nawas, et M. Gabriel, « Immobilisation of linear and cyclic RGD-peptides on titanium surfaces and their impact on endothelial cell adhesion and proliferation », *Eur. Cell. Mater.*, vol. 21, p. 364-372, avr. 2011.
- [280] J. M. Schober, L. F. Lau, T. P. Ugarova, et S. C.-T. Lam, « Identification of a Novel Integrin α M β 2 Binding Site in CCN1 (CYR61), a Matricellular Protein Expressed in Healing Wounds and Atherosclerotic Lesions », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 28, p. 25808-25815, juill. 2003.
- [281] P. D. Ellis, J. C. Metcalfe, M. Hyvönen, et P. R. Kemp, « Adhesion of Endothelial Cells to NOV Is Mediated by the Integrins α v β 3 and α 5 β 1 », *J. Vasc. Res.*, vol. 40, n° 3, p. 234-243, 2003.
- [282] R. Gao et D. R. Brigstock, « Connective Tissue Growth Factor (CCN2) Induces Adhesion of Rat Activated Hepatic Stellate Cells by Binding of Its C-terminal Domain to Integrin $\alpha_v\beta_3$ and Heparan Sulfate Proteoglycan », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 10, p. 8848-8855, mars 2004.
- [283] P. Kanchanawong *et al.*, « Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions », *Nature*, vol. 468, n° 7323, p. 580-584, nov. 2010.
- [284] B. Geiger, J. P. Spatz, et A. D. Bershadsky, « Environmental sensing through focal adhesions », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, n° 1, p. 21-33, janv. 2009.
- [285] J. E. Frith, R. J. Mills, J. E. Hudson, et J. J. Cooper-White, « Tailored Integrin–Extracellular Matrix Interactions to Direct Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation », *Stem Cells Dev.*, vol. 21, n° 13, p. 2442-2456, sept. 2012.
- [286] A. S. Rowlands, P. A. George, et J. J. Cooper-White, « Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation », *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, vol. 295, n° 4, p. C1037-C1044, oct. 2008.

- [287] F. Guilak, D. M. Cohen, B. T. Estes, J. M. Gimble, W. Liedtke, et C. S. Chen, « Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix », *Cell Stem Cell*, vol. 5, n° 1, p. 17-26, juill. 2009.
- [288] A. Higuchi, Q.-D. Ling, Y. Chang, S.-T. Hsu, et A. Umezawa, « Physical Cues of Biomaterials Guide Stem Cell Differentiation Fate », *Chem. Rev.*, vol. 113, n° 5, p. 3297-3328, mai 2013.
- [289] B. Trappmann *et al.*, « Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate », *Nat. Mater.*, vol. 11, n° 7, p. 642-649, juill. 2012.
- [290] J. R. Klim, L. Li, P. J. Wrighton, M. S. Piekarczyk, et L. L. Kiessling, « A defined glycosaminoglycan-binding substratum for human pluripotent stem cells », *Nat. Methods*, vol. 7, n° 12, p. 989-994, déc. 2010.
- [291] S. T. Cowan, « Abbreviation of Bacterial Generic Names », *Science*, vol. 120, n° 3131, p. 1103-1104, déc. 1954.
- [292] L. A. King *et al.*, « Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:[H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011 », *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 20, n° 12, p. O1136-O1144, déc. 2014.
- [293] J. D. Schilling, M. A. Mulvey, C. D. Vincent, R. G. Lorenz, et S. J. Hultgren, « Bacterial Invasion Augments Epithelial Cytokine Responses to *Escherichia coli* Through a Lipopolysaccharide-Dependent Mechanism », *J. Immunol.*, vol. 166, n° 2, p. 1148-1155, janv. 2001.
- [294] O. Tenaillon, D. Skurnik, B. Picard, et E. Denamur, « The population genetics of commensal *Escherichia coli* », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, n° 3, p. 207-217, mars 2010.
- [295] K. Ejrnæs, « Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli* », *Dan. Med. Bull.*, vol. 58, n° 4, p. B4187, avr. 2011.
- [296] K. Ejrnæs *et al.*, « Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections: phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation », *Virulence*, vol. 2, n° 6, p. 528-537, déc. 2011.
- [297] J. Yang, R. Bos, G. F. Belder, J. Engel, et H. J. Busscher, « Deposition of Oral Bacteria and Polystyrene Particles to Quartz and Dental Enamel in a Parallel Plate and Stagnation Point Flow Chamber », *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 220, n° 2, p. 410-418, déc. 1999.
- [298] L. A. Pratt et R. Kolter, « Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili », *Mol. Microbiol.*, vol. 30, n° 2, p. 285-293, oct. 1998.

- [299] C. Prigent-Combaret, G. Prensier, T. T. Le Thi, O. Vidal, P. Lejeune, et C. Dorel, « Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid », *Environ. Microbiol.*, vol. 2, n° 4, p. 450-464, août 2000.
- [300] A. J. de Kerchove et M. Elimelech, « Bacterial swimming motility enhances cell deposition and surface coverage », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, n° 12, p. 4371-4377, juin 2008.
- [301] R. M. Harshey, « Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal », *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 57, n° 1, p. 249-273, oct. 2003.
- [302] « Veuillet, M. (2017). Contrôle des propriétés mécaniques par polymérisation plasma pour des surfaces innovantes antibactériennes (Doctoral dissertation, Université de Haute Alsace-Mulhouse) ».
- [303] T. Proft et E. N. Baker, « Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly and their role in disease », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, n° 4, p. 613-635, févr. 2009.
- [304] G. Zhou *et al.*, « Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding », *J. Cell Sci.*, vol. 114, n° Pt 22, p. 4095-4103, nov. 2001.
- [305] Y. D. N. Tremblay, S. Hathroubi, et M. Jacques, « Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health », *Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Veterinaire*, vol. 78, n° 2, p. 110-116, avr. 2014.
- [306] G. Stevenson, K. Andrianopoulos, M. Hobbs, et P. R. Reeves, « Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. », *J. Bacteriol.*, vol. 178, n° 16, p. 4885-4893, août 1996.
- [307] R. Daniels, J. Vanderleyden, et J. Michiels, « Quorum sensing and swarming migration in bacteria », *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 28, n° 3, p. 261-289, juin 2004.
- [308] A. Reisner, J. A. J. Haagensen, M. A. Schembri, E. L. Zechner, et S. Molin, « Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms: IncF plasmid promoted *E. coli* biofilm maturation », *Mol. Microbiol.*, vol. 48, n° 4, p. 933-946, mai 2003.
- [309] V. J. Savage, I. Chopra, et A. J. O'Neill, « *Staphylococcus aureus* Biofilms Promote Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, n° 4, p. 1968-1970, avr. 2013.
- [310] H.-C. Flemming et J. Wingender, « The biofilm matrix », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, n° 9, p. 623-633, sept. 2010.

- [311] K. Driffield, K. Miller, J. M. Bostock, A. J. O'Neill, et I. Chopra, « Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms », *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 61, n° 5, p. 1053-1056, mars 2008.
- [312] M. R. Parsek et T. Tolker-Nielsen, « Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms », *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 11, n° 6, p. 560-566, déc. 2008.
- [313] S. Wuertz, S. Okabe, et M. Hausner, « Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview », *Water Sci. Technol.*, vol. 49, n° 11-12, p. 327-336, juin 2004.
- [314] L. Ploux, A. Ponche, et K. Anselme, « Bacteria/Material Interfaces: Role of the Material and Cell Wall Properties », *J. Adhes. Sci. Technol.*, vol. 24, n° 13-14, p. 2165-2201, janv. 2010.
- [315] N. Cottenye, K. Anselme, L. Ploux, et C. Vebert-Nardin, « Vesicular Structures Self-Assembled from Oligonucleotide-Polymer Hybrids: Mechanical Prevention of Bacterial Colonization Upon their Surface Tethering Through Hybridization », *Adv. Funct. Mater.*, vol. 22, n° 23, p. 4891-4898, déc. 2012.
- [316] « Cottenye, N. (2010). Antimicrobial surfaces based on self-assembled nanoreactors: from block copolymer synthesis to bacterial adhesion studies (Doctoral dissertation, Mulhouse). »
- [317] C. Guégan *et al.*, « Alteration of bacterial adhesion induced by the substrate stiffness », *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 114, p. 193-200, févr. 2014.
- [318] K. W. Kolewe, S. R. Peyton, et J. D. Schiffman, « Fewer Bacteria Adhere to Softer Hydrogels », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, n° 35, p. 19562-19569, sept. 2015.
- [319] Y. Wang *et al.*, « Interactions of *Staphylococcus aureus* with ultrasoft hydrogel biomaterials », *Biomaterials*, vol. 95, p. 74-85, juill. 2016.
- [320] N. Saha, C. Monge, V. Dulong, C. Picart, et K. Glinel, « Influence of Polyelectrolyte Film Stiffness on Bacterial Growth », *Biomacromolecules*, vol. 14, n° 2, p. 520-528, févr. 2013.
- [321] J. Tsibouklis *et al.*, « Preventing bacterial adhesion onto surfaces: the low-surface-energy approach », *Biomaterials*, vol. 20, n° 13, p. 1229-1235, juill. 1999.
- [322] G. Speranza *et al.*, « Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces », *Biomaterials*, vol. 25, n° 11, p. 2029-2037, mai 2004.
- [323] A. Terada, A. Yuasa, S. Tsuneda, A. Hirata, A. Katakai, et M. Tamada, « Elucidation of dominant effect on initial bacterial adhesion onto polymer surfaces prepared by radiation-

induced graft polymerization », *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 43, n° 2, p. 99-107, juin 2005.

[324] B. Gottenbos, D. W. Grijpma, H. C. van der Mei, J. Feijen, et H. J. Busscher, « Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria », *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 48, n° 1, p. 7-13, juill. 2001.

[325] O. Rzhepishevskaya, S. Hakobyan, R. Ruhel, J. Gautrot, D. Barbero, et M. Ramstedt, « The surface charge of anti-bacterial coatings alters motility and biofilm architecture », *Biomater. Sci.*, vol. 1, n° 6, p. 589, 2013.

[326] J. F. Jones, J. D. Feick, D. Imoudu, N. Chukwumah, M. Vigeant, et D. Velegol, « Oriented Adhesion of Escherichia coli to Polystyrene Particles », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, n° 11, p. 6515-6519, nov. 2003.

[327] Y. H. An et R. J. Friedman, « Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 43, n° 3, p. 338-348, 1998.

[328] L. Ploux, S. Beckendorff, M. Nardin, et S. Neunlist, « Quantitative and morphological analysis of biofilm formation on self-assembled monolayers », *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 57, n° 2, p. 174-181, juin 2007.

[329] N. P. Boks, H. J. Kaper, W. Norde, H. C. van der Mei, et H. J. Busscher, « Mobile and immobile adhesion of staphylococcal strains to hydrophilic and hydrophobic surfaces », *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 331, n° 1, p. 60-64, mars 2009.

[330] S. H. Flint, J. D. Brooks, et P. J. Bremer, « Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci », *J. Food Eng.*, vol. 43, n° 4, p. 235-242, mars 2000.

[331] L. Ploux, K. Anselme, A. Dirani, A. Ponche, O. Soppera, et V. Roucoules, « Opposite Responses of Cells and Bacteria to Micro/Nanopatterned Surfaces Prepared by Pulsed Plasma Polymerization and UV-Irradiation », *Langmuir*, vol. 25, n° 14, p. 8161-8169, juill. 2009.

[332] L. R. Hilbert, D. Bagge-Ravn, J. Kold, et L. Gram, « Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance », *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 52, n° 3, p. 175-185, oct. 2003.

[333] E. Medilanski, K. Kaufmann, L. Y. Wick, O. Wanner, et H. Harms, « Influence of the Surface Topography of Stainless Steel on Bacterial Adhesion », *Biofouling*, vol. 18, n° 3, p. 193-203, janv. 2002.

[334] T. R. Scheuerman, A. K. Camper, et M. A. Hamilton, « Effects of Substratum Topography on Bacterial Adhesion », *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 208, n° 1, p. 23-33, déc. 1998.

- [335] C. Díaz, P. L. Schilardi, R. C. Salvarezza, et M. Fernández Lorenzo de Mele, « Nano/Microscale Order Affects the Early Stages of Biofilm Formation on Metal Surfaces », *Langmuir*, vol. 23, n° 22, p. 11206-11210, oct. 2007.
- [336] K. Anselme, P. Davidson, A. M. Popa, M. Giazzon, M. Liley, et L. Ploux, « Response to comment on “The interaction of cells and bacteria with surfaces structures at the nanoscale” », *Acta Biomater.*, vol. 7, n° 4, p. 1936-1937, avr. 2011.
- [337] D. Siegismund, A. Undisz, S. Germerodt, S. Schuster, et M. Rettenmayr, « Quantification of the interaction between biomaterial surfaces and bacteria by 3-D modeling », *Acta Biomater.*, vol. 10, n° 1, p. 267-275, janv. 2014.
- [338] D. Zhang et K. A. Kilian, « Peptide microarrays for the discovery of bioactive surfaces that guide cellular processes: a single step azide–alkyne “click” chemistry approach », *J Mater Chem B*, vol. 2, n° 27, p. 4280-4288, 2014.
- [339] « Pallandre, A. (2004).Macromolecular Assemblies onto Chemically Nanopatterned Surfaces (Doctoral dissertation, Université catholique de Louvain) ».
- [340] C. N. Hughes-Chinkhota *et al.*, « Oligonucleotide immobilization using 10-(carbomethoxy)decyl-dimethylchlorosilane for mRNA isolation and cDNA synthesis on a microfluidic chip », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 155, n° 2, p. 437-445, juill. 2011.
- [341] S. Fiorilli *et al.*, « Vapor-phase self-assembled monolayers of aminosilane on plasma-activated silicon substrates », *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 321, n° 1, p. 235-241, mai 2008.
- [342] M. Lösche, J. Schmitt, G. Decher, W. G. Bouwman, et K. Kjaer, « Detailed Structure of Molecularly Thin Polyelectrolyte Multilayer Films on Solid Substrates as Revealed by Neutron Reflectometry », *Macromolecules*, vol. 31, n° 25, p. 8893-8906, déc. 1998.
- [343] R. Chen, J. A. Hunt, S. Fawcett, R. D’sa, R. Akhtar, et J. M. Curran, « The optimization and production of stable homogeneous amine enriched surfaces with characterized nanotopographical properties for enhanced osteoinduction of mesenchymal stem cells: Opimization and Production of Stable Homogeneous Amine Enriched Surfaces », *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 106, n° 7, p. 1862-1877, juill. 2018.
- [344] K. A. Whitehead, J. Colligon, et J. Verran, « Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions », *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 41, n° 2-3, p. 129-138, mars 2005.
- [345] D. Campoccia *et al.*, « Study of Staphylococcus Aureus Adhesion on a Novel Nanostructured Surface by Chemiluminometry », *Int. J. Artif. Organs*, vol. 29, n° 6, p. 622-630, juin 2006.

- [346] V. A. Tegoulia et S. L. Cooper, « Staphylococcus aureus adhesion to self-assembled monolayers: effect of surface chemistry and fibrinogen presence », *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 24, n° 3-4, p. 217-228, avr. 2002.
- [347] B. Li et B. E. Logan, « Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces », *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 36, n° 2, p. 81-90, juill. 2004.
- [348] P. Krsko, J. B. Kaplan, et M. Libera, « Spatially controlled bacterial adhesion using surface-patterned poly(ethylene glycol) hydrogels », *Acta Biomater.*, vol. 5, n° 2, p. 589-596, févr. 2009.
- [349] Laboratory of Biomechanics and Biomedical Engineering, Department of Mechanical Engineering, University of Patras, Patras, Greece, M. Katsikogianni, et Y. Missirlis, « Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions », *Eur. Cell. Mater.*, vol. 8, p. 37-57, déc. 2004.
- [350] L. G. Harris, S. Tosatti, M. Wieland, M. Textor, et R. G. Richards, « Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(l-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers », *Biomaterials*, vol. 25, n° 18, p. 4135-4148, août 2004.
- [351] L. F. Thompson, C. G. Willson, et M. J. Bowden, Éd., *Introduction to microlithography*, 2nd ed. Washington, DC: American Chemical Society, 1994.
- [352] S. A. Campbell, *The science and engineering of microelectronic fabrication*, 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2001.
- [353] E. A. Dobisz, S. L. Brandow, R. Bass, et J. Mitterender, « Effects of molecular properties on nanolithography in polymethyl methacrylate », *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanometer Struct.*, vol. 18, n° 1, p. 107, 2000.
- [354] M. A. E. Auty *et al.*, « Direct In Situ Viability Assessment of Bacteria in Probiotic Dairy Products Using Viability Staining in Conjunction with Confocal Scanning Laser Microscopy », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, n° 1, p. 420-425, janv. 2001.

Résumé

Assemblages et études de la différenciation cellulaire de cellules souches sur des surfaces de géométrie et chimie contrôlées

Résumé

La cellule répond aux contraintes physiques exercées par son environnement par un ensemble de mécanismes regroupés sous le terme de mécanotransduction. Ces processus font appel aux molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire, au cytosquelette et au noyau. Ces contraintes environnementales, qu'elles soient liées à la rigidité du support, à sa topographie ou à la nature de sa chimie de surface, vont moduler la morphologie cellulaire et impacter le comportement de la cellule. Afin d'étudier cette influence du support, nous avonsensemencé des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) de moelle osseuse (MO) issues d'une culture primaire sur des surfaces de mica vierges ou fonctionnalisées de façon homogène avec des molécules naturelles (la fibronectine FN et le peptide RGD cyclique) ou avec des multicouches de polyélectrolytes PEM (cinq cycles de Chitosan/PAA ou de Chitosan/PSS). Nous avons ensuite étudié la morphologie, la prolifération et la différenciation de ces cellules après 12 jours de culture. Il en résulte que les CSMs de MO adhèrent sur toutes les surfaces, traitées ou non, et bien que leur étalement soit moindre sur les surfaces vierges, elles adoptent une morphologie de type fibroblastique similaire à leur phénotype physiologique. Leur pourcentage de confluence varie significativement en fonction du traitement de surface utilisé. En effet la confluence maximale a été observée pour les surfaces greffées avec la FN (93.25 ± 2.75 %) alors que les surfaces traitées avec les PEM présentent des pourcentages de confluence bien plus faibles (61.00 ± 4.08 % pour le couple chitosan/PAA et 54.75 ± 1.75 % pour le couple Chitosan/PSS), s'expliquant principalement par une latence cellulaire en début de culture. Enfin, les cellules cultivées sur nos surfaces ne réagissent à aucune des trois colorations Oil Red O, Alcian Blue ou Alizarin Red S, suggérant une absence de différenciation dans les voies adipogénique, chondrogénique ou ostéogénique induite par ces surfaces. Ainsi, le contrôle de la chimie du support ne permet pas à lui seul un contrôle de la différenciation cellulaire. Cette étude ouvre la voie à l'étape suivante au cours de laquelle l'influence des supports à chimie et géométrie contrôlées.

De même, la souche E.coli (bactérie pathogène) répond aux contraintes physiques et chimiques qui lui ont été imposées. Ces contraintes qu'elles soient liées à la topographie ou la nature de la chimie de surface font appel à des molécules naturelles impliquées dans le comportement des bactéries et leur morphologie en particulier sur leur taille. Pour étudier cet impact, nous avons mis en contact la souche E.coli E2146 avec des surfaces de mica vierges

ou traitées de façon homogène ou patternée avec des molécules naturelles (la FN et le peptide RGD cyclique). Ensuite, nous avons étudié le taux de recouvrement et la taille des bactéries. Il en résulte que les bactéries adhèrent sur l'ensemble des surfaces bien que l'adhésion soit moindre sur les surfaces de mica vierges. Leur taux de recouvrement varie significativement pour une surface donnée. En effet, le taux de recouvrement et la taille maximaux sont observés sur des surfaces patternées greffées avec la FN, ce qui prouve leur efficacité et l'impact qu'elles ont sur le comportement de E.coli. Nous avons donc démontré dans ce travail de thèse l'influence des propriétés de surfaces sur la croissance de cellules vivantes telles que les cellules souches ou les bactéries.

Mots-clés : Cellules souches Mésoenchymateuses - Mécanotransduction – Différenciation - Chimie contrôlée – Géométrie contrôlée – souche E.coli – Adhésion.

Assemblies and studies of the cellular differentiation of stem cells on controlled geometry and chemistry surfaces

Abstract

The cell responds to the physical constraints exerted by its environment by a set of mechanisms grouped under the term of mechanotransduction. These processes involve the molecules involved in cell adhesion, the cytoskeleton and the nucleus. These environmental constraints, whether related to the rigidity of the support, to its topography or to the nature of its surface chemistry, will modulate the cellular morphology and impact the behavior of the cell. In order to study this influence of the support, we have seeded bone marrow mesenchymal stem cells from a primary culture on virgin mica surfaces or functionalized homogeneously with natural molecules (fibronectin and the cyclic RGD peptide) or with polyelectrolyte multilayers (five cycles of Chitosan/PAA or Chitosan/PSS). We then studied the morphology, proliferation and differentiation of these cells after 12 days of culture. As a result, bone marrow mesenchymal stem cells adhere to all surfaces, whether treated or not, and although they are less spread on virgin surfaces, they adopt a fibroblastic type morphology similar to their physiological phenotype. Their percentage of confluence varies significantly depending on the surface treatment used. Indeed the maximum confluence was observed for the surfaces grafted with fibronectin ($93.25 \pm 2.75\%$) whereas the surfaces treated with the polyelectrolyte multilayers have much lower confluence percentages ($61.00 \pm 4.08\%$ for the chitosan/PAA couple) and $54.75 \pm 1.75\%$ for the Chitosan/PSS couple), mainly due to cell latency at the beginning of culture. Finally, cells cultured on our surfaces do not respond to any of the three Oil Red O, Alcian Blue or Alizarin Red S stains, suggesting a lack of differentiation in the adipogenic, chondrogenic or osteogenic pathways induced by these surfaces. Thus, the control of the support chemistry alone does not allow control of cell differentiation. This study paves the way for the next step in which the influence of controlled chemistry and geometry media will be studied.

Similarly, the *E. coli* strain (pathogenic bacterium) responds to the physical and chemical constraints imposed on it. These constraints, whether related to the topography or the nature of surface chemistry, involve natural molecules involved in the behavior of bacteria and their morphology, in particular their size. To study this impact, we contacted *E. coli* strain E2146 with virgin mica surfaces or treated homogeneously or patterned with natural molecules (fibronectin and cyclic RGD peptide). Then we studied the recovery rate and the size of the bacteria. As a result, the bacteria adhere to all surfaces although adhesion is less on virgin

mica surfaces. Their recovery rate varies significantly for a given area. Indeed, the recovery rate and the maximum size are observed on patterned surfaces grafted with fibronectin which proves their effectiveness and the impact they have on the behavior of *E. coli*. We have therefore demonstrated in this thesis the influence of surface properties on the growth of living cells such as stem cells or bacteria.

Keywords: Mesenchymal stem cells - Mechanotransduction - Differentiation - Controlled chemistry - Controlled geometry - *E.coli* strain – Adhesion.