N° d'ordre : **2006-44** Année 2006

THESE EN CO-TUTELLE

entre l'Ecole Centrale de Lyon
et l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir

présentée devant

Ecole Centrale de Lyon

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE CENTRALE DE LYON
ET DE L'INSTITUT SUPERIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE MONASTIR

soutenue publiquement le 13 Décembre 2006

par

Madame Amira BOUAFSOUN épouse LTAIEF

TITRE :

CARACTERISATION ET QUANTIFICATION DE L'ADHESION DES CELLULES ENDOTHELIALES A DES BIOMATERIAUX FONCTIONNALISES

devant le Jury composé de:

Présidente :	Laurence PONSONNET Professeur, Université de Rouen
Rapporteurs :	Véronique MIGONNEY Professeur, Université Paris 13
	Hafedh Ben OUADA Professeur, Faculté des Sciences de Monastir
Directeurs de thèse :	Nicole JAFFREZIC-RENAULT Directeur de Recherche CNRS
	Abdelhamid KERKENI Professeur, Faculté de Medecine de Monastir
	Ali OTHMANE Maître de Conférences, Faculté de Medecine de Monastir

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Centre de Génie Electrique de Lyon (CEGELY), sous la direction de Madame *Nicole JAFFREZIC-RENAULT*, Directeur de Recherche au CNRS et au Laboratoire de Biophysique à la Faculté de Médecine de Monastir, sous la direction de Monsieur *Abdelhamid KERKENI*, Professeur à la Faculté de Médecine de Monastir.

J'exprime toute ma gratitude à Madame *Nicole JAFFREZIC-RENAULT* et à Monsieur *Abdelhamid KERKENI*, pour m'avoir confié ce travail et accordé toute leurs confiance pour sa réalisation. Je leur suis très reconnaissante pour leurs encouragements constants, leurs conseils avisés, leurs critiques constructives durant tout le déroulement de ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus vifs à Madame *Laurence PONSONNET*, Professeur à l'Université de Rouen et à Monsieur *Ali OTHMANE*, Maître de Conférence à la Faculté de Médecine de Monastir, pour leur encadrement, leur confiance, leur aide et leurs encouragements qu'ils n'ont pas cessé de me prodiguer tout au long de ce travail. Leurs qualités humaines, leur modestie, leurs disponibilités et leurs conseils judicieux, m'ont beaucoup impressionnée et ont permis la réalisation de ce travail dans un cadre passionnant, chaleureux et agréable.

Je remercie également Madame *Véronique MIGONNEY*, Professeur des Universités, Université Paris 3, pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail et pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de rapporter sur ce travail de thèse.

Je tiens à adresser mes vifs remerciements à Monsieur *Hafedh Ben OUADA*, Professeur à la Faculté des Sciences de Monastir, pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'être rapporteur de ma thèse.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance envers Monsieur *Jacques DUFAUX*, Professeur à la Faculté Denis Diderot à Paris, Monsieur *Jean-Louis CONNORD* et Monsieur *Alain RICHERT* pour leur aide et leur collaboration.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance envers Madame *Annie-France PRIGENT*, Professeur au Laboratoire de Physiopathologie des Lipides et des Membranes, INSERM 585, INSA de Lyon, pour sa confiance et son aide. Qu'elle trouve ici l'expression de mon entière considération et ma profonde gratitude pour son soutien et son accueil chaleureux.

Il m'est très agréable de remercier Monsieur *Hassen BECHIKH*, Professeur à la Faculté de Médecine de Monastir, qui avec un grand dévouement m'a beaucoup aidé.

Avec beaucoup d'égard, je ne manquerais pas de remercier Madame *Monique LACROIX*, Ingénieur au Laboratoire de CEGELY et Monsieur *Olivier THOUMINE*, pour sa collaboration.

Je tiens à remercier tous les personnels du Centre de Génie Electrique de Lyon et le Département de Biophysique à la Faculté de Médecine de Monastir.

Je voudrais remercier tous mes ami(e)s : *Saloua, Yanxia, Mohsen, Mouna, Lotfi, Besma, Saida, Caroline, Tuen, Rita, Jean-Louis, Laurent, Massoud, Bibi et Josianne*, pour la bonne ambiance et pour la gentilleuse dont ils ont fait preuve tout au long de ce travail. J'en garderai des souvenirs délicieux…

Enfin, je remercie la *Région Rhône-Alpes*, pour l'aide financière qu'elle m'a attribuée pour réaliser ce travail de thèse.

Amira BOUAFSOUN

Dédicace

A mes parents
Ahmed et Faouzia
Artisans de Ma Réussite

A Mes Très Adorables Frères
Hamdi et Faouzi

A Ma Très Chère Sœur
Souad

Au couple merveilleux Malek &Saleh et leur adorable fille Tesnim

A ma Chère Salha

A mes chères amies et amis

A mon cher Adnen....

A tous ceux que je n'ai pas mentionnés et qui ont contribué de près ou de loin à être ce que je suis.

Amira Bouafsoun

Quelquefois, au milieu d'une bataille qui semble interminable, le guerrier a une idée subite et parvient à vaincre en quelques secondes. Alors il pense: "Pourquoi ai-je souffert aussi longtemps dans un combat que je pouvais régler avec moitié moins d'énergie que je n'en ai dépensé ?" En réalité, tout problème, une fois qu'il est résolu, paraît très simple. La grande victoire, qui aujourd'hui semble facile, est le résultat d'une série de petits succès qui sont passés inaperçus. Alors le guerrier comprend, et il dort tranquille. Loin de se culpabiliser d'avoir mis si longtemps à arriver là où il voulait, il se réjouit de savoir qu'il est enfin arrivé.

Paulo Coelho (Manuel du Guerrier de la Lumière)

Table des matières

Introduction.....6

Chapitre I : GENERALITES

I- L'endothélium : composition, structure et rôle…….....10
I-1 Morphologie de la cellule endothéliale……...11
I-2 Fonctions de la cellule endothéliale…..……..11
I-3 Réponse de la cellule endothéliale aux différents types de stress…….....13
I-3-1 Réponse de la cellule endothéliale au stress mécanique…….....13
✍Modifications morphologiques……..14
✍Modifications fonctionnelles…..……...14
✍Transduction……..15
I-3-2 Réponse de la cellule endothéliale au stress oxydant…….....15
I-3-3 Réponse de la cellule endothéliale au stress électrique…….....16
II – Adhésion des cellules endothéliales aux substrats…….....17
II-1 Adhésion spécifique…….....18
II-1-1 Principe…….....18
a- Les molécules d'adhésion…….....18
b- Mécanisme d'action des molécules d'adhésion…….....20
II-1-2 Mécanisme de l'adhésion spécifique…….....20
a- Migration cellulaire vers le substrat……...20
b- Formation des liaisons…….....21
c- Consolidation des liaisons……22
d- Sites d'adhésion……...23
II-2 Adhésion non spécifique……....25
II-2-1 Principe……...25
II-2-2 Approche physico-chimique……..26
II-2-2. a La théorie DLVO……....26
II-2-2. b Approche thermodynamique……..27
II-2-3- Approche biologique……28
II-3 Régulation de l'adhésion et du pelage……...28
II-3-1 Régulation de l'adhésion……....29
II-3-2 Régulation de la déadhésion ou pelage…….....30
II-4 Rôle des propriétés du substrat……..31
II-4-1 Caractéristiques physico-chimiques…….....31
II-4-2 Caractéristiques morphologiques……...31
- Surface rugueuse……32
II-4-3 Fonctionnalisation de la surface du substrat…….....32
II-4-3a Notion de surface.....32
II-4-3b Nettoyage de susbtrat.....32
II-4-3c Greffage de l'OTS.....33
II-4-3d Adsorption du Polystyrène.....34
II-4-3e Adsorption des protèines.....35
III- Méthodes de quantification de l'adhésion : cellule-substrat…….....39
III- 1 Appareils à disque tournant……....40
III-2 Viscosimètre «cône-plan» ……...40

III-3 Techniques hydrodynamiques…… 40
III-3-1 Chambre à flux……..40
III-3-2 Micropipettes……....41
III-4 Microscopie à force atomique……...41
III-5 Techniques de mouillabilité……..42
III-6-1 Mesure de l'angle de contact en statique…….....43
III-6-1-1 La goutte posée…….....43
III-6-1-2 La bulle captive……..43
III-6-2 Mesure de l'angle de contact en dynamique …….....43
VI- Conclusion……..44

Chapitre II : METHODOLOGIES

I- Caractérisations du substrat…….....55
I-1 Préparation et étude des propriétés physico-chimiques des surfaces abiotiques…….....55
I-1-1 Substrat en verre…….....55
a- Nettoyage de verre…….....55
b- Etude physico-chimique……...55
c- Etude morphologique par AFM…….....56
I-1-2 Substrat d'or…….58
a- Nettoyage de l'or…….....58
b- Etude physico-chimique……...59
c- Etude morphologique……....59
II- Fonctionnalisation du substrat ……....60
II-1 Greffage de l'OTS……..62
II-2 Greffage de thiol……63
II-3 Adsorption du polystyrène (Physiosorption) …….....63
II-4 Adsorption des protéines d'adhésion…….....63
II-4-1 La fibronectine …….....63
II-4-2 Le collagène……65
II-4-3 L'héparine…….....66
II-4-4 L'immunoglobuline G……....67
II-4-5 L'albumine……..69
III-Contrôle de la fonctionnalisation du substrat…….....70
III-1 Mesure d'angle de contact par la méthode de la goutte posée…….....70
III-1-1 Principe de la méthode de la goutte posée.....70
III-1-2 Description de l'appareillage utilisé.....74
III-2 Mesure d'angle de contact par la méthode de la bulle captive…….....75
III-3 Mesure d'angle de contact par la méthode du tensiomètre…….....76
III-3-1 Principe de la méthode du tensiomètre.....76
III-3-2 Description de l'appareillage utilisé.....78
IV- Culture cellulaire……80
IV-1 Culture des cellules endothéliales……....80
IV-2 La prolifération cellulaire : Test de viabilité et de cytotoxicité cellulaire…….....81
V- Elaboration de techniques hydrodynamiques…….....83
V-1 Chambre d'écoulement à plaques parallèles…….....83
V-1-1 Caractérisation théorique de l'écoulement.....83
V-1-2 Dispositif expérimental.....85
V-1-3 Quantification de la force d'adhésion des cellules endothéliales au substrat.....86
V-2 Jet vertical…….....87
V-2-1 Caractérisation théorique de l'écoulement.....87

V-2-2 Dispositif expérimental.....89
VI- Microscopie à immunofluorescence……...90
VI-1 Marquage de cytosquelette : filaments d'actine…….....90
VI-2 Marquage de noyaux…….....91
VII- Techniques de mesures électriques…….....92
VII-1 Impédance électrique……...92
VII-1-1 Théorie…….....92
VII-1-2 Description de la cellule électrochimique……....94
VII-1-3 Caractérisation par spectroscopie d'impédance…….....95
VII-2 Voltamétrie cyclique……...96
VIII- Conclusion…….....98

Chapitre III: Résultats et discussion :1ère partie : *Caractérisation du substrat*

I- Caractérisation physico-chimique du substrat…….....104
I- 1 Etude comparative de différentes techniques d'évaluation de la mouillabilité : La goutte posée, la bulle captive et le tensiomètre.....104
I-2 Résulats.....105
I-3 Discussion.....111
I-3.1 Etude de la mouillabilité du Verre/Octadécyltrichlorosilane/Polystyrène.....111
I-3.2 Etude de la mouillabilité de différentes protéines.....112
II- Etude de la morphologie de la surface.....113
II-1 Paramètres conventionnels de mesure de la rugosité.....113
II-2 Topographie du verre fonctionnalisé…….....114
II-3 Topographie de l'or fonctionnalisé…….....117
III- Caractérisations électriques des substrats…….....120
III-1 Etude par voltamétrie cyclique…….....120
III-1-1 Description de la bioactivation de l'électrode d'or…….....121
III-1-2 Caractérisation de l'électrode d'or fonctionnalisée…….....122
III-2 Etude par spectroscopie d'impédance…….....123
III-2-1 Interface Métal-Electrolyte……..123
III-2-2 Détermination du taux de couverture…….....124
III-2-3 Circuit de Randels……...125
III-2-4 Analyse de spectres d'impédance de l'électrode d'or biactivée par le thiol et le polystyrène……..126
III-2-5 Analyse de spectres d'impédance de Au/thiol/polystyrène/protéine…….....127
III-2-5-1 Au/thiol/polystyrène/fibronectine…….....127
III-2-5-2 Etude comparative des spectres d'impédance de Au/thiol/polystyrène/protéines……129

Chapitre IV : Résultats et discussion : 2ème partie : *Interaction cellule Endothéliale -Substrat*

I- Viabilité des cellules endothéliales sur les substrats…….....134
I-1 La croissance cellulaire…… 134
I-2 Etude colorimétrique : Test MTT…….....135
I-3 Observation par microscopie inversée…….....137
II- Evaluation de l'adhésion des cellules endothéliales au substrat…….....137

II-1 la chambre à flux……..137
II-1-1 Etude comparative entre la réponse cellulaire sur la fibronectine et celle sur le collagène.....137
II-1-2 Effet du flux sur la morphologie cellulaire et sur la force d'adhérence.....141
II-1-3 Discussions…….....145
II-1-3-1 Réponse cellulaire…….....145
II-1-3-2 Analyse comparative de l'adhésion cellulaire à la fibronectine ou au collagène…..148
II-2 Jet vertical : Résultats et discussions……149
II-3 Etude comparative entre les deux techniques d'évaluation de la force d'adhésion de la cellule au substrat : la chambre à flux laminaire et le jet vertical…….....152
II-4 Adhésion cellulaire sur différentes protéines …….....153
II-4-1 Comptage des noyaux.....153
II-4-2 Caractérisation par microscopie à immunofluorescence.....153
III- Etude électrochimique de l'adhésion…….....155
III-1 Analyse des spectres d'impédance des cellules en confluence sur la fibronectine…....155
III-2 Impédance des cellules endothéliales en confluence sur le substrat bioactivé par les protéines.....157
III- 3 Effet de la toxine sur le processus d'adhésion cellulaire.....159
III-3-1 Le lipopolysaccharide LPS…….....159
III-3-2 Effet de la toxine sur l'impédance de la cellule endothéliale.....160
IV- Corrélation Energie de surface - Adhésion…….....162
V- Corrélation rugosité - Adhésion…….....165
VI- Corrélation Charge- Adhésion…….....167

Conclusion générale . . . .

. 174

Annexes . . . .

. 179

Introduction

Introduction

L'augmentation de notre espérance de vie et le souhait légitime de la qualité de notre vie face aux maladies cardiovasculaires font appel à l'élaboration de biomatériaux hémocompatibles. L'un des enjeux actuels consiste à fonctionnaliser des matériaux par des ligands bioadhésifs susceptibles d'améliorer l'adhésion cellulaire cellule-cellule et cellule-substrat.

L'augmentation de l'affinité entre le biomatériau et les cellules de l'endothélium est la stratégie de ce secteur de recherche. Par ailleurs, les biomatériaux doivent répondre à plusieurs critères comme la fiabilité dans les milieux biologiques, l'absence d'effet toxique et immunologique, l'aptitude à la stérilisation, la conservation des équilibres osmotiques et acido-basiques du sang et l'inhibition des compléments de l'hémostase.

De fait, l'hémocompatibilité qui résume ces propriétés dépend d'une interaction dynamique entre une surface artificielle (nature physique de l'interface et structure chimique du biomatériau) et d'un équilibre physico-chimique instable du sang ainsi que des conditions rhéologiques d'écoulement (conception de prothèse, conditions hémodynamiques). Ainsi la nature chimique superficielle du biomatériau impose la nature des interactions entre les protéines, les cellules et la surface. En outre, aucun des biomatériaux à usage vasculaire actuel ne possède les propriétés de thrombo-résistance de l'endothélium. Pour éviter à long terme l'occlusion des prothèses vasculaires, un des axes de la recherche actuelle consiste à couvrir la prothèse d'une monocouche endothéliale. Ce concept correspond à la création d'organes bio-artificiels. C'est dans ce contexte général que se situe le sujet de la thèse.

L'objectif de ce travail est l'étude de l'adhésion de la cellule endothéliale à un biomatériau. Nous nous intéressons au processus de bioadhérence faisant intervenir des cellules et un matériau. Ce processus complexe correspond en réalité à l'étude des interactions matériau/protéines/cellules. La diversité des acteurs impliqués matériau/protéines/cellules et les différents types d'interactions - spécifiques ou non spécifiques - qui peuvent avoir lieu compliquent encore l'étude de ce processus. Le recours aux deux approches complémentaires, physico-chimie et biologie, est essentiel pour cerner les différents aspects du problème et mieux appréhender les mécanismes qui ont lieu aux interfaces.

Le travail présenté dans ce mémoire s'articule autour de quatre chapitres :

Le premier chapitre permet de situer le contexte de cette étude, la problématique de l'adhérence cellule -substrat et les différentes voies d'approche.

Le chapitre II rapporte les techniques de mesure utilisées. Pour caractériser les propriétés physicochimiques de la surface abiotique avant et après fonctionnalisation et pour corréler ces propriétés avec l'énergie d'adhésion des cellules sur ces matériaux, une adaptation de certaines techniques de mesure est nécessaire. Le détail des deux techniques, la mesure d'angle de contact (mouillabilité) et la microscopie à force atomique, est illustré dans les méthodologies. La technique de la spectroscopie d'impédance dévoile les propriétés électriques de la surface fonctionnalisée. La mesure de la force d'adhésion cellule endothéliale- substrat est effectuée par le biais de deux techniques qui sont la chambre à flux laminaire et le jet vertical. La morphologie cellulaire est mise en évidence par microscopie à immunofluorescence.

Les résultats obtenus dans ce travail sont analysés dans les chapitres III et IV. La mouillabilité et la microscopie à force atomique caractérisent l'état de surface en apportant des informations sur la topographie, l'hétérogénéité chimique, la déformation, le gonflement, la réorientation et la mobilité de la surface, l'énergie de surface et ses composantes (caractère donneur/accepteur d'électrons). Les mesures de la force d'adhésion cellule -substrat à l'aide des deux techniques, de la chambre à flux laminaire et du jet vertical, sont appliquées à une cellule isolée et à une monocouche confluente de cellules endothéliales respectivement. L'évaluation de la réponse des cellules endothéliales a été qualitative par des mesures de variations morphologiques : élongation, alignement, réorientation selon la direction du flux et formation de pseudopodes. Elle a été également quantitative par détermination de la force d'adhésion cellulaire, le taux de détachement, l'indice d'élongation ou le facteur de forme, le module d'élasticité et le coefficient d'efficacité de détachement cellulaire. Notre approche consiste à corréler les valeurs de ces paramètres à celles obtenues par impédance électrochimique du biosystème. En effet, grâce à l'utilisation de circuits électriques équivalents, il est possible de modéliser les propriétés électriques (résistance et capacité en parallèle) de chacune des composantes du système, à savoir : le substrat avec ses connexions électriques dans le milieu de mesure; l'interface représentée par la couche de fonctionnalisation recouverte de composants du milieu de culture adsorbées et de la matrice extracellulaire ; les cellules. Ces différentes propriétés électriques sont liées au processus d'adhésion des cellules sur le substrat. Les mesures électriques ont été couplées à un agent pro oxydant (le lipopolysaccharide). D'autre part, un test d'adhésion est réalisé par le marquage et le comptage des noyaux fluorescents des cellules endothéliales ensemencées sur des substrats activés par différentes protéines d'adhésion (fibronectine, collagène, héparine, albumine, et immunoglobuline G). Le marquage du cytosquelette et surtout des fibres d'actine a été utilisé

pour visualiser l'apparition des fibres de stress sur certaines protéines. Un test de cytotoxicité a permis de quantifier la viabilité des cellules endothéliales sur ces différents substrats.

Nous présentons les conclusions principales de ce travail et nous proposons en perspectives quelques pistes pour le développement des biocapteurs cellulaires impédimétriques pour la détection des toxines.

CHAPITRE I

GENERALITES

I- L'endothélium : composition, structure et rôle

Le vaisseau sanguin possède une paroi qui se déforme non seulement passivement sous l'effet de la pression transmurale mais aussi par contraction-relaxation des cellules musculaires de sa paroi. Les propriétés rhéologiques de la paroi vasculaire (viscoélasticité, non-linéarité, anisotropie) reflètent une structure pariétale complexe.

La paroi vasculaire est, en effet, constituée de trois couches (intima, média, adventice). Les composantes de ces couches sont au nombre de quatre : endothélium, élastine, fibres musculaires, collagène. La proportion de chaque composante diffère d'un vaisseau à l'autre. Elle est plutôt liée à la fonction du conduit considéré.

L'endothélium tapisse la couche la plus interne dite intima de la veine. Cette dernière est entourée par la média, la tunique moyenne constituée de cellules musculaires lisses empilées en unités lamellaires. La couche la plus externe dite l'adventice est formée d'un tissu conjonctif riche en collagène et en fibres élastiques. Elle est irriguée par des réserves nourricières appelées vasavasorum (voir le modèle d'organisation de la paroi d'une veine : figure I.1 [1]).

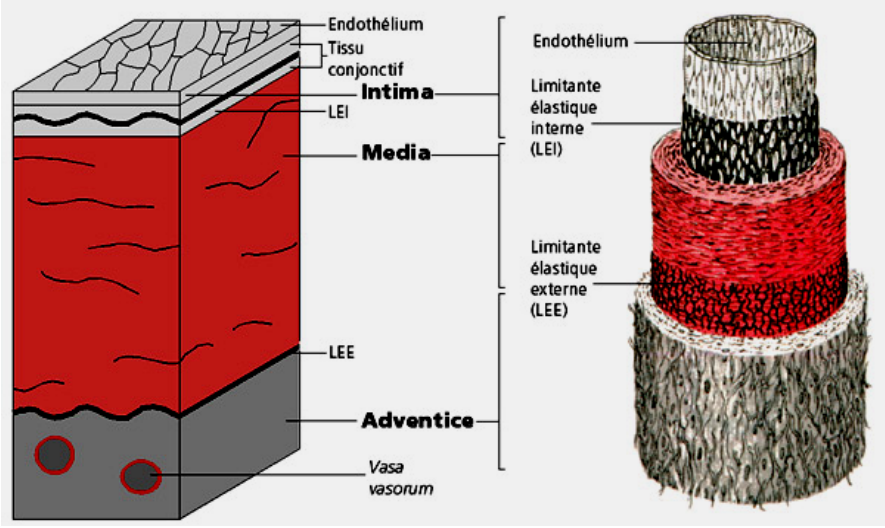


Figure I.1: Modèle d'organisation de la paroi d'une veine [1]

La complexité de l'endothélium vasculaire est accrue par sa grande hétérogénéité, se manifestant à la fois par une variabilité morphologique et par une spécialisation fonctionnelle et résultant de la localisation de ces cellules le long de l'arbre vasculaire.

I-1 Morphologie de la cellule endothéliale

Afin d'élucider l'influence des conditions hémodynamiques sur le comportement des cellules endothéliales, il est indispensable de citer leurs caractéristiques morphologiques.

Avec noyaux et aspect fusiforme, les cellules endothéliales vasculaires forment une couche monocellulaire sur tous les vaisseaux de la circulation sanguine, dont le poids total est estimé à 1.5 Kg. Ces cellules acquièrent des propriétés spécifiques selon le territoire anatomique. Chaque cellule a entre 5 et 15µm de longueur et 1 à 2 µm de diamètre [2].

Pour une cellule endothéliale, on distingue 2 pôles : un pôle luminal face au sang qui contient des charges négatives réparties de façon homogène et un autre pôle abluminal qui repose sur la membrane basale. La membrane plasmique est constituée par de nombreuses vésicules appelées vésicules plasmalemmales. Ces dernières ne sont ni chargées ni recouvertes de clathrine.

Elles possèdent des récepteurs de nature glycoprotéine de type lectines rattachés à un réseau fibrillaire d'actine et de fibrine. Cette structure morphologique est adaptée aux différentes fonctions de la cellule endothéliale.

I-2 Fonctions de la cellule endothéliale

Les cellules endothéliales vasculaires participent activement à la régulation de tous les aspects de l'hémostase vasculaire. Les grandes propriétés des cellules endothéliales passent par la production de nombreux médiateurs régulés par différents facteurs humoraux. Ces derniers modulent leur capacité de synthèse et leur confèrent ainsi un phénotype variable selon que les cellules sont au repos ou stimulées. Globalement, l'activation de ces cellules aboutit à leur dysrégulation et les amène à un état fonctionnellement inadapté. Ayant perdu leurs capacités à ajuster leurs fonctions constitutives dans les limites physiologiques, les cellules endothéliales activées seraient impliquées dans plusieurs pathologies (athérosclérose, maladies cardiovasculaires, diabète,…). Ainsi on peut citer très brièvement l'ensemble des fonctions spécifiques de la cellule endothéliale qui oscille entre un phénotype antiathérogène et un phénotype proathérogène [3].

- *Perméabilité sélective*

La cellule endothéliale assure la régulation des échanges convectifs entre le plasma et le liquide interstitiel assurant la stabilité du volume plasmatique. Elle participe aussi dans la

production des éléments de la matrice extracellulaire et la formation de la membrane basale. Sa perméabilité est dépendante de plusieurs facteurs : histamine, sérotonine…

- *Processus de l'hémostase*

La cellule endothéliale constitue l'un des éléments essentiels de la régulation du système hémostatique puisqu'elle peut développer des propriétés anti ou prothrombogéniques. Elle intervient dans l'agrégation plaquettaire, la coagulation et la fibrinolyse.

- *Processus inflammatoires*

La perméabilité endothéliale au niveau des petites veinules est due à l'élargissement des jonctions intercellulaires. Par ailleurs, exposées en permanence aux signaux environnementaux et aux facteurs humoraux, les cellules endothéliales participent activement aux réponses immunitaires et inflammatoires [4].

Par l'intermédiaire de programmes fonctionnels, elles modifient l'expression de leurs antigènes de surface. En outre, elles expriment des molécules d'adhésion [5,6] et secrètent des médiateurs lipidiques [7].

- *Synthèse de composants du stroma*

Les cellules endothéliales synthétisent les composants de leur lame basale et du stroma environnant (protéines de la matrice extracellulaire et protéoglycannes (PG)), ainsi que des collagénases et protéases. Elles ont donc la capacité non seulement de produire, mais aussi de remodeler les éléments de leur stroma [8].

- *Phénomènes de réparation tissulaire et d'angiogénèse*

L'angiogénèse est un processus qui peut être physiologique (prolifération de l'endomètre, formation de la circulation placentaire) ou pathologique (néoplasme et conflit immunologique). Ce dernier fait intervenir la migration, la différenciation et la prolifération des cellules endothéliales sous le contrôle de facteurs de croissance de molécules de la matrice extracellulaire [9].

- *Interaction avec les lipoprotéines plasmatiques*

En raison de leur position anatomique stratégique entre le courant circulatoire et les tissus, les cellules endothéliales interagissent avec les différentes classes de lipoprotéines selon trois modalités : En effet, elles participent à leur métabolisme plasmatique [10]. Elles régulent leur transport entre le sang circulant et l'espace sous-endothélial. Elles modifient les lipoprotéines de faible densité [11].

- *Fonction de macrophage*

Les cellules endothéliales sécrètent des cytokines et des facteurs de croissance. Elles ont une activité vis-à-vis des phagocytes. En fait, elles peuvent exprimer des antigènes du système majeur d'histocompatibilité de la classe II après une stimulation par l'interféron γ [12].

- *Fonction de contrôle du tonus musculaire lisse des vaisseaux*

Les cellules endothéliales contribuent à la régulation du tonus vasculaire. Elles règlent la contraction des cellules musculaires lisses (CML) sous jacentes [13] par la production de substances vasorelaxantes (la prostacycline PGI2 et le monoxyde d'azote [14-16] et vasoconstrictrices (endothéline-1(Et1) [17] et thromboxane (TXA2)) [18].

- *Synthèse de médiateurs*

La cellule endothéliale peut être excitée par plusieurs cytokines comme TNFα [19-22], l'homocystéine [23-26] la lysophosphatidylcholine LPC [27] et les lipopolysaccharides LPS [28]. Ces cytokines favorisent la synthèse des molécules d'adhésion.

I-3 Réponse de la cellule endothéliale aux différents types de stress

I-3-1 Réponse de la cellule endothéliale au stress mécanique

Plusieurs équipes ont étudié l'effet des contraintes sur le fonctionnement des cellules de la paroi artérielle. Ces contraintes sont générées par le fluide en écoulement dans la lumière du vaisseau et par la déformation du conduit. La contrainte de cisaillement influe sur le métabolisme, la morphologie et la fonction de la cellule endothéliale. La transduction du signal mécanique en signal biologique est actuellement admise [29]. Il reste à identifier les mécanismes qui conduisent des stimuli mécaniques à une réponse de la cellule endothéliale. Cette réponse peut être une modification de la morphologie, de la fonction et/ou du métabolisme cellulaire. En effet, la réponse de cette dernière se manifeste par son orientation dans le sens de l'écoulement liée à une réorganisation de son cytosquelette.

S'agit-il d'une activation mécanique des canaux ioniques, du contrôle du transport moléculaire par la contrainte de cisaillement? Existe-t-il des capteurs de déformation dans la paroi, des récepteurs membranaires sensibles au cisaillement ? [30].

Si les auteurs s'accordent sur la relation entre la nature ainsi que la durée de l'écoulement et la réponse de la cellule endothéliale, les résultats sont loin d'être unanimes [31]. La réponse de la cellule endothéliale vis à vis d'une contrainte dépend de deux paramètres : le type d'écoulement et le temps d'exposition [32].

- *Ecoulement laminaire*

Avec des contraintes de cisaillement variant de 5 à 12 dynes/cm^2, un flux laminaire imposé à une culture de cellules endothéliales induit une surrégulation directe et sélective de la synthèse des molécules d'adhésion ICAM-1 [33-39].

Dans des conditions d'écoulement laminaire, on a montré une augmentation de l'activité de la protéine kinase C qui intervient dans la synthèse des ICAM-1. D'autres chercheurs suggèrent que l'exposition des cellules endothéliales à un stress mécanique laminaire (7 dynes/cm^2) réduit l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1. L'organisation de l'actine filamenteuse dans le cytosquelette est influencée par le flux laminaire. Cette actine aurait le même site d'ancrage, l'actinine, que les molécules d'adhésion ICAM-1. L'actinine, protéine cytosolique, est liée au domaine intra cytoplasmique de la molécule ICAM-1 [37, 10].

- *Ecoulement turbulent :*

Les cellules endothéliales, soumises à un écoulement turbulent pendant 15 heures à 8.5 dynes/cm^2, ne présentent ni de variations d'expression des ICAM-1 ni des sélectines E. Par contre, au bout de trois heures soumises à une contrainte de cisaillement variant de 1.5 à 15 dynes/cm^2, l'écoulement turbulent provoque, dans une mono-couche de cellules endothéliales, une inhibition de contact et un engagement dans le cycle cellulaire.

- *Ecoulement pulsatile :*

Il induit la surexpression des molécules d'adhésion comme ICAM-1, VCAM-1 et sélectines E [40-42].

✍ ***Modifications morphologiques***

Les changements morphologiques se traduisent par l'allongement et l'orientation des cellules endothéliales parallèlement à la direction de l'écoulement et la réorganisation des filaments d'actine [43] responsables de la mobilité et de l'adhésion cellulaire et du réarrangement moléculaire [44].

✍ ***Modifications fonctionnelles***

Les changements métaboliques sont extrêmement complexes et dépendants de la contrainte de cisaillement imposée. Les expériences d'écoulement sur un lit de cellules endothéliales en culture ont montré que leurs activités métaboliques et leur taux de prolifération sont modifiés. Leur nombre de mitose augmente à faible cisaillement. La contrainte de cisaillement modifierait également le métabolisme du facteur de croissance et la sécrétion des substances vaso-actives.

Une augmentation de la synthèse de la prostacycline, de l'activateur tissulaire du plasminogène [44], et du monoxyde d'azote (NO) a été notée [45-47].

Plusieurs travaux ont évoqué l'expression génétique, variant en fonction des caractéristiques du flux de proto-oncogènes tels que c-fos, c-jun,…, du NO et des molécules d'adhésion.

Des modifications des transferts ioniques du K^+ et surtout du Ca^{2+} intracellulaire qui représente le messager secondaire le plus important [48, 40] ainsi que l'activation de systèmes enzymatiques tels que les phospholipases C et A2 ont été trouvées [49].

Ces variations métaboliques sont impliquées dans le phénomène de prolifération cellulaire, paramètre qui intervient directement dans les propriétés d'adhésion des cellules endothéliales [50].

➭ ***Transduction***

De nombreux auteurs ont montré qu'une variation morphologique de la cellule endothéliale, induite par un stress mécanique, engendre plusieurs modifications métaboliques. Ces réponses, appelées mécanotransduction, concernent pratiquement tous les mécanismes liés à la croissance et au métabolisme cellulaire. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels les cellules répondent aux contraintes locales sont encore mal connus. Il est par contre reconnu que les canaux ioniques, sensibles à l'étirement de la membrane, l'adénylate cyclase, la protéine kinase C ont une activité modifiée en réponse à un stress mécanique [51,52]. Selon ces auteurs, il semblerait qu'il existe des mécanorécepteurs de surface liés au cytosquelette. Les modifications du cytosquelette, sous l'influence d'une contrainte de cisaillement, conduiraient à des perturbations de l'équilibre cellulaire [53], modifiant l'activité des récepteurs et des canaux trans-membranaires ainsi que, par une relation directe, le mécanisme de régulation de l'expression génique des molécules produites par la cellule endothéliale et intervenant dans ces fonctions, comme l'endothéline-1 (ET-1), l'activateur tissulaire du plasminogène, la production de NO, le PDGF α et β, les facteurs de croissance, la thrombomoduline (TB), les molécules d'adhésion [54,55].

I-3-2 Réponse de la cellule endothéliale au stress oxydant

Le stress oxydant qui est un déséquilibre entre les composés anti- et proxydants, engendre une surproduction de radicaux libres. Ces derniers activent la cellule endothéliale et induisent ainsi plusieurs modifications : perturbation du tonus vasculaire, altération de la perméabilité, production de facteurs chimiotactiques et la surexpression des molécules d'adhésion. Tous ces changements contribuent à la formation d'un endothélium vasculaire proathérogène.

Plusieurs travaux ont montré qu'une production accrue de radicaux libres oxygénés, tels que l'anion superoxyde, le radical hydroxyl et le peroxyde d'hydrogène, induit des lésions de la paroi endothéliale [56]. De Bono et al. [57] ont prouvé qu'une rupture de l'équilibre de stress oxydatif conduit à un changement morphologique de la cellule endothéliale. D'autres espèces radicalaires comme le monoxyde d'azote ou les lipoprotéines oxydés (LDLox) qui donne naissance au peroxynitrite en présence de superoxyde, s'avère aussi très dommageable à la

cellule endothéliale. Plusieurs gènes ont été identifiés lors d'un stress oxydant : MnSOD, métallothionéines, hème oxygénase, HSP 70. Plusieurs systèmes antioxydants sont reconnus comme les vitamines E et C, l'ubiquinone ou les caroténoïdes ou de nature enzymatique comme la superoxyde dismutase.

I-3-3 Réponse de la cellule endothéliale au stress électrique

La cellule est une entité chargée négativement. A une tension de polarisation donnée, la cellule peut exprimer ses propriétés diélectriques capacitives ou résistives détectées par l'impédance électrochimique. L'interface cellule substrat peut être simulée par des circuits équivalents qui ont été proposé par Wegener et al [58] (Voir figure I.2). La résistance et la capacitance peuvent élucider l'information morphologique de la cellule.

Il existe généralement deux types de courants à travers la membrane cellulaire : le courant paracellulaire le long des clés intercellulaires et à travers les jonctions serrées, et le courant transcellulaire à travers la membrane plasmique basale, le cytoplasme et la membrane plasmique apicale. Le modèle diélectrique adapté à la membrane plasmatique est une combinaison entre une résistance et une capacitance dans un intervalle de fréquence de (10-10^5 Hz). La capacitance spécifique de la membrane plasmique cellulaire est de l'ordre de 1µFcm-². Une valeur élevée en capacitance plaide en faveur de l'existence des pseudopodes et d'une surface de contact importante. La résistance de la membrane cellulaire est toujours supérieure à 500 Ω.cm². La résistance est indicatrice de la formation d'une couche confluente cellulaire dépourvue de pores ou de défauts.

Les mesures électriques de l'impédance d'une couche confluente des cellules endothéliales ensemencées sur une électrode, nous permet de caractériser l'interface biologique cellule/substrat. L'apport de cette méthode consiste à éclaircir des informations sur la membrane cellulaire, la résistance des jonctions, la structure de la matrice extracellulaire et la structure de l'interface [59]. Giaever et al. ont étudiés la motilité des cellules épithéliales ensemencées sur un support solide, en temps réel, par le biais de la spectroscopie d'impédance. Un modèle théorique a été proposé pour caractériser l'impédance de l'interface cellule/électrode d'or. Pour une fréquence bien définie, ils analysent les fluctuations de l'impédance dues aux mouvements verticaux des cellules [60-63].

Ehret et al. ont mis en évidence l'utilité des mesures d'impédance sur des micro-électrodes afin de contrôler la concentration, la croissance et l'état physiologique des cellules dans le milieu de culture [64]. Wegner et al. ont étudié l'effet des hormones β-adrénergique sur des cellules endothéliales cultivées sur des films d'or déposés sur des substrats de verre. Ils ont

interprété l'impédance électrique en terme de : (i) la perméabilité ionique de l'espace intercellulaire, (ii) la conductivité à l'interface cellule/substrat [65].

Les propriétés intrinsèques de la cellule endothéliale et les caractéristiques de la surface du biomatériau conditionnent tout processus bioadhésif.

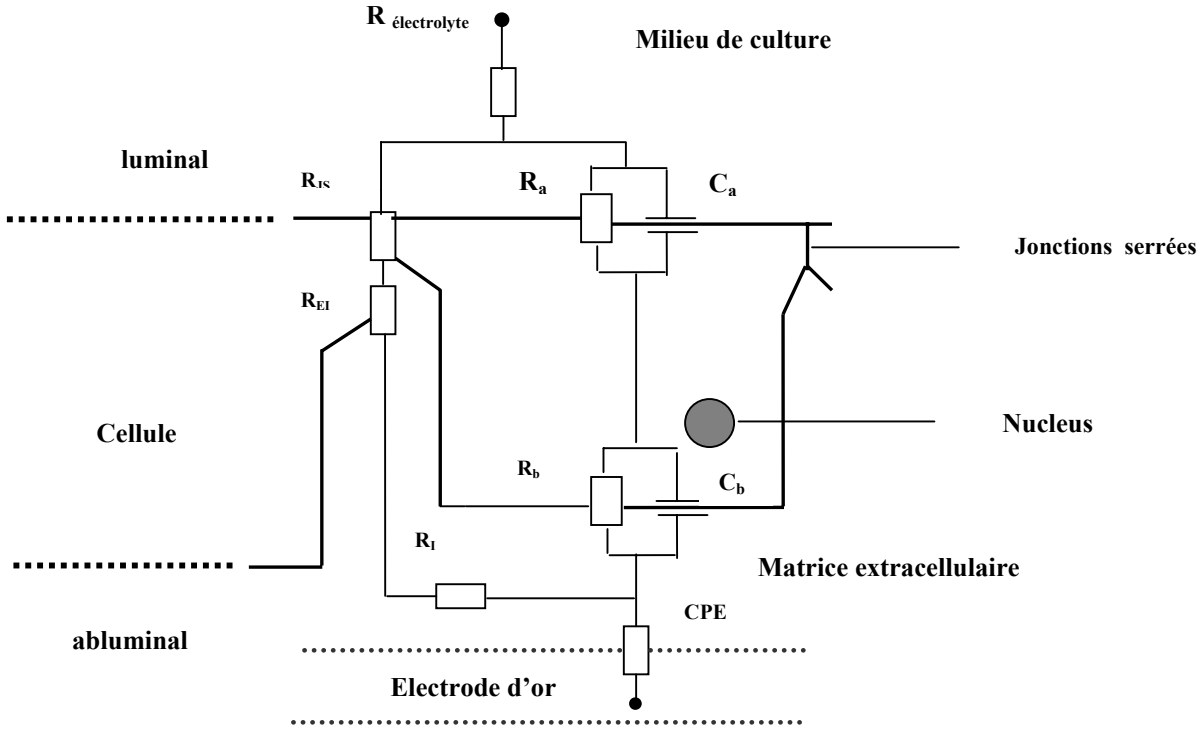


Figure I.2: Représentation schématique du circuit équivalent d'une monocouche confluente et perméable de cellules endothéliales. (R_a, Ca, R_b, C_b la résistance et la capacitance de la membrane cellulaire apicale et basale, R_{JS} Résistance des jonctions serrées, R_{EI} Résistance de l'espace intercellulaire, R_I Résistance de l'interface entre la membrane basale cellulaire et la surface de l'électrode) [58].

II – Adhésion des cellules endothéliales aux substrats

L'adhésion entre deux surfaces, dont une est de nature biologique, est appelée bioadhésion. Nous nous intéresserons tout particulièrement au processus de bioadhérence faisant intervenir des cellules et un matériau. Ce processus complexe correspond en réalité à l'étude des interactions matériau/protéines/cellules. La diversité des acteurs impliqués matériau/protéines/cellules et les différents types d'interactions - spécifiques ou non

spécifiques - qui peuvent avoir lieu compliquent encore l'étude de ce processus. Le recours aux deux approches complémentaires, physico-chimie et biologie, est essentiel pour cerner les différents aspects du problème et mieux appréhender les mécanismes qui ont lieu aux interfaces.

II-1 Adhésion spécifique

II-1-1 Principe

L'adhésion cellulaire repose, en règle générale, sur la mise en jeu d'interactions spécifiques de molécules membranaires spécialisées. En raison du succès rencontré par la théorie "DLVO" dans le domaine de la physico-chimie des particules colloïdales, il était tentant d'essayer d'expliquer l'adhésion cellulaire en termes d'équilibre entre des interactions répulsives (dues à la présence sur la surface cellulaire de macromolécules porteuses d'une forte charge négative) et des interactions attractives (forces de van der Waals). Cependant, si ce cadre théorique s'applique peut-être à quelques modèles d'interaction cellule-matériaux, l'expérience a largement démontré que les phénomènes d'adhésion cellulaire étaient principalement déterminés par des interactions moléculaires spécifiques [66-67]. Par exemple, il suffit de recouvrir une surface de quelques dizaines de molécules de P-sélectine par µm² pour lui permettre de fixer des granulocytes neutrophiles [68]. Si l'on estime à une dizaine de nm² l'aire de contact mise en jeu dans la liaison spécifique de deux macromolécules biologiques [69], il en résulte qu'un dix millième de la surface cellulaire peut suffire à induire une adhésion solide.

Au cours de ces dernières années, les progrès technologiques reposant en particulier sur les techniques de génie génétique et l'utilisation des anticorps monoclonaux ont permis de caractériser plus de cent molécules d'adhésion [70]. Cette découverte illustre d'une part l'importance de l'adhésion en ce qui concerne le fonctionnement cellulaire, d'autre part la diversité caractéristique des systèmes biologiques. Cependant, les données actuelles peuvent être notablement simplifiées si l'on remarque qu'il a été possible de définir un petit nombre de familles de protéines permettant de proposer une classification des molécules d'adhésion.

Nous nous proposons de décrire rapidement trois grandes familles de molécules impliquées dans les phénomènes d'adhésion cellulaire endothéliale.

a) Les molécules d'adhésion

La superfamille des immunoglobulines

La molécule ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule 1), constituée de 5 domaines, apparaît en microscopie électronique comme une baguette d'une longueur de 19 nm, droite ou courbée en un point. Les ligands des éléments de cette classe de molécules appartiennent

souvent à la même superfamille. L'interaction peut être homotypique (c'est-à-dire que la molécule est son propre récepteur) comme c'est le cas pour la molécule PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) que l'on trouve à la jonction des cellules endothéliales, sur les leucocytes et les plaquettes. Il est utile de noter que les molécules de la superfamille des intégrines sont souvent capables de provoquer une activation cellulaire, par exemple par l'intermédiaire de kinases liées à leur partie intracytoplasmique. Le pontage des récepteurs membranaires engendrera ainsi des cascades de réactions chimiques conduisant à la production de seconds messages intracellulaires.

Les intégrines

Il s'agit d'hétérodimères constitués de deux chaînes polypeptidiques, nommées alpha et bêta. On définit souvent des sous-familles d'intégrines comportant une chaîne bêta commune et des chaînes alpha différentes. Par exemple, les intégrines β1 sont souvent des récepteurs des constituants des matrices extracellulaires (collagène, fibronectine, laminine ...). On peut citer le cas particulier de l'intégrine α4β1, exprimée par certaines leucocytes, qui peut fixer VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), une molécule de la superfamille des immunoglobulines apparaissant sur les cellules endothéliales activées par des stimuli inflammatoires. Une caractéristique fondamentale des intégrines est liée à leur régulation : l'activité de ces molécules peut être modulée par des modifications de leur conformation ainsi que par des altérations de leur association à leur environnement (par exemple, association au cytosquelette). De même que les molécules de la superfamille des immunoglobulines, les intégrines engendrent des signaux intracellulaires. En particulier, la survie et la prolifération cellulaires peuvent nécessiter des signaux produits par l'interaction de certaines intégrines avec des constituants des matrices extracellulaires.

Les sélectines

La sélectine E (CD62E) est exprimée par les cellules endothéliales activées. La sélectine P (CD62P) est retrouvée sur les plaquettes et les cellules endothéliales activées.

Le site de reconnaissance a la structure d'une lectine dépendante du calcium (lectine animal de type C). La régulation de l'activité des sélectines repose essentiellement sur celle de leur expression. Ainsi, les cellules endothéliales au repos n'expriment aucune sélectine. Une activation endothéliale, liée à une infection ou à un processus pathologique induisant la génération de cytokines, conduira en quelques minutes à l'expression de P-sélectine conservées dans les granulations de Weibel-Palade. Quelques heures plus tard, les techniques d'immunofluorescence permettront de mettre en évidence l'apparition de sélectine E, néosynthétisée. La simplicité relative de la famille des sélectines se retrouve dans les

fonctions de ces molécules: il semble que celles-ci permettent essentiellement de déclencher la captation initiale des leucocytes sanguins par des cellules endothéliales [71].

b) Mécanisme d'action des molécules d'adhésion

Un modèle de mise en jeu des multiples molécules d'adhésion est l'interaction leucocyte-endothélium au cours des réactions inflammatoires. Nous décrirons brièvement un modèle de grande importance biologique qui illustre la mise en jeu des principales familles de molécules d'adhésion [72]. L'arrivée de ces leucocytes est déclenchée par l'activation des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales activées vont exprimer des molécules de sélectines (E ou P) qui vont interagir avec des sites portés par la région la plus externe des leucocytes circulants. Ces cellules vont être fortement ralenties et "roulent" le long de la surface des cellules endothéliales. Ce phénomène est dû à la formation et à la dissociation rapide d'interactions entre les molécules de sélectine et leur ligand [73]. La seconde étape est déclenchée par l'interaction de substances chimiotactiques associées à la surface endothéliale et de récepteurs leucocytaires. Cette interaction, facilitée par le ralentissement lié au roulement, conduit à une activation des leucocytes dont les intégrines (LFA-1 et/ou MAC-1) vont devenir fonctionnelles. Ces intégrines vont se lier à leur ligand (ICAM-1) sur les cellules endothéliales, et cette interaction va conduire à une adhésion solide [72]. Enfin, les leucocytes ainsi attachés vont se diriger vers les jonctions des cellules endothéliales, et l'on peut penser que les interactions homotypiques des molécules PECAM-1, exprimées à la fois par les leucocytes et les cellules endothéliales, vont permettre la formation d'espaces interendothéliaux dans lesquels vont s'immiscer les leucocytes, afin de migrer vers les tissus périphériques. Il est possible que des signaux transmis aux cellules endothéliales par leurs molécules membranaires de sélectines stimulées par leur interaction avec les leucocytes facilitent cette migration [74].

II-1-2 Mécanisme de l'adhésion spécifique

L'attachement est divisé en trois étapes : approche de deux surfaces, formation d'une première liaison et consolidation de l'attachement. Les deux premières phases se prêtent tout particulièrement à une description biophysique. La dernière étape est beaucoup plus complexe et met en jeu de nombreuses fonctions cellulaires. Une description séquentielle est adoptée.

a) Migration cellulaire vers le substrat

La première étape de l'adhésion est constituée par l'approche de deux surfaces (l'une est biologique, l'autre est abiotique) à une distance compatible avec la formation de liaisons. Il y a aussi bien les interactions attractives que répulsives,

Le déplacement d'une cellule sur une surface [75] repose sur une coordination des processus d'attachement (à l'avant) et de détachement (à l'arrière), comme l'illustre la figure I.3 [76].
D'après la figure I.3, le déplacement d'une cellule sur une surface nécessite un contrôle étroit de l'adhésion, d'une part afin de permettre l'attachement d'un lamellipode, d'autre part, afin de permettre le détachement de la partie postérieure de la cellule au cours de la progression.

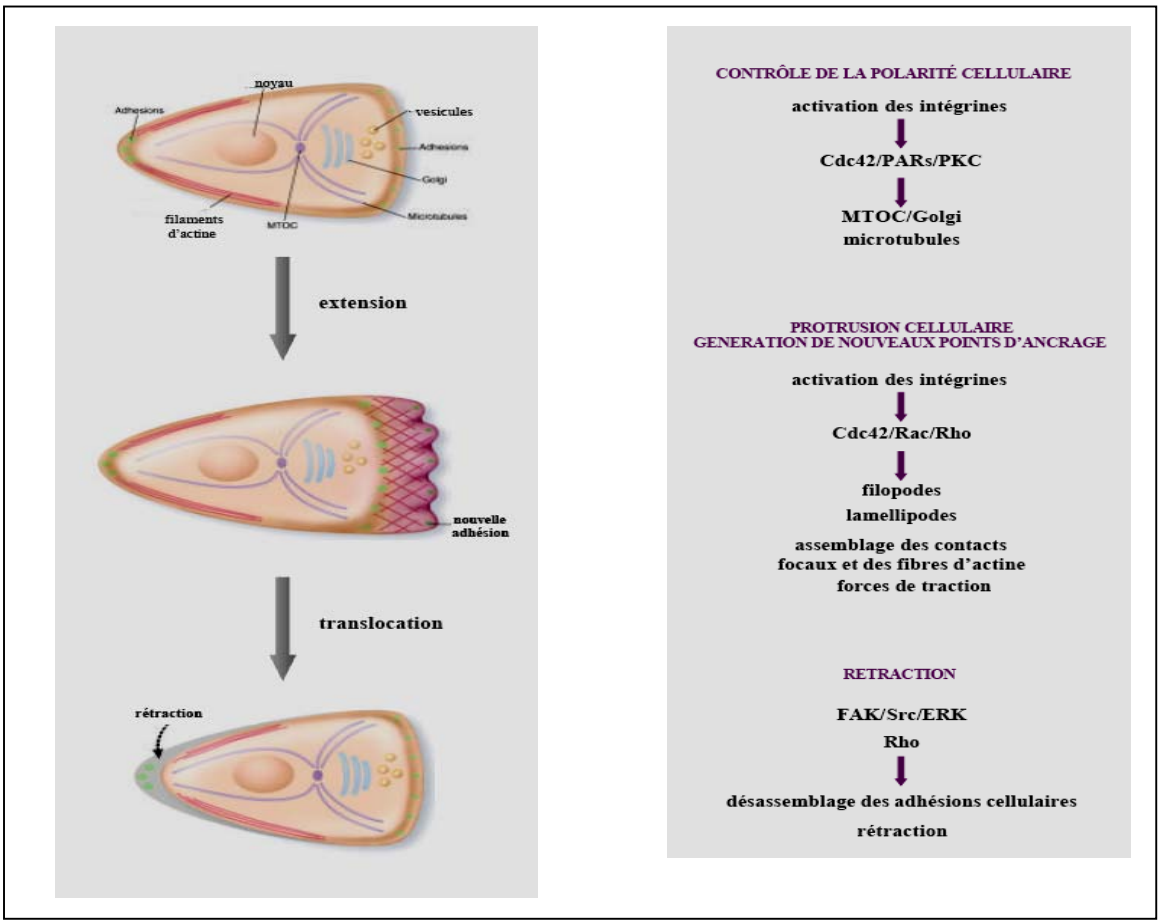


Figure I.3 : Migration d'une cellule sur une surface [76]

b) Formation des liaisons

La formation de la première liaison constitue une étape critique de l'adhésion. Imaginons qu'une première liaison se forme entre deux surfaces exprimant des récepteurs et leurs ligands. La durée de vie de cette interaction dépend en général de la nature de la liaison ainsi que des forces susceptibles d'être exercées par les surfaces. Deux éventualités peuvent se produire :

- la liaison peut se rompre avant d'être renforcée par des interactions supplémentaires. Dans ce cas, les surfaces pourront se séparer, du fait de forces extérieures, d'agitation brownienne ou de la rétraction spontanée d'un lamellipode.

- Au contraire, une seconde liaison peut se former. Dans ces conditions, la durée de vie de l'attachement membranaire se trouvera fortement augmentée, rendant en général hautement probable la formation d'une troisième liaison. Dans la mesure où le nombre de molécules d'adhésion n'est pas limitant, on peut alors prédire que l'attachement se renforcera progressivement, en l'absence de toute participation cellulaire active.

Plusieurs modèles théoriques ont été élaborés pour essayer de prédire l'évolution du nombre des liaisons [77-79]. Cependant, ces modèles reposaient sur des propriétés des molécules d'adhésion qui étaient représentées par des paramètres ajustables que nous citerons rapidement :

a) la première inconnue est la fréquence de formation de liaisons entre des surfaces. Cette grandeur est évidemment proportionnelle à la densité des molécules d'adhésion sur ces surfaces, mais elle dépend aussi des propriétés de diffusion de ces molécules, de leur longueur et de leur flexibilité. Ces deux dernières propriétés conditionnent la dépendance de la fréquence d'adhésion vis-à-vis de la distance des surfaces.

b) la deuxième inconnue est la fréquence de rupture d'une liaison. Il s'agit également d'une variable, puisqu'elle dépend des forces éventuellement exercées sur les surfaces.

La connaissance de ces deux fonctions semble suffisante pour prédire le comportement du système. En particulier, elle devrait permettre de prédire la force exercée par les liaisons sur les membranes, et, par conséquent, l'évolution de la distance des membranes qui vont se retrouver alignées parallèlement du fait de la formation des premières liaisons [80].

c) Consolidation des liaisons

Alors qu'une force de quelques dizaines de (piconewton) pN suffit à rompre une liaison unique, il faut souvent exercer une force mille fois plus importante pour séparer des cellules après un contact de quelques minutes. Dans ce cas, la rupture est souvent liée à un déchirement de la membrane cellulaire. Cette consolidation spectaculaire de l'interaction résulte de la mise en jeu concomitante de plusieurs processus:

- Il se produit une déformation des membranes cellulaires conduisant à la formation d'une aire de contact moléculaire pouvant atteindre quelques μm^2. Cette déformation peut être mise en évidence à l'échelle du µm (une cellule approximativement sphérique en suspension s'étale sur une surface) et du dixième de µm (comme on peut le mettre en évidence au moyen de la microscopie électronique), les surfaces cellulaires sont le plus souvent hérissées de

microvillosités dont la longueur peut dépasser un µm, alors que leur épaisseur est de l'ordre de 0,1 µm. Au cours de la formation de liens adhésifs, ces villosités se déforment afin de permettre un accolement des surfaces dont la distance ne doit pas excéder quelques dizaines de nm pour permettre un contact moléculaire. Des études expérimentales ont montré que l'étendue du contact était corrélée positivement à la densité des molécules d'adhésion [80] et se trouvait augmentée lorsqu'il existait un mécanisme de reconnaissance intercellulaire actif [81]. Les mécanismes de cet étalement restent incomplètement compris : celui-ci pourrait associer des déplacements membranaires contrôlés, induits par les interactions adhésives, à des fluctuations aléatoires guidées par ces mêmes interactions [82].

d) Sites d'adhésion

Plusieurs sites d'adhérence cellules-support ont été décrits [83,84]. On peut citer :

- Les contacts entre la cellule et la matrice extracellulaire (MEC), qui se situent à une distance supérieure à 100 nm et qui connectent le milieu intérieur de la cellule à la surface.
- Les contacts étroits compris entre 30 nm et 50 nm, qui se trouvent autour des contacts focaux.
- Les contacts focaux qui séparent la cellule de la surface de 10 nm à 20 nm et qui sont souvent observés à des zones frontières des cellules. Ils représentent une très forte adhésion de la cellule à la surface. Ces zones de contact très localisées de la cellule sur la surface, que l'on peut visualiser en microscopie confocale, sont constituées d'un assemblage d'intégrines (« clusters ») regroupées en amas et reliées aux protéines du cytosquelette. La fibronectine est souvent impliquée dans ces liaisons (Figure I.4 [85]).

Dans un environnement biologique naturel, c'est la matrice extracellulaire qui joue le rôle de support. Dans la matrice extracellulaire se trouve un ensemble de protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire qui portent le nom de SAMs (Substrate Adhesion Molecules). Sur la cellule se trouvent également des protéines adhésives appelées CAMs (Cellular Adhesion Molecules).

♣ *Les protéines de la matrice extracellulaire : les SAMs*

Chez les organismes pluricellulaires, tout tissu organique, animal ou végétal, est formé de cellules entourées par une matrice extracellulaire (MEC). Cette matrice est composée de protéines et de polysaccharides qui sont sécrétés localement par les cellules et assemblées en un réseau organisé, en association étroite avec la surface de la cellule. Ces macromolécules qui constituent la MEC sont appelées SAMs (Substrate Adhesion Molecules) [84]. Les échanges d'informations et les cohésions cellule - cellule et cellule -matrice ont lieu grâce aux

SAMs. Ces dernières jouent un rôle dans le comportement des cellules telles que l'adhérence, la différenciation et la migration cellulaire [85].

Trois types de SAMs sont distinguées :

- des protéines fibreuses à rôle structural : le collagène et l'élastine,
- des protéines à rôle adhésif : la laminine, la vitronectine et la fibronectine,
- des protéoglycanes ou glycosaminoglycanes qui retiennent l'eau et sont responsables de la formation de gel

♣ *Les protéines d'adhérence de la cellule: les CAMs*

La membrane cellulaire est constituée d'une bicouche lipidique contenant des responsables de la formation de gel. Les protéines d'adhérence de la cellule : les CAMs glycoprotéines de surface qui permettent de lier la matrice extracellulaire au cytosquelette de la cellule. Elles portent le nom de molécules d'adhérence cellulaire ou en abrégé CAMs qui vient de Cellular Adhesion Molecules. Elles reconnaissent spécifiquement les molécules de la MEC ainsi que les autres CAMs [86] et par conséquent jouent un rôle essentiel dans de nombreuses réponses physiologiques ou pathologiques.

Les CAMs se divisent en quatre grandes familles définies sur des critères de similarités structurales et fonctionnelles :

- les cadhérines (E-, P-, N- et R-cadhérine)
- les sélectines (L-, P- et E-sélectine)
- les molécules de la superfamille des immunoglobulines
- les intégrines.

Parmi ces quatre familles les intégrines ont été particulièrement étudiées, probablement parce qu'elles se lient à la plupart des protéines de la matrice extracellulaire. Leurs concentrations à la surface des cellules sont de 10 à 100 fois supérieures à celles des autres familles de molécules d'adhérence cellulaire. L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les intégrines bloque le processus d'adhérence cellulaire jusqu'à 100% dans certains cas, suggérant l'importance de leur rôle dans le processus d'adhérence [87].

Pour que l'adhésion cellulaire soit forte, il faut que les contacts focaux existent, puisque l'association de nombreuses liaisons faibles (des intégrines aux ligands) forme une liaison forte et que la partie cytoplasmique des intégrines constituant les contacts focaux se lie au cytosquelette. Les principaux constituants du cytosquelette sont les micro-filaments d'actine, et les microtubules. Ils organisent le volume intracellulaire : ils donnent à la cellule sa forme,

la possibilité de se mouvoir, et la capacité à la cellule à organiser et à transporter d'un point à un autre de la cellule des organites intracellulaires.

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

Les contacts intercellulaires responsables de la formation d'interactions adhésives peuvent se produire dans des circonstances variables: une cellule peut être dirigée passivement vers une surface par un écoulement hydrodynamique ou l'agitation thermique, comme le cas de l'interaction des leucocytes et des cellules endothéliales. Les contacts peuvent aussi résulter d'un déplacement ou d'une déformation d'une cellule fixée à une surface. Les forces mises en jeu peuvent varier de quelques pico newtons (pN) à plus de 10.000 pN.

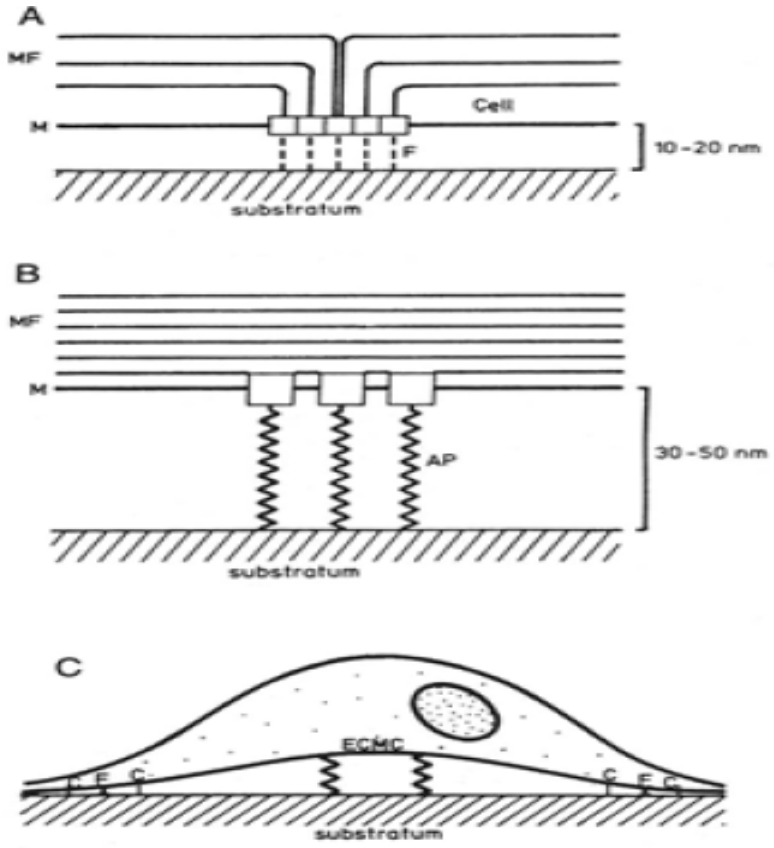


Figure I.4 : Sites adhésifs cellule/surface. ([85])
(A. Contacts focaux. B. Contacts étroits. C. Contacts en différents sites. MF : filaments du cytosquelette, M : membrane plasmique, F : fibronectine, AP : protéine adhésive, ECMC : site de contact avec la matrice extracellulaire, C : contacts étroits, F : contacts focaux)

II-2 Adhésion non spécifique

II-2-1 Principe

L'adhésion (ou adsorption) est considérée comme non spécifique s'il y a des interactions entre divers facteurs variables dans le temps et on ne peut pas déterminer de mécanismes préférentiels. Des réactions cellulaires, ou relatives à leur environnement, peuvent considérablement influencer ce processus par l'intermédiaire de polymères extracellulaires, de variations de la répartition des charges, des sites de blocage, ou encore de déformations plastiques des cellules (situation de stress). Pour ces raisons, les interactions peuvent être de nature ionique, dipolaire, hydrophobe/hydrophile.

II-2-2 Approche physico-chimique

Dans une approche purement physico-chimique, on ne dissocie pas le vivant des autres matériaux. Les cellules sont reconnues comme des particules colloïdales idéales, sphériques et rigides, avec une surface parfaitement définie et uniforme. Les modèles les plus simples ne prennent en compte que les interactions non spécifiques.

II-2-2. a La théorie DLVO

Des corps de même charge sont sujets à des forces d'attraction et de répulsion qui s'additionnent et varient indépendamment, en fonction de la distance qui les sépare.

Selon Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek (DLVO) [88], une particule qui s'approche à une certaine distance d'une surface donnée, va interagir avec cette surface par des forces de type London-Van der Waals ou électrostatiques (interactions supérieures à 1nm). Cette théorie permet donc de prévoir la probabilité qu'a une particule de se situer à une certaine distance d'une surface donnée.

Il est possible de distinguer deux types d'adhésion:

- l'adhésion de minimum secondaire, c'est à dire une adhésion réversible qui laisse à la cellule un mouvement brownien dans un plan.
- l'adhésion de minimum primaire, irréversible. Dans ce cas, il n'y a plus de degré de liberté.

L'énergie d'adhésion dépend des propriétés électriques, de la polarisabilité des cellules et des surfaces ainsi que des propriétés du milieu (constante diélectrique, force ionique). Cette théorie fournit une bonne description du comportement de particules colloïdales mais ne prend pas en compte les interactions intermoléculaires d'une distance inférieure au nanomètre. En effet, à des distances aussi faibles, d'autres types d'interactions telles que les liaisons hydrogène sont très importantes et déterminent la force d'adhésion du minimum primaire que la théorie DLVO ne prévoit pas. Cette théorie assimile le mouvement à un déplacement brownien des particules or, dans les processus biologiques, les cellules sont mobiles et leur migration est dirigée par des interactions spécifiques avec d'autres entités. Ce mouvement est

donc plus énergétique que le mouvement brownien. De plus, il n'est pas idéal pour des cellules de taille trop importante, qui ne peuvent être assimilées à des particules colloïdales.

Cette théorie ne permet donc pas à elle seule de décrire le processus d'adhésion cellulaire à une surface inerte, mais elle souligne l'importance de l'appréciation des interactions longue distance. Si les propriétés électriques de surface jouent un rôle significatif dans ces interactions interfaciales, il semble essentiel d'étudier le potentiel zêta (ζ) et les charges exprimées au niveau des surfaces interagissantes [89].

II-2-2. b Approche thermodynamique

Le phénomène d'adhésion cellulaire peut être appréhendé sous un angle strictement thermodynamique [90]. L'énergie libre de surface, γs, est une propriété intrinsèque du matériau qui contribue à l'interprétation des phénomènes interfaciaux. Elle se définit comme l'énergie qu'il faut fournir contre les forces de liaisons pour créer une surface unité en éloignant les atomes de part et d'autre d'un plan imaginaire, depuis leur distance d'équilibre jusqu'à l'infini. L'énergie libre de surface est donc la mesure des liaisons insatisfaites de la surface.

L'adhésion correspond en réalité à la création d'une nouvelle interface qui peut être considérée comme totalement réversible. Cette approche prend en compte les interactions à courtes distances, elle s'intéresse aux contacts intimes entre les surfaces interagissantes. Si la composition moléculaire en surface, la pression et la température sont constantes, il est possible de décrire, en ne tenant pas compte des interactions à longue distance, les processus d'adhésion et d'étalement des cellules sur un substrat solide de la façon suivante [85] :

G adh = γcs – (γcl + γsl) unité : J.m

Gadh : énergie libre d'adhésion

γcs : énergie libre interfaciale solide-cellule

γcl : énergie libre interfaciale cellule-liquide

γsl : énergie libre interfaciale solide-liquide

L'adhésion cellulaire est un processus énergétiquement favorisé lorsque la formation de cette nouvelle interface est accompagnée d'une diminution de l'énergie libre du système (Gadh<0). L'énergie libre interfaciale fait intervenir l'environnement, elle correspond aux liaisons insatisfaites résiduelles après interaction entre le matériau et son environnement.

Une méthode permettant de caractériser des réactions qui ont lieu au niveau d'interfaces repose sur la mouillabilité, c'est à dire la capacité d'un liquide à adhérer et s'étendre sur une surface. Il a été démontré que la mouillabilité d'un biomatériau influe sur les effets biologiques au niveau cellulaire. Ces aspects prendront une part importante dans notre étude.

Cette approche thermodynamique décrit une création d'interface mais, dans le cas d'une interaction cellule-matériau, le phénomène n'est pas aussi simple. Il est important de prendre en compte l'intervention de l'environnement cellulaire, ainsi que les autres types d'interactions qui ont lieu. De plus, le phénomène est ici considéré comme totalement réversible, ce qui ne correspond pas au cas réel. La physico-chimie est un outil essentiel pour comprendre le comportement cellulaire mais ne peut être appréhendée seule car elle ignore certains processus propres au vivant. Une bonne compréhension du phénomène d'adhérence cellulaire à un biomatériau doit intégrer les données apportées par la physico-chimie et une approche biologique.

II-2-3- Approche biologique

Les biologistes connaissent depuis longtemps l'importance des phénomènes d'adhérence nécessaires à la survie des cellules au sein d'un tissu. De nombreuses cellules eucaryotes (épithéliales, fibroblastiques, endothéliales) ont besoin d'adhérer à un support afin de croître, proliférer et exprimer leur phénotype.

Lorsque les cellules sont mises en contact avec un matériau, par exemple lorsqu'elles sont mises en culture sur un support approprié, elles doivent d'abord adhérer puis s'étaler à sa surface [91, 92]. Le processus d'adhérence se fait en plusieurs étapes :

1) Adsorption rapide des protéines du sérum au support qui forme une couche ayant une épaisseur de 2 à 5 μm [93]. L'étape d'adsorption des protéines que nous développerons dans la suite de cette présentation est fondamentale car elle est le véritable contact entre le système vivant et le matériau. La nature des interactions qui vont se développer entre la protéine et le matériau aura des conséquences sur l'évolution ultérieure de la cellule.
2) Contact des cellules avec la couche protéique.
3) Attachement cellulaire à la couche protéique. A ce stade, les glycosaminoglycanes tels que l'acide hyaluronique, et les glycoprotéines telles que la fibronectine, vitronectine et laminine jouent un rôle primordial

Suite aux processus d'adhérence cellulaire intervient l'étalement cellulaire si les conditions sont favorables, avec un temps de latence d'environ vingt minutes après l'ensemencement. Pendant ces vingt minutes, les cellules forment des contacts avec le matériau pour finalement adhérer fermement à ce dernier. L'étalement se produit pendant la phase Gap1 (G1) et la phase synthèse (S) du cycle cellulaire. La prolifération cellulaire peut alors débuter [94].

II-3 Régulation de l'adhésion et du pelage

Le fonctionnement cellulaire nécessite un contrôle précis de l'adhésion. Nous nous proposons, à l'aide de quelques exemples, d'illustrer la très grande variété des mécanismes de régulation apparus au cours de l'évolution. Nous considérerons successivement le contrôle de l'attachement et du détachement.

II-3-1 Régulation de l'adhésion

- *Régulation de l'expression :* L'activation des cellules endothéliales entraîne l'apparition sur la membrane de ces cellules de molécules d'adhésion. Ces molécules d'adhésion peuvent exister sous formes de réserves conservées dans des organelles spécialisées, ce qui leur permet de passer très rapidement sur la membrane, en quelques minutes au maximum (c'est le cas de la P-sélectine). D'autres molécules n'apparaîtront que quelques heures plus tard, après avoir été synthétisées (E-sélectine).

- *Régulation de l'affinité par une modification conformationnelle :* Les intégrines peuvent présenter plusieurs conformations d'affinité variable. La cellule peut modifier l'activité de ses intégrines membranaires à la suite de phénomènes de signalisation complexes.

- *Régulation de l'affinité par la distribution membranaire :* Ce mécanisme est illustré par une expérimentation de Von Andrian et al. [95]. La L-sélectine, qui est un initiateur efficace de l'adhésion des leucocytes à certaines cellules endothéliales en conditions de flux, est localisée aux extrémités des microvillosités. Ces auteurs ont fait exprimer à des populations cellulaires des molécules chimériques présentant la partie extracellulaire de la L-sélectine et les régions transmembranaire et cytoplasmique d'une autre molécule (CD44, normalement exclue des microvilli) : ces molécules, qui n'étaient plus concentrées aux extrémités de microvilli, conservaient la capacité de fixer un anticorps anti-L-sélectine en conditions statiques, mais elles perdaient cette activité en conditions dynamiques.

- *Régulation de l'affinité par la mobilité :* L'adhésion intercellulaire dépend de la mobilité des récepteurs mis en jeu : au stade initial, la formation des liaisons dépendra de leur rencontre, favorisée par une diffusion aléatoire dans le plan de la membrane. Au stade de consolidation, l'attachement pourra être renforcé par une concentration - active ou passive – des récepteurs dans la région de contact. Plusieurs approches expérimentales confortent cette hypothèse [96].

- *Régulation par une modulation des éléments répulsifs :* L'adhésion cellulaire pouvait être gênée par les forces répulsives engendrées par l'interaction des matrices péricellulaires, gênant ainsi le contact des membranes.

Il est intéressant de noter que l'adhésivité cellulaire peut être très rapidement augmentée par la libération des éléments répulsifs, sous l'action de protéases ou de glycosidases. Ainsi, la

molécule anti-adhésive CD43 (23) est clivée au cours de l'activation de certaines populations cellulaires [97, 98].

II-3-2 Régulation de la déadhésion ou pelage

De nombreuses données théoriques et expérimentales montrent bien que l'adhésion n'est pas un phénomène réversible. Il n'est pas démontré qu'une cellule attachée à une surface par des intégrines puisse se détacher en induisant une conformation inactive de ces molécules. Bien que la déadhésion ait sans doute été moins étudiée que l'induction de l'attachement, nous citerons quelques mécanismes originaux de détachement.

- *Détachement par traction :* Le moyen le plus simple pour une cellule de se détacher d'une surface pourrait consister à exercer une traction conduisant à une rupture mécanique des liaisons. Certaines expériences suggèrent qu'un tel mécanisme contribue effectivement au détachement [99]. Il faut noter que le détachement conduit souvent à un arrachement de certains constituants membranaires qui resteront liés au substrat.

- *Détachement par protéolyse des récepteurs* : Quelques données expérimentales suggèrent que le déplacement des granulocytes sur une surface couverte de collagène repose sur la protéolyse des intégrines responsables de l'attachement au moyen d'enzymes contenus dans les granules cellulaires [100].

- *Détachement par perte du maintien de la structure adhésive :* Une méthode couramment utilisée pour détacher les cellules des récipients de culture consiste à les traiter par des enzymes protéolytiques tels que la trypsine. Il paraissait raisonnable de penser que le détachement résultait du clivage enzymatique des molécules d'adhésion. Cependant, cette conception naïve a été remise en question par un article de Rees et coll. (1977) [101] qui ont étudié les altérations structurales de fibroblastes étalées sur une surface et traitées par des chélateurs du calcium ou des enzymes protéolytiques. Les résultats suggèrent que le maintien de l'adhésion comporte une participation cellulaire active, à la fois pour maintenir la rigidité membranaire locale et pour assurer la cohésion latérale des récepteurs d'adhésion.

Dans ces conditions, il serait concevable que la dépolymérisation des constituants du cytosquelette dans la région de contact puisse initier un processus de détachement.

Les quelques exemples qui précèdent illustrent la diversité des molécules et des mécanismes apparus au cours de l'évolution pour contrôler un processus aussi fondamental que l'adhésion cellulaire. Cette diversité est à la fois un facteur d'efficacité (il existe des molécules adaptées à des contraintes extrêmement variées) et de robustesse (du fait d'une certaine redondance des mécanismes, il existe des compensations possibles à l'altération de certains systèmes).

Une bonne compréhension des mécanismes de l'adhésion devrait aider au développement de procédés thérapeutiques (stratégies anti-inflammatoires anti-métastatiques ou anti-infectieuses, développement de biomatériaux).

II-4 Rôle des propriétés du substrat

Le comportement des cellules (adhérence, étalement, prolifération) à la surface d'un matériau dépend des caractéristiques physico-chimiques du matériau (charge, mouillabilité, caractère hydrophile ou hydrophobe, groupements fonctionnels spécifiques) et de la topographie de sa surface.

II-4-1 Caractéristiques physico-chimiques

Parmi les propriétés physico-chimiques de surface d'un matériau, nous pouvons citer la morphologie, la composition chimique, l'hydrophilie ou la mouillabilité de surface du matériau corrélée à l'énergie libre de surface [102,103]. Ces différents paramètres ne sont pas toujours indépendants les uns des autres. En effet, en introduisant un substituant sur un matériau, nous modifions la composition chimique de surface, mais selon la nature du substituant, il est clair que nous allons faire varier la mouillabilité du matériau. Ainsi pour faciliter la compréhension, nous nous limiterons aux études réalisées sur l'influence de la morphologie et de la mouillabilité du matériau sur l'adsorption protéique à la surface du matériau et les conséquences sur l'adhérence et la prolifération cellulaire.

II-4-2 Caractéristiques morphologiques

La membrane basale sur laquelle repose les cellules dans l'organisme présente une structure tridimensionnelle qui a une influence connue et identifiée sur le comportement de ces cellules. La topographie de la surface des biomatériaux agit également sur le comportement des cellules qui y adhèrent. Différentes techniques peuvent être utilisées pour modifier la topographie de la surface du biomatériau. Ainsi, des modifications telles que des sillons, des arêtes, des pores ou des puits volontairement ajoutés ou créés à la surface d'un polymère, induisent une orientation des cellules dans l'alignement de leur axe [104,105]. Dans ce cas, une organisation de l'actine et d'autres éléments du cytosquelette suivant la même orientation est généralement observée [106]. D'autres études ont montré que la rugosité du matériau pouvait influencer le comportement des cellules. La rugosité doit être faible pour permettre au cytosquelette d'ostéoblastes humains d'épouser la forme de la surface métallique (Ti6Al4V) et également permettre un bon étalement cellulaire [104].

Par ailleurs, Deligianni et al. [105] ont montré que l'adhérence, la prolifération et la force de détachement des cellules de la moelle osseuse étaient sensibles à la rugosité des surfaces en hydroxyapatite. L'augmentation de la rugosité des surfaces en hydroxyapatite favorise, in

vitro, les réponses à court et à long terme des cellules de la moelle épinière. C. Wirth et al. ont également montré que la prolifération des ostéoblastes dépend de la rugosité des surfaces d'alliage de nickel et de titane. L'augmentation de la rugosité de ces surfaces favorise in vitro la prolifération des ostéoblastes [106]. La mise en contact d'un biomatériau biocompatible avec le milieu biologique se traduit rapidement par la prolifération cellulaire. Le comportement des cellules dépend donc de la morphologie de la surface d'un matériau et en particulier de la rugosité mais ce comportement diffère selon la nature des cellules.

- Surface rugueuse

Une surface est qualifiée de rugueuse quand ses irrégularités (creux et crêtes) sont distribuées de manière aléatoire. Ainsi une surface rugueuse se différencie d'une surface à texture dont les irrégularités sont organisées [107]. L'étendue de mesure d'une surface par la technique de profilométrie tactile peut atteindre 1mm et la résolution peut descendre jusqu'à 0.01 μm.

En général, il est reconnu que l'adhésion cellulaire est plus grande sur une surface rugueuse que sur une surface lisse [108]. Lorsque la surface de l'implant est rugueuse ou irrégulière, les macrophages sont attirés en plus grand nombre [109] et restent actifs à l'interface pendant une durée indéterminée [110]. On retrouve par la même occasion, plusieurs cellules géantes à la surface de ces implants, comme c'est le cas pour les prothèses vasculaires à base de PTFE expansé [111]. Le tissu de granulation est aussi plus développé autour de ces implants à surface rugueuse [111,112]. L'une des techniques utilisées pour caractériser la rugosité est la microscopie à force atomique.

II-4-3 Fonctionnalisation de la surface du substrat

II-4-3.a Notion de surface

Une surface peut se définir comme la partie extérieure d'un solide. Mais, puisqu'un solide est toujours placé dans un environnement donné ou en contact avec un autre milieu, cette surface est considérée comme une interface. Par exemple, nous retrouvons l'interface solide-gaz, l'interface solide-liquide ou encore l'interface solide-solide [113].

Les écarts topographiques de surface d'un matériau (par rapport à une surface idéalement plane) et la nature physico-chimique de sa couche superficielle dépendent de l'histoire métallurgique et mécanique de ce même matériau [114]. La connaissance de ces données est nécessaire pour la compréhension d'un grand nombre de processus technologiques impliquant en particulier le frottement, la fatigue, l'usure et la corrosion [115].

II-4-3.b Nettoyage de substrat

Les méthodes de nettoyage des surfaces dépendent de leur nature. Pour un matériau donné, ces méthodes varient selon les auteurs. Dans le cas d'une surface en verre, chaque étude est un essai de nettoyage et de désinfection. Cargill et ses collaborateurs ont utilisé trois bains successifs d'acétone, d'éthanol, de NaOH (1N) pendant une heure et enfin un rinçage avec de l'eau distillée. La stérilisation se fait par plongée dans de l'éthanol pendant une à deux minutes [116]. Groth et al. lavent les plaques de verre avec de l'acide sulfochromique (interdit en France à ce jour) pendant 24 h, puis ils les passent dans un bain d'acide fluorique à 2% pendant deux minutes. Chaque étape est intercalée par un rinçage avec de l'eau distillée. Pour garder le verre hydrophile (angle de contact $\theta = 14°$), ils le stockent dans de l'eau bidistillée [117]. Webb et al. utilisent des lamelles de microscope en verre qui seront lavées par un mélange acide sulfurique /eau oxygénée (H_2SO_4 / H_2O_2 : 7/3) pendant 30 min, rincées par de l'eau désionisée et enfin séchées pendant une heure à 100°C pour éliminer tout le film d'eau [115]. D'autres équipes se contentent d'un bain ultrasonique avec de l'éthanol et stérilisation par autoclavage à 180°C pendant 2h [118, 119].

II-4-3.c Greffage de l'OTS

A ce jour, peu de publications traitent du dépôt de molécules de silanes monofonctionnelles. En revanche, les mécanismes impliqués dans les protocoles de silanisation des molécules trifonctionnelles, et plus particulièrement les trichlorosilanes, sont bien décrits dans la littérature [120–121]. La richesse de cette littérature provient du fait qu'un grand nombre de paramètres jouent un rôle important dans la formation de ces dépôts, comme la présence d'eau en surface, la température de dépôt [122, 123], la nature du substrat [124] et la longueur des molécules de silanes. Une première approche de ces mécanismes a été proposée par Brzoska et al. [125]. Ils étudient la formation de couches auto-assemblées de molécules de trichlorosilanes sur des substrats de silice. Ils établissent un schéma en quatre étapes pour expliquer les processus d'organisation: la première phase décrit la physisorption des molécules de trichlorosilanes sur la fine couche d'eau présente en surface du substrat. Cette couche est nécessaire pour que s'effectue l'étape suivante d'hydrolyse avec la transformation des trichlorosilanes $Si(Cl)_3$ en trisilanols $Si(OH)_3$. Elle permet aussi aux molécules de se déplacer latéralement dans le plan par mouvement brownien. La troisième étape est l'étape de greffage à proprement parler où les molécules de silanes établissent un pont siloxane Si-O-Si avec les groupements silanols de surface de la silice. Enfin, une fois les molécules de silanes greffées, si les distances entre les molécules et leur orientation sont favorables, des liaisons intermoléculaires se forment alors (”cross-linking”) par les têtes tri-silanols. Cette quatrième étape s'appelle phase de réticulation ou de condensation latérale. On obtient ainsi un réseau

2D de polysiloxanes. La phase de condensation se fait à une température de 20 °C, températre suffisamment éloignée de la température critique pour permettre l'obtention de couches organisées. Ces processus sont montrés dans la figure I.7.

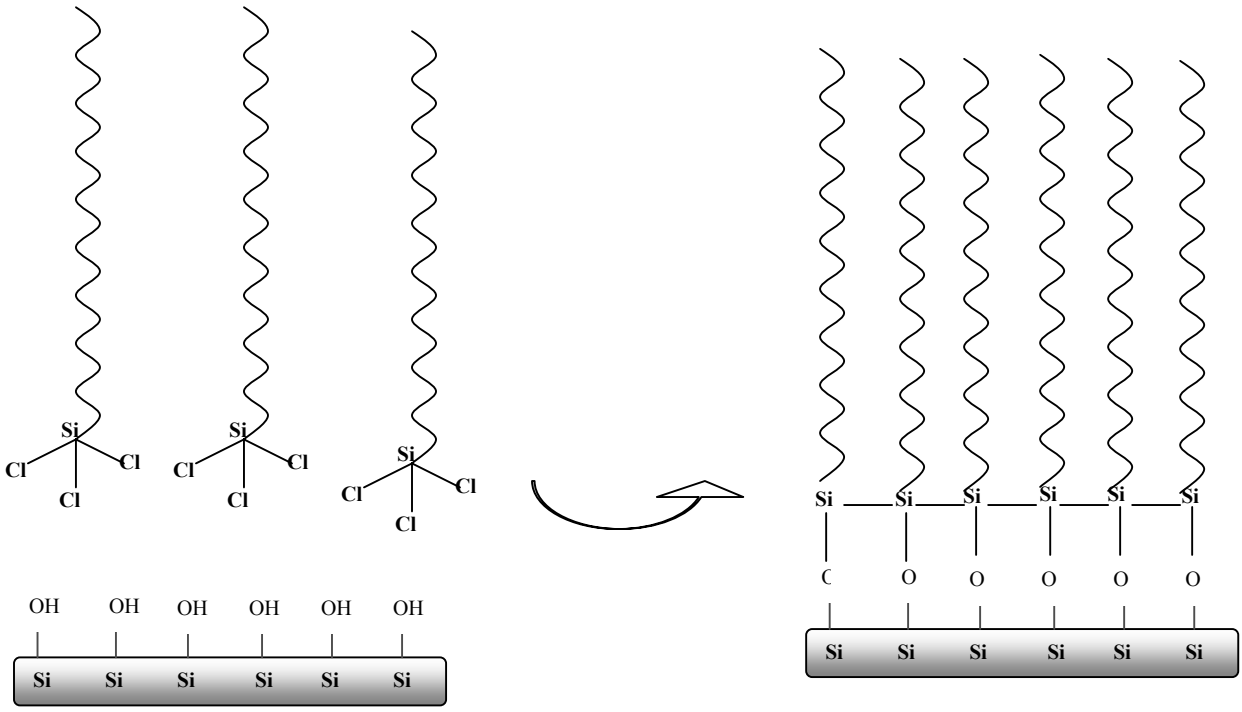


Figure I.7 : Octadécyltrichlorosilane est une molécule typique constituée par une longue chaîne à groupement alkyl ($C_{18}H_{37}$et une tête polaire ($SiCl_3$) qui forme une couche auto assemblée (self assembled monolayer) SAMs sur de nombreux substrats différents

II-4-3.d Adsorption du polystyrène (physiosorption)

Plusieurs polymères ont été adoptés dans l'ingénierie tissulaire et surtout dans l'élaboration des implants. On peut dire que quatre grandes catégories de biomatériaux peuvent être envisagées. En effet, les métaux et les alliages métalliques sont les ancêtres des biomatériaux. Le plus important est l'acier inoxydable. Le titane est aussi principalement utilisé en chirurgie orthopédique et pour réaliser des implants dentaires. Les alliages à mémoire de forme sont une variante intéressante de cette catégorie. Quant aux céramiques (oxydes principalement), elles se caractérisent par une température de fusion élevée et un comportement fragile. On rencontre principalement l'alumine et la zircone qui sont utilisées dans les têtes de prothèses de hanche. L'hydroxyapatite (HAP) et le phosphate tricalcique (TCP) sont deux céramiques de phosphate de calcium. Ces matériaux présentent l'avantage d'être ostéoconducteurs donc ils favorisent la repousse osseuse et la colonisation de l'os. Parmi les matériaux d'origine naturelle, on peut citer la chitine, le chitosan, la pectine, l'acide hyaluronique, les fucanes, les

dextranes, la cellulose, le corail et le collagène etc. Les utilisations de polymères dans le domaine des biomatériaux sont extrêmement nombreuses. Plusieurs travaux ont utilisé le polystyrène fonctionnalisé par des protéines de la matrice extracellulaire ou modifié chimiquement par chlororosulfonation ou par traitement plasma pour l'élaboration de greffons en chirurgie vasculaire. Le polystyrène est un thermoplastique, dur et bon marché. C'est un polymère vinylique. Structurellement, c'est une longue chaîne hydrocarbonée, avec un groupement phényle attaché sur un atome de carbone sur deux. Il est synthétisé par polymérisation radicalaire du monomère styrène. Il est caractérisé par une déformation thermique modérée, une bonne stabilité dimensionnelle, une rigidité et une résistance aux chocs. Renforcé par fibres de verre, il peut être traité par moulage par injection ou stratification continue. Dans notre étude, on prépare une solution de polystyrène de concentration 1 g/l. En effet, le polystyrène à architecture greffée et bien contrôlée par des protéines constitue un bon modèle pour illustrer l'endothélialisation des prothèses cardiovasculaires.

II-4-3.e Adsorption des protéines

Les interactions polymère/système vivant dépendent de plusieurs paramètres : des propriétés et des caractéristiques intrinsèques de la protéine dans son milieu (point isoélectrique, distribution de charges, structure tridimensionnelle en solution, localisation et nature des zones hydrophobes) et de la nature de la surface solide. La surface des polymères peut se modifier en réponse à une variation de son environnement, dans le cas des polymères de nature amphiphile (présentant a la fois des régions hydrophiles et hydrophobes) (voir figure I.8). Ce type de polymère présentera une surface différente dans l'air ou dans l'eau, ainsi qu'en contact avec des protéines. En effet, l'adsorption d'une protéine va induire des micro changements à la surface du polymère. Le milieu environnant affecte également les phénomènes d'interaction par le biais de paramètres tels que le pH, la force ionique.

Quatre grands types d'interaction sont généralement développés entre les protéines et la surface des polymères : les interactions ioniques, les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogène et les interactions π - π (transfert de charge).

Interaction protéine-surface

Andrade et al. [126] ont proposé un modèle hypothétique de l'adsorption d'une protéine sur une surface. Le matériau a un comportement apolaire avec une énergie libre de surface très faible dans l'air. Quand le matériau est introduit dans la phase aqueuse (eau ou électrolyte), il restructure sa surface et subit un réarrangement pour exposer ses groupements polaires et il minimise l'énergie libre interfaciale. Afin que la protéine s'adsorbe à la surface, le film d'eau

doit être éliminé ce qui n'est pas facile car il est fortement lié à la surface polymérique et protéique. La protéine peut alors diffuser et il n'y aurait pas une adsorption nette à la surface. Si la protéine contacte la surface avec différentes orientations, un de ses groupements hydrophobes peut heurter la surface et enlever de l'eau et on aura une interaction faible. Si l'énergie est suffisamment importante, la protéine pourrait avoir un temps de résidence. En tenant compte de l'environnement local et des processus dynamiques de la protéine et de la surface qui peuvent être toutes les deux en mouvement, des points de contact pourraient être crées. Un processus de liaison coopérative s'installe et la protéine est adsorbée. Ceci est montré dans la figure I.8.

Description de l'adsorption des protéines sur un matériau

Il est généralement admis que l'adsorption des protéines sur la surface du matériau est l'un des premiers évènements qui se produit, après contact d'un matériau avec des fluides biologiques. Ce phénomène se produit en quelques secondes et les paramètres qui le contrôlent varient selon les matériaux et les protéines de l'interface.

Des techniques de spectroscopie de fluorescence ont permis de montrer que l'adsorption de l'albumine bovine sur du quartz atteint son équilibre en 8 secondes alors que seulement 75% de l'équilibre est atteint en 15 minutes dans le cas des immunoglobulines G [127].

Les cinétiques d'adsorption diffèrent selon les protéines et en milieu plasmatique, il s'établit une compétition connue sous le nom d'effet de Vroman [128]. Cet effet dépend de la concentration des protéines dans le milieu, de leur affinité pour la surface et de la vitesse de transport vers la surface. Ainsi, une protéine présente dans le plasma à une forte concentration peut s'adsorber rapidement. Cependant si elle présente une faible affinité, elle sera déplacée par une protéine de plus forte affinité même si cette dernière est en faible concentration.

L'albumine est la première protéine à s'adsorber. Elle est ensuite déplacée partiellement par les immunoglobulines G, puis le fibrinogène, la fibronectine et enfin les kininogènes de haut poids moléculaire [129, 130].

La nature des protéines adsorbées et leurs cinétiques d'adsorption sur les matériaux sont influencées par le matériau employé (composition chimique, topographie locale, rugosité, caractère hydrophile) [131] et par le lieu d'implantation de ces matériaux [132].

Pour certains biomatériaux, tels que les implants ou les prothèses, l'étude de l'adsorption des protéines qui vont ensuite permettre l'adhérence des cellules est donc très importante. En effet, la nature, la quantité et la conformation de ces protéines adsorbées conditionnent d'une façon considérable l'adhérence et la prolifération cellulaire [133].

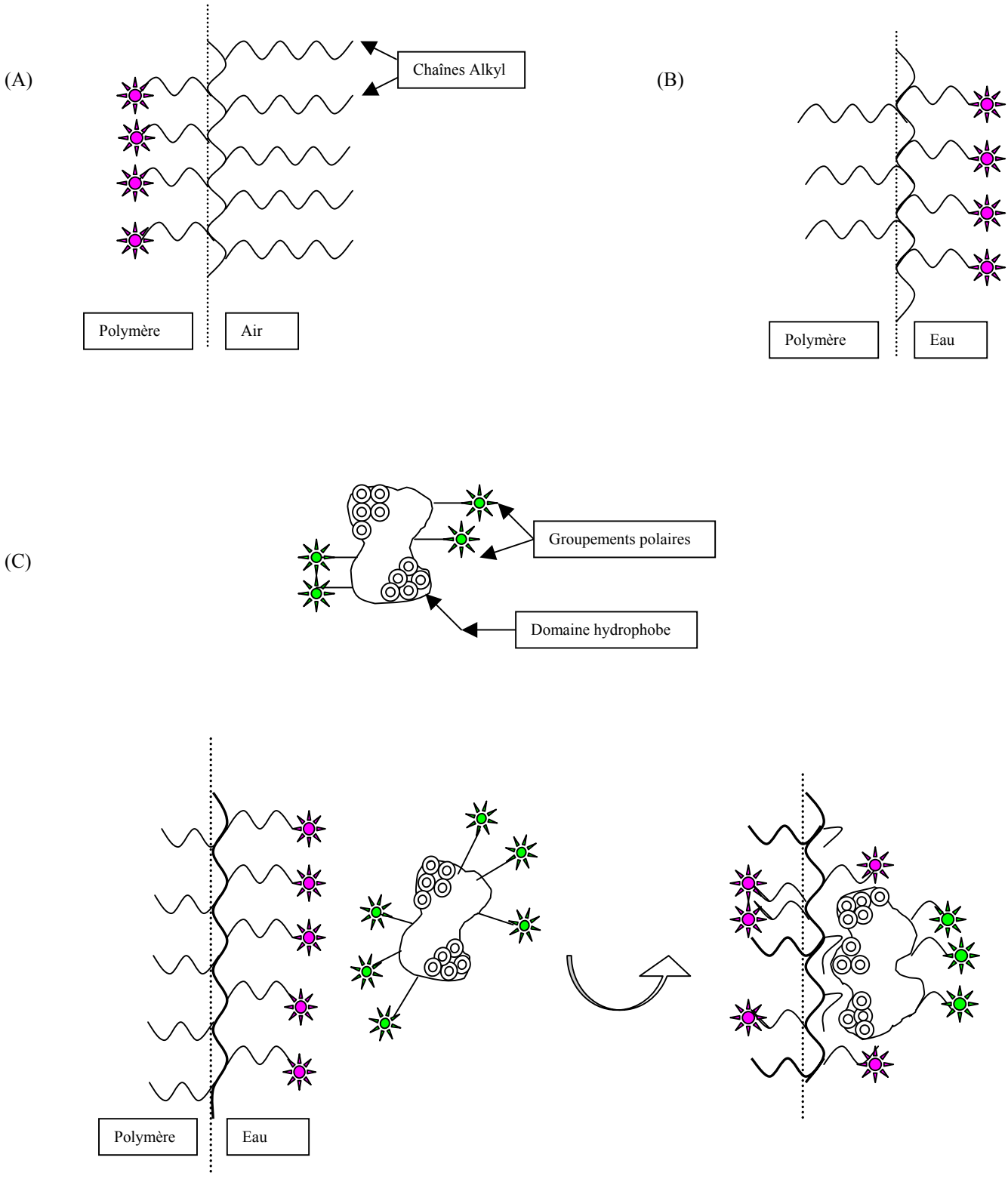


Figure I.8 : Présentation schématique d'un polymère dynamique sur une surface dans des environnements différents : (A) dans l'air, (B) dans l'eau, (C) une protéine dans l'eau à l'état d'équilibre, (D) la protéine et la surface se dénaturent lors de l'interaction [126].

➢ ***Nature et quantité de protéines***

En fonction des propriétés de surface, une sélection se produit dans les protéines adsorbées. McFarland *et al.* [134] ont réalisé une étude du mécanisme d'attachement de cellules osseuses d'origine humaine (HBDC : Huma Bone Derived Cells) sur des surfaces en quartz modifié de différentes façons. En utilisant la technique de la photolithographie, les auteurs ont réalisé le greffage de composés N-(2-aminoéthyl)-3-aminopropyl-triméthoxysilane (EDS) et diméthyldichlorosilane (DMS) de façon à obtenir une alternance de domaines modifiés. Ils ont montré que les cellules HBDC se sont préférentiellement localisées sur les domaines riches en composés EDS.

Kikuchi *et al.* [135] ont étudié l'adsorption de protéines: la fibronectine et la vitronectine sur des surfaces à base de polystyrène sur lequel ont été greffées des nombres variables d'unités porteurs de groupements amine tertiaire, et les conséquences sur le comportement de cellules endothéliales de l'aorte bovine. Ils ont constaté que l'adhérence et l'étalement des cellules augmentaient avec la proportion de groupements aminés. La conduite cellulaire était fortement influencée par l'adsorption de fibronectine et de vitronectine dont la quantité adsorbée augmente en fonction du taux en groupements amine tertiaire. En conséquence, il est donc possible de contrôler l'adhérence, l'étalement et la prolifération cellulaire, via l'adsorption des protéines impliquées dans ces processus en contrôlant la quantité de diamines dans les polymères.

➢***Conformation des protéines***

En fonction des propriétés physico-chimiques d'une surface, la fibronectine peut changer de conformation et ainsi moduler l'adhérence cellulaire. En effet, Garcia *et al.* [136] ont étudié les effets de l'adsorption de la fibronectine sur des verres dits « bioactifs » sur l'attachement de cellules ostéoblastes (ROS 17/2.8). Des lames de verre (BG0) ont été recouvertes de phosphate de calcium amorphe (BG1d) ou d'hydroxyapatite carbonaté (BG7d). L'hydroxyapatite « synthétique » (sHA) et du verre borosilicaté non réactif (CG) ont été utilisés comme contrôles. Ils ont montré que l'adhérence des cellules ostéoblast-like était plus importante sur des surfaces bioactives (BG7d et BG1d) par rapport aux surfaces contrôles (sHA, CG et BG0). De façon surprenante, les quantités de fibronectine adsorbées n'augmentent pas sur un verre non traité (sHA, CG et BG0) ou sur un verre recouvert de phosphate de calcium amorphe (BG1d) ou d'hydroxyapatite carbonaté (BG7d). Ces résultats ont amené les auteurs à suggérer que les différences observées sur les phénomènes d'adhérence des cellules, seraient dues à une modification de la conformation de la fibronectine selon le matériau.

Ils ont montré en utilisant des anticorps et des peptides RGD, que sur toutes les surfaces étudiées, l'étape initiale de l'adhérence des cellules est médiée par le site de liaison RGD de la fibronectine. L'augmentation des forces d'adhésion des cellules sur un verre traité n'est pas, selon les auteurs, due à une modification de l'environnement chimique du substrat ou à une augmentation des forces d'adsorption de la fibronectine à ce même substrat. Or, comme la séquence RGD de la fibronectine intervient dans tous les cas, les différences observées sont dues à une modification de l'affinité entre les récepteurs cellulaires et les sites de liaison à la fibronectine qui serait renforcée dans des verres bioactifs. Des résultats similaires ont été également observés sur d'autres types de surface par Iuliano et al. [137] et Grinnell et Feld [138]. Ces auteurs, ont constaté que, pour une même quantité de fibronectine adsorbée, les cellules adhèrent plus sur des verres hydrophiles que sur des verres silanisés hydrophobes. Ils ont également émis l'hypothèse d'un changement de conformation de la fibronectine selon le matériau sur lequel s'adsorbe la protéine.

Il faut cependant noter certaines contradictions au sujet des forces d'adhérence selon la nature du matériau. Ainsi, Burmeister *et al.* [139] ont étudié l'adhérence de cellules endothéliales de l'aorte d'origine bovine (BAEC) sur des films réalisés à partir de copolymères contenant un monomère hydrophobe, l'éthylméthacrylate (EMA) et un monomère hydrophile, l'hydroxyéthylméthacrylate (HEMA). Les copolymères synthétisés contiennent des quantités variables des deux monomères de façon à modifier la balance entre pouvoir hydrophile et hydrophobe. Les auteurs ont montré que la force d'adhérence de cellules endothéliales (BAEC) est plus importante sur les polymères hydrophobes (pEMA et copolymères riches en EMA) que sur ceux contenant principalement du HEMA. Les forces d'adhérence des cellules sur les polymères hydrophiles sont beaucoup plus faibles que celles trouvées par Iuliano et al. [137] et Grinnell et Feld [138]. Toutes ces expériences ont été réalisées sur des polymères préadsorbés de fibronectine. Cependant, les auteurs proposent la même explication à savoir la modification de la conformation de la protéine selon le matériau sur lequel elle s'adsorbe en n'excluant pas le paramètre de la concentration de protéines adsorbées. Ils indiquent par ailleurs, que l'affinité et la force de liaison de la fibronectine à son récepteur diminuent avec les copolymères riches en HEMA [139].

III- Méthodes de quantification de l'adhésion : cellule-substrat

Les dispositifs d'études développés comprennent les systèmes à disques tournants, les viscosimètres «cône–plan» et les circuits de perfusion utilisant des chambres transparentes.

Les conditions d'écoulement sont permanentes dans certains systèmes alors qu'elles sont pulsatiles dans d'autres.

III-1 Appareils à disque tournant

Le dispositif à disque tournant a été développé par Nomura et al. (1988) [140] et utilisé ultérieurement par Ono et al. (1991) [141].

Son principe consiste à créer un écoulement circulaire par un disque solidaire à un moteur tournant à une vitesse angulaire ω. Une contrainte de cisaillement est ainsi développée sur les cellules endothéliales adhérentes sur un bêcher sous-jacent.

Un appareil similaire fut utilisé par Rupnick et al. [142] pour des cellules endothéliales cultivées sur des segments rectangulaires de prothèses artérielles en polyester.

Ces dispositifs ne permettent pas d'avoir une contrainte de cisaillement uniforme. Cette dernière augmente au fur et à mesure qu'on s'éloigne du disque.

III-2 Viscosimètre «cône-plan»

Le dispositif expérimental est constitué par un cône et un plan [143]. Les cellules sont cultivées sur le plan au-dessus du quel est placé le cône. L'observation des cellules endothéliales est réalisée grâce à un microscope à contraste de phase ou à épi fluorescence [144].

Les taux homogènes de stress mécanique, faibles par approximation mathématique, sont indépendants de la distance radiale. Schnittler a montré que le flux généré par un tel système compris entre 0-200 dynes/cm^2 est laminaire et a une direction circulaire. Les contraintes de cisaillement développées sont uniformes, permanentes et oscillatoires à vitesses modérées. Elles demeurent constantes dans l'entrefer du viscosimètre tant que l'angle entre le cône et le plan (α) reste très petit (0.5°-3°).

III-3 Techniques hydrodynamiques

III-3-1 Chambre à flux

L'utilisation d'écoulements hydrodynamiques laminaires constitue un moyen relativement simple pour étudier la formation et la rupture d'interactions moléculaires. Le principe de base consiste à étudier le mouvement de cellules ou de particules couvertes de récepteurs le long d'une surface couverte de ligands en présence d'un écoulement laminaire, sous observation microscopique [145, 146]. Le point essentiel consiste à utiliser des taux de cisaillement assez faibles pour ne pas détruire trop rapidement les interactions moléculaires individuelles. Les particules se trouvant au contact de la paroi sont animées d'un mouvement uniforme, entrecoupé d'arrêts de durée variable. Si la densité des molécules d'adhésion est suffisamment faible, la plupart des arrêts sont dus à la formation d'une liaison unique. La cinétique de

détachement des cellules ou des particules permet de calculer la durée de vie des liaisons. La force hydrodynamique exercée sur les liaisons peut être modifiée en faisant varier le taux de cisaillement à la paroi, ce qui permet de déterminer l'influence d'une force sur la durée de vie des liaisons. La force nécessaire pour diminuer cette durée de vie de l'ordre de 50 % est de l'ordre de quelques dizaines de pN dans de nombreux systèmes [147]. Des résultats préliminaires suggèrent que la chambre à flux laminaire puisse être utilisée pour déterminer la fréquence de formation de liaisons entre des molécules liées à des surfaces [148]. Les expériences présentent cependant quelques difficultés à la fois expérimentales et conceptuelles dont la résolution nécessite une réflexion physique approfondie.

Une chambre de perfusion est constituée d'un canal ayant une section longitudinale rectangulaire. Le support (une lamelle en verre dans la plupart des cas), sur lequel les cellules endothéliales sont ensemencées, est placé au niveau inférieur de la chambre.

La chambre est intégrée dans un système de circulation avec un circuit de réchauffement, elle est montée sur la plate-forme d'un microscope afin de visualiser les cellules en temps réel.

III-3-2 Micropipettes

Grâce à la technique de micro-pipette, Sato et coll ont montré récemment, que les cellules endothéliales pouvaient être considérées comme des solides déformables. Les résultats montrent que ces cellules présentent un module d'Young d'environ 130 Pa [149].

Une autre approche, essentiellement développée par E. Evans [150] consiste à utiliser des micropipettes pour mettre au contact des vésicules déformables (hématies ou liposomes) portant une faible quantité de molécules d'adhésion de manière à permettre l'attachement de ces structures par un petit nombre de liaisons, voire une seule. Les surfaces sont ensuite séparées sous contrôle microscopique. L'analyse des déformations de la vésicule permet de calculer la force exercée. L'intérêt particulier de cette méthode est que la tension membranaire peut être modulée en faisant varier la pression d'aspiration dans les micropipettes. Ce procédé permet de mesurer une gamme de forces extrêmement étendue, d'un centième de pN à plus de 1000 pN.

III-4 Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique constitue une autre voie d'analyse de l'adhésion cellulaire. Son développement pour l'étude de cellules vivantes date de 1994 [151]. Elle offre un accès direct à l'observation des cellules vivantes à haute résolution et à la mesure de l'élasticité cellulaire.

Les méthodes que nous avons citées conduisent à des résultats extrêmement concordants. La rupture d'une liaison non covalente formée entre des biomolécules est un phénomène aléatoire

dont la durée de vie est très variable, d'une fraction de seconde à plusieurs heures. La force nécessaire pour augmenter notablement la fréquence de rupture est souvent de l'ordre de quelques dizaines de pN.

III-5 Techniques de mouillabilité

La caractérisation des surfaces est un élément essentiel qui permet une meilleure compréhension des réactions qui ont lieu au niveau de l'interface des biomatériaux. L'analyse de surface demande donc l'utilisation de techniques spécialisées telles que décrites dans le Tableau I.1 ci-dessous.

Ces dernières années, les méthodes d'analyse des surfaces ont connu un essor extraordinaire avec la venue d'appareils de plus en plus sophistiqués et performants. Plusieurs méthodes permettent notamment une exploration approfondie des couches de surface. La profondeur analysée pouvant aller de quelques couches atomiques à quelques nanomètres. Le choix de l'un d'entre eux dépend essentiellement de la nature de l'information recherchée.

Spectroscopie électronique
ESCA (spectroscopie électronique pour analyse chimique)
Spectroscopie Auger électronique
Spectroscopie ionique
Spectroscopie à balayage d'ions
Spectroscopie ionique de masse secondaire
Thermodynamique
Mouillabilité (angle de contact)
Adsorption-désorption
Visuelle ou morphologique
Microscopie optique
Microscopie électronique
à balayage (SEM)
à transmission (TEM)
Profilométrie (tactile et/ou optique)
Microscopie à balayage à effet tunnel
Microscopie à force atomique (AFM)
Microscopie confocale

Tableau I.1 : Méthodes conventionnelles d'analyses de surface

La mouillabilité peut être définie par le phénomène aboutissant à la création d'une interface solide-liquide. En effet les méthodes de la goutte posée ou sessile et de la bulle captive fournissent une image nette de la goutte (bulle) traduisant l'interaction entre le liquide sonde

et la couche moléculaire la plus superficielle de la surface. Elle permet de connaître l'affinité d'une surface vis à vis du liquide sonde, de calculer l'énergie libre de surface du matériau et éventuellement, d'estimer la dynamique moléculaire du solide en surface.

III-6-1 Mesure de l'angle de contact en statique

III-6-1-1 La goutte posée

Cette balance de forces, extrêmement simple, fut proposée d'abord par Thomas Young en 1805. Sa précision, sa versatilité et la facilité avec laquelle elle permettait de déterminer l'énergie libre d'adhésion entre liquides et solides exactement à leur interface d'interactions ont été, jusqu'à ce jour, difficiles à reproduire par une autre méthode.

Le principe de cette technique consiste à déposer, sur le matériau à étudier, une goutte d'un liquide sonde et de mesurer l'angle de raccordement à la jonction des phases solide/liquide/vapeur. Pour la mesure de l'angle de contact, nous utilisons une méthode simple basée sur la photographie d'une goutte de dimensions définies. Pour cela, un appareil de la société GBX à Romans (appareil Digidrop) est utilisé. Une goutte de 2 µL d'un liquide sonde est déposée à l'aide d'une seringue. L'image de la goutte est capturée par une caméra vidéo. La procédure de mesure est répétée 20 fois. L'angle de contact et l'erreur expérimentale sont déterminés pour tous les matériaux.

III-6-1-2 La bulle captive

Cette méthode consiste à réaliser sur le matériau immergé dans de l'eau pure (ou un autre liquide parfaitement caractérisé physico-chimiquement), une bulle d'air ou d'un autre liquide non miscible et moins dense [152]. La mesure de l'angle de raccordement entre le fluide constituant la bulle, l'eau et le matériau peut être réalisée

Dérivée de la goutte posée, elle consiste à réaliser, sur le matériau immergé dans de l'eau pure, une bulle d'air ou une goutte d'un liquide non miscible dans l'eau tel que l'octane.

Il est alors possible d'effectuer la mesure de l'angle de raccordement entre le fluide constituant la bulle, l'eau et le matériau.

III-6-2 Mesure de l'angle de contact en dynamique

L'hystérèse d'angle de contact est définie par différentes relations :

- la différence entre l'angle à l'avancée (θ_A) et l'angle au retrait (θ_R) [153] : $\Delta\theta = \theta_A - \theta_R$.
- la différence entre les cosinus de l'angle au retrait et de l'angle à l'avancée :

$$\Delta\cos\theta = \cos\theta_R - \cos\theta_A.$$

- une approche thermodynamique : calcul du travail d'adhésion de l'hystérèse d'angle de contact basé sur l'équation de Young : $\Delta W = \gamma_{LV}(\cos\theta_R - \cos\theta_A)$.

- une hystérèse d'angle de contact réduite : $H = (\theta_A - \theta_R)/\theta_A$ [154].

Bien que dans la littérature, les angles de contact avançants (θa) aient été considérés comme mesure des aspects apolaires d'une surface et les angles de contact reculants (θr), comme mesure des aspects polaires il serait risqué d'accepter littéralement cette hypothèse et d'essayer de déduire la composante de la tension superficielle polaire d'une surface en mesurant (θr). Plusieurs travaux ont essayé de trouver des méthodes pour appliquer des facteurs de correction aux angles de contact mesurés (avançants) lorsque le rayon de la rugosité a été déterminé. Il est cependant préférable d'utiliser des surfaces lisses c'est à dire des surfaces dont le rayon de rugosité est inférieur à 0.1µm.

Les causes de l'hystérèse d'angle de contact sont de plusieurs origines :

- hétérogénéités topologiques (rugosité). Pour un $R_a < 100$ nm, la rugosité n'aurait pas d'effet sur l'hystérèse d'angle de contact [155].
- hétérogénéités morphologiques (% cristallinité, variation de la zone cristalline et amorphe).
- hétérogénéités chimiques.
- phénomènes de réorientation, re-conformation des groupes et chaînes.
- phénomènes d'adsorption et de désorption.
- déformation de la surface [156].

Adamson a proposé d'autres causes provoquant l'hystérèse. L'hystérèse, si elle a lieu, est généralement positive, c'est à dire (θa)> (θr), ce qui indique un mouillage résiduel complet ou partiel de la surface du solide par le liquide de la goutte qui recule.

Cependant une hystérèse négative bien que rare, peut avoir lieu lorsqu'un des composantes du liquide (ou le liquide lui même) modifie les propriétés du solide (en plus du simple mouillage).

VI- Conclusion

Le processus d'adhésion comporte plusieurs phases successives : une étape d'approche, susceptible d'être influencée par les forces engendrées par la région la plus externe de la membrane, riche en macromolécules glycosylées. La phase critique est sans doute constituée par la formation de la première liaison. Sa compréhension nécessite une connaissance précise de la cinétique d'attachement et de détachement de molécules d'adhésion liées à des surfaces.

La consolidation de l'adhésion est un processus complexe comportant une participation active de la cellule, et conduit à une adaptation de la forme de la membrane cellulaire, à une concentration des récepteurs dans la région de contact avec l'élimination d'éventuels éléments répulsifs [157], enfin, à un renforcement mécanique de la région adhésive résultant d'une réorganisation du cytosquelette sous-membranaire. Ces remaniements influencent de manière importante l'activité, la survie, la prolifération et la différenciation cellulaires.

Dans la littérature, plusieurs techniques de quantifications ont été décrites. La chambre à flux et le jet vertical feront l'objet de chapitre suivant, dans lequel nous présenterons les protocoles et les techniques expérimentales utilisés pour mettre en évidence l'adhésion cellulaire.

Références bibliographiques

[1] : LÉONI J., Physiopathologie de l'athérosclérose - Mécanismes et prévention de l'athérothrombose.123bio.net

[2]: Dierterich P., Schnitzler-Odenthal M., Mrowietz C., Kramer M., Sasse L., Oberleithner H., Shnittler H.J. „Quantitative morphology of endothelial cells within confluent cultures in Response to fluid shear stress". Biophysical Journal 79 (3) (2000) 1285-1297.

[3] : Demuth k., Myara I., Moati N**, «** Biologie de la cellule endothéliale et athérogènèse ». Ann. Biol. Clin. 53 (1995) 171-189.

[4]: Brown S., Heinisch I., Ross E., Shaw K., Buckley D.C., Savill J**. "**Apoptosis disables CD31-medicated cell detachement from phagocytes promoting binding and engulfment". Nature 418 (2002) 200-203 .

[5]Godin C., Capriani A., Dufaux J., Flaud P. **"**Interactions between neutrophils and endothelial cells" **,** Journal of cell science 106 (1993) 441-452.

[6] Dejana E. **"**Endothelial cell adhesive receptors", Journal of cardiovascular pharmacology. 21 (l1) (1993) S18-S21.

[7]: Peter K., Nawroth P., Conradt C., Nardt T., Weiss T., Boehme M., Wunsch A., Alenberg J., Kubler W., Bode C. "Circulating vascular cell adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intercellular adhesion molecule–1,E-Selectin, P-Selectin, and Thrombomodulin". Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17 (1997) 505-512.

[8]: Langille L B. "Remodeling of developing and mature arteries: endothelium, smooth muscle, and matrix". Journal of cardiovascular pharmacology 21 (11) (1993) S11-S17.

[9]: Schwartz S.M., Liaw L. "Growth control and morphogenesis in the development and pathology of arteries". Journal of cardiovascular pharmacology 21(11) (1993) S31-S49.

[10] Klouche M., E.May A., Hemmes M., Me Bner M., M.Kanse S., T.Preissner K., Bhakdi S. "Enzymatically modified, non oxidized LDL induces selective adhesion and transmigration of monocytes and t-lymphocytes through human endothelial cell monolayers". Atherioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19 (1999) 784-793.

[11]: Dejager S., Foubert L., Sich D., Chapman J., Bruckert E., Turpin G. "Hétérogeneité des LDL". Rev. franç. Endocrinol. Clin. 37 (1996).115-128.

[12] Chang K.C., Tees D.F.J, Hammer D.A. "The state diagram for cell adhesion under flow: leukocyte rolling and firm adhesion". PNAS. 97 (21) (2000) 11262-11267.

[13]: Schnittler H.J., Wilke A., Gress T., Suttorp N., Drenckhahn "Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium". The journal of physiology 431 (1) (1990) 379-401.

[14] Dimmler S., Hermann C., Galle J., Zeiher A.M. "Upregulation of Superoxide Dismutase and Nitric Oxide Synthase mediates the Apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells". Atheroscerosis Thrombosis Vascular Biology 19 (1999) 656-664.

[15] Malek AM., Izumo S., Alper S.L. "Modulation by pathophysiological stimuli of the shear stress-induced up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells". Neurosurgery 2 (45) (1999) 334-344.

[16] Ziergler T., Silacci P., Harrison V., J., Hayoz D. "Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. Third workshop on structures and function of large arteries: part II". Hypertension. 32 (1998) 351-355.

[17] Saijonmaa O., Nyman T., Hohenthal U., Fyhrquist F "Endothelin-1 is expressed and released by a human endothelial hybrid cell line (EAhy 926)". Biochemical and biophysical research communications 181(2) (1991) 529-536.

[18] Bouaziz A., De Ficquelmont L., May M., Richert A., Caprani A. "Direct Physical Factors and PG12 and TXA2 Secretions by a Human Endothelial Cell Line : In Vitro Investigation of Pressure and Shear Stress Applied Independently or in Synergy". Trombosis Research (1998) 279-289.
[19] Mataki C., Murakami T., Umetani M, Wada Y., Ishii M., Tsutsumi S., Aburatani H., Hamakubo T., Kodama T. "A novel Zinc finger protein mRNA in human umbilical vein endothelial cells in profoundly induced by Tumor Necrosis Factor Alpha". J Atherosclerosis Thrombosis 2 (7) (2000) 97-103.
[20] Moutet M., D'Alessio P., Malette P., Devaux V., Chaudriere J. "Glutathione pereoxidase mimics prevent TNF-α and neutrophil-induced endothelial alterations". Free radical biology and medicine 25 (3) (1998) 270-281.
[21]Hoefen J R J., Pi X, Yoshizumi M, Yan Ch, Berk B C. "Fluid shear stress inhibits TNF-a activation of JNK but not ERK1y2 or p38 in human umbilical vein endothelial cells: Inhibitory crosstalk among MAPK family members". PNAS. 98 (11) (2001) 6476–6481.
[22]Kokura S., D'alessio P., Moutet M., Coudrier E., Darquenne S., Chaudriere J. "ICAM-1 and VCAM-1 expression induced by TNF- are inhibated by a glutathione peroxidase mimic". Free radical biology and medecine 24 (6) (1998) 979-987.
[23]Koichi K., Hisao K., Toshiyuki M. "Homocysteine respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis". GRP78/BIP and novel genes 271 (47) (1996) 29659-29665.
[24]Welch N.G., Loscalzo J. "Homocysteine and Atherothrombosis .Mechanisms of Disease". The New England Journal of Medicine 338 (15) (1997) 1042-1050
[25] Mikhail I.A., Escoble J. "Homocysteine and vascular disorders". African Journal of Nephrology 1 (1997) 72-77.
[26] Monnier N. «Homocystéinémie et maladie vasculaire au cours de l'insuffisance rénale terminale ». Dyalog 82 (1997).
[27]Sugiyama S., Kugiyama K., Ogata N., Doi H., Ota Y., Ohgushi M., Matsumura T., Oka H., Yasue H. "Biphasic regulation of transcription factor nuclear factor-κB activity in human endothelial cells by lysophosphatidylcholine through protein kinase C-mediated pathway". Arterioscler. Thromb. Vasc. biol. 18 (1998) 568-576.
[28]Zhao B., Bowden R.A., Stavchansky S.A., Bowman P.D. "Human endothelial cell response to gram-negative lipopolysaccharide assessed with cDNA microarrays". AJP-Cell Physiology. 281 (5) (2001) C1587-C1595.
[29] Chien S., Li S., Shyy YJ. "Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells". Hypertension 31 (1998) 162-9.
[30]Gulino D., Vernet T. «La VE cadhérine : un récepteur d'adhérence cellulaire essentiel aux fonctions biologiques des vaisseaux sanguins.Bioscopie1. c.e.a BIO ». Direction des sciences du vivant (lettre d'information scientifique. 14) (1997).
[31]Davies P.F., Mundelt T., Kenneth B A. "A mechanism for heterogeneous endothelial responses to flow in vivo and vitro". J. Biomechanics 28 (12) (1995) 1553-1560.
[32]Rinker K D., Prabhakar V, Truskey G A. "Effect of Contact Time and Force on Monocyte Adhesion to Vascular Endothelium". Biophysical Journal 80 (2001) 1722–1732.
[33]Morigi M., Zoja C., Figliuzzi M., Fappolo M., Micheleti G., Bontempelli M., Saronni M., Remuzzi G., Remuzzi A. "Fluid shear stress modulates surface expression of adhesion molecules by endothelial cells". Blood 85 (7) (1995) 1696-1703.
[34]Gonzales R., Wick T.M. "Homodynamic Modulation of Monocytic Cell Adherence To Vascular Endothelium". Annals of Biomedical Engeneering 24 (1996) 382-393.
[35]Ng C.K.D., Deshpande S.S., Irani K., Alevriadou B.R. "Adhesion of flowing monocytes to hypoxia-reoxygenation-exposed endothelial cells: role of Rac1, ROS, and VCAM-1". AJP-Cell Physiology 283 (1) (2002) C93-C102.

[36] Blanchemaison P. La physiopathologie veineuse 48 (1) (1995) 87-88.
[37] Nagel T., Resnich N.,.Atkinson J.W., Dewey C.F., Gimbrone A.M. "Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells". J. Clin. Invest. 94 (1994) 885-891.
[38] Cotran R.S, Mayadas-Northon T. "Endothelial Adhesion Molecules In Health And Disease". Path. Biol. 46 (3) 1998 164-170.
[39] Granger D.N., Eppihimer J M. "In vivo measurements of endothelial cell adhesion molecule expression Biological Activity". Methods in enzymology 301 (1999) 14-22.
[40] Nemeth Z.H, Deitch E.A., Lu Q., Szabo C., Hasko G. "Na+/H+ exchanger blockade inhibits chemokine production and NFκB activation in immunostimulated endothelial cells".AJP-Cell. Physiology (2002).
[41]Reinhardt Paul H., Kubes Paul. "Differential leukocyte recruitement from whole blood via endothelial adhesion molecules under shear stress conditions". Blood 92 (12) (1998) 4691-4699.
[42] Hsiai T.K., Cho S.K., Reddy S., Hama S., Navab M., Demer L.L., Honda H.M., Ho C.M. Pulsatil**e** Flow Regulates Monocyte Adhesion to Oxidized Lipid-Induced Endothelial Cells. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 21 (2001) 1770.
[43]Wang X., Stoltz J.F. «Propriétés non-Newtoniennes du sang et contrainte pariétale dans un écoulement de Poiseuille ». Journal des maladies vasculaires 20 (1995) 117-121.
[44]Charara J., Doillon C., Lemay J., Ruel J., Dumas G. «Effet de l'écoulement sur le devenir des cellules endothéliales : dispositifs d'études revue et commentaires ». RBM. 8 (15) (1993) 435-445.
[45]Tsao P.S., Lewis N.P., Alpert S., Cooke J.P**. "**Exposure to shear stress alters endothelial adhesiveness role of Nitric Oxide. Flow and monocyte adhesion". Circulation 92 (1995) 3513-3519.
[46]Fisslthaler, Dimmeler, Hermann, Busse, Fleming . "Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress". Acta Physiologica Scandinavica. 168 (1) (2000) 81.
[47]Vasa M., Breitschopf K., Zeiher A., Dimmeler S. "Nitric Oxide Activates Telomerase and Delays Endothelial Cell Senescence". Circ. Res. 87 (2000) 540-542.
[48]Davies P.F., Dull Randal O. "How does arterial endothelium sense flow? Homodynamic Forces And Signal Transduction. Tobacco smoking and atherosclerosis". Plenum Press.New York. 90 (1990) 281-293.
[49]Schnittler H.J. "Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium". Basic RES Cardiol. 13 (93) (1998) 30-9**.**
[50]Bausch A.R., Hellerer U., Essler M., Aepfelbacher M., Sachmann E. "Rapid stiffening of integrin receptor-actin linkages in endothelial cells stimulated". Biophysical journal 80 (2001) 2649-2657.
[51] Wang N., Butler J., Ingber D. "Mecanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton". Science, 260 (1993), 1124-1127.

[52]Kuchan M.J., Frangos J.A. "Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and GMP_C in cultured endothelial cells". Am. J. Phyiol. 264 (1993) H150-HI56.

[53]Wang JH, Goldschmidt-Clermont P, Wille J, Yin FC. "Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching". J Biomech 2001 34 (12) 1563-72.
[54]Grabowski E.F., Lam F.P. "Endothelial cell function, including tissue factor expression, under flow conditions". Thromb. Haemost. 74 (1995) 123-128.

[55]Kano Y, Katoh K, Fujiwara K. "Lateral zone of cell-cell adhesion as the major fluid shear stress-related signal transduction site". Circ Res 86(4) (2000) 425-33

[56]: Weiss, S.J. Oxygen ischemia and inflammation. Acta. Physiol. Scand. Suppl., 548 (1986), 9-37.
[57]: De Bono D.P., Yang W.D., Exposure to low concentration of hydrogen peroxide causes delayed cell death and inhibits proliferation of surviving cells. Atherosclerosis, 114 (2) (1995), 235-245.
[58]: Wegner J., Zink S., Rösen P., Galla H.J, Eur. J. Physiol. 437 (1999), 925-934.
[59] L. Tamisier, P. Bernabeu, A. De Cesare, A. Caprani, Responses to shear stress and histamine addition of cultured vascular endothelium-kinetic study using electrical impedance measurements, Electrochimica Acta 34 (1989) 1339-1350.
[60] I. Giaever and C.R. Keese, Micromotion of mammalian cells measured electrically, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 7896-7900.
[61] C. Tiruppathi, A.B. Malik, P.J. Del vecchio, C.R. Keese, and I. Giaever., Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: Assessment of endothelial barrier function, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 7919-7923.
[62] I. Giaever and C.R. Keese, Amorphological biosensor for mammalian cells, Nature 366 (1993) 591-592.
[63] I. Giaever and C.R. Keese, use of electric fields to monitor the dynamical aspect of cell behaviour in tissue culture, IEEE Proc. Biomed. Eng. 33 (1986) 242-247.
[64] R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, A. Shwinde, K. Stegbauer, B. Wolf, Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures. Biosens. Bioelectron. 12 (1997) 29-41.
[65] J. Wegener, S. Zink, P. RÖen, H. J. Galla, Use of electrical impedance measurements to monitor β-adrenergic stimulation of bovine aortic endothelial cells, Eur. J. Physiol. 437 (1999) 925-934.
[66]Pierres, A., A. M. Benoliel, and P. Bongrand. 1998a. *Current Opinion Colloid & Interface Sci.* 3:525-533.
[67] : Bongrand P. (1998), J. Dispersion Science & Technology, 19 : 963-978.
[68]: Alon, R., D. A. Hammer, and T. A. Springer (1995), Nature, 374 : 539-542.
[69] Bongrand P. (1999). Rep. Prog. Phys. 62 : 921-968.
[70] : Isacke C. M., Horton M. A. (2000) The adhesion molecule facts book. 2nd edition.
[71]Lawrence, M. B., and T. A. Springer (1991). Cell, 65: 859-873.
[72]Kaplanski G., C. Farnarier, O. Tissot, A. Pierres, A-M. Benoliel, M-C Alessi, S. Kaplanski, and P. Bongrand.(1993). Biophys. J., 64 : 1922-1933.
[73] Kaplanski G., Farnarier C., Benoliel A. M. , Foa C., Kaplanski S. & Bongrand P. (1994) A novel role for E- and P-selectins . J. Cell Sci. 107 : 2449-2457.
[74] Stossel T. P. Science 260 : 1086-1094, 1993.
[75] Ridley et al., 2003
[76] : Bell G. I., M. Dembo, and P. Bongrand (1984). Biophys. J. 45 : 1051-1064.
[77] : Hammer D. A., and D. A. Lauffenburger (1987). Biophys.J. 52 : 475-487.
[78] : Cozens-Roberts C., D. A. Lauffenburger, and J. A. Quinn (1990) Biophys. J. 58 : 841-856.
[79] : Dustin M. L., Golan D. E., Zhu D. M., Miller J. M., Meier W., Davies E. A. & van der Merwe P. A. (1997). J. Biol. Chem. 272:30889-30898.
[80]: Capo C., F. Garrouste, A. M. Benoliel, P. Bongrand, A. Ryter, and G. I. Bell (1982) Concanavalin A-mediated thymocyte agglutination : a model for a quantitative study of cell adhesion. J. Cell Sci. 26 : 21-48.
[81]: André P., A. M. Benoliel, C. Capo, C. Foa, M. Buferne, C. Boyer, A. M. Schmitt-Verhulst, and P. Bongrand(1990). Use of conjugates made between a cytolytic T cell clone and target cells to study the redistribution of membrane molecules in contact areas. J. Cell Sci. 97 : 335-347.

[82]: Pierres A. , P. Eymeric, E. Baloche, D. Touchard, A. M. Benoliel & P. Bongrand (2003) Cell membrane alignment along adhesive surfaces : active or passive mechanism ? Biophys. 84:2058-2070.
[83]: Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., et Watson J.D. Junctions cellulaires, adhérence cellulaire et matrice extracellulaire. Biologie moléculaire de la cellule. Flammarion médecines sciences Ed., Edition française, Chapitre 19 (1994) 949-1000.
[84] : Schakenraad J.M. Cells: their surfaces ns interactions with materials. Biomaterials Science, Chapitre 3, 1996, 141-147.
[85]: Scott-Burden T Extracellular matrix: the cellular environment Int. Union Physiol Sci./Am. Physiol. Soc., 9, 1994, 110-114.
[86] Polverini P.J.. Cellular adhesion molecules. Newly identified mediators of angiogenesis. Am. J. Pathol., 148 (4), (1996) 1023-1029.
[87]: Hemler M.E.. Structures and functions of VLA proteins and related integrins. receptors of Extracellular Matrix, (1991)255-261.
[88]: Van Loosdrecht M.C.M , Norde W *et* ZehnderA.J.B., Physical chemical description of bacterial adhesion. Journal of Biomaterials Applications, 5 (2), 1990, 91-106.
[89]: Schakenraad J.M., Busscher H.J., Wildevuur C.R. and Arends J. thermodynemic aspects of cell spreading on solid substrata. Cell biophysics, 13 (1) (1988) 75-91
[90]: Busscher H.J., Weekamp A.H, Van der Mei H.C., Van pelt A.W., De Jong H.P et Arends J. Measurement of the surface free energy of baacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. Appl. Environ. Micobiol., 48 (5) (1984a) 980-983
[91]: Schakenraad J.M., Kuit J.H., Arends J., Busscher H.J., Feijen J. et Wildevuur C.R. In vivo quantification of cell-polymer interactions. Biomaterials, 8,3, 1987,207-210
[92] Lydon M.J., Minett T.W. et Tighe B.J. (1985). Cellular interactions with synthetic polymer surfaces in culture. Biomaterials, 6 (6), 396-402.
[93] Ratner B.D. (1993). New ideas in biomaterials science-B a path to engineered biomaterials. J. (7), 837-850.
[94] : Ponsonnet L., Comte V., Othmane A., Lagneau C., Charbonnier M., Lissac M. et JaffrezicN. (2002). Effect of durface topography and chemistry on adhesion, orientation and growth of fibroblasts on nickel-titanium substrates. Materials Science and Engineering C, 21, 157-165.
[95]:Von Andrian U. H., S. R. Hasslen, R. D. Nelson, S. L. Erlandsen, and E. C. Butcher (1995). A central role for microvillus receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. Cell 82 : 989-999.
[96]: Yauch RL, Felsenfeld DP, Kraeft SK, Chen LB, Sheetz MP & Hemler ME (1997) Mutational evidence for control of cell adhesion through integrin diffusion/clustering independent of ligand binding. J. Exp. Med.186 : 1347-1355.
[97] : Rieu P., F. Porteu, G. Bessou, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli (1992). Human neutrophils release their major membrane sialoprotein, leukosialin (CD43), during cell activation. Eur. J. Immunol. 22 : 3021-3026.
[98]: Sabri S., M. Soler, C. Foa, A. Pierres, A. M. Benoliel, and P. Bongrand. 2000. Glycocalyx modulation is aphysiological means of regulating cell adhesion. *J. Cell Sci.* 113:1589-1600.
[99]: Crowley E., and A. F. Horwitz (1995). Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal tension regulate the release of fibroblast adhesions. J. Cell Biol. 131 : 525-537.
[100]: Cai T-Q. and S. D. Wright (1996) Human leukocyte elastase is an endogenous ligand for the integrin CR3(CD11b/CD18, Mac-1, αMβ2) and modulates polymorphonuclear leukocyte adhesion. J. Exp. Med. 184 :1213-1223.
[101]: Rees D. A., C. W. Lloyd, and D. Thom (1977) Control of grip and stick in cell adhesion through lateral relationships of membrane glycoproteins. Nature 267 : 124-128.

[102] : Ponsonnet L., Reybier K., Jaffrezic N., Comte V., Lagneau C., Lissac M. et Martelet C.(2003). Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell bahaviour. Materials Science and Engineering C, 23, 551-560.
[103]: Curtis A. et Wilkinson C. (1997). Topographical control of cells. Biomaterials, 18 (24), 1573-1583.
[104]: Anselme K., Bigerelle M., Noel B., Dufresne E., Judas D., Iost A. et Hardouin P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. J. Biomed. Mater. Res., 49 (2) (2000), 155-166.
[105]: Deligianni D.D., Katsala N.D., Koutsoukos P.G. et Missirlis Y.F. (2001). Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. Biomaterials, 22 (1), 87-96.
[106] : Wirth C., Comte V., Lagneau C., Exbrayat P., Lissac M., Jaffrezic-Renault N. et Ponsonnet L. (2004). Nitinol surface roughness modulates *in vitro* cell response : a comparison between fibroblasts and osteoblasts. Materials Science and Engineering C
[107]: Von Recum A.F. et Van Kooten T.G. "The influence of mico-topography on cellular response and the implications for silicone implants", Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, 7 (1995), 181-198.
[108]: Curtis A. et Willkinson C., "Topographical control of cells", Biomaterials 18 (1990), 1573-1583.
[109]: Salthouse T.N. "Some aspects of macrophage behaviour at the implant interface", Journal of Biomedical Materials Research 18 (1984), 395-401.
[110]: Woodward S.C., "Evaluation by light microscopy. Dans Handbook of Biomaterials Evaluation. Scientific, Technical, and Clinical Testing of Implant Materials (Von Recum A.F., Anderson J.M., Ash S.R., Cooke F.W., Gross U.M., Laberge M., et Lawrence W.H., Eds). 2ème edition: Taylor & Francis, Philadelphia, Pennsylvania, USA.pp 599-612.
[111]: Anderson J.M. "Inflammation and the foreign body response", Problems in General Surgery 11 (1994a), 147-160.
[112]: Sharkawy A.A., Klitzmann B., Truskey G.A., et Reichert W.M. "Engineering the tissue which encapsulates subcutaneous implants. II. Plasma-tissue exchange properties", Journal of Biomedical Materials Research 40 (1998), 586-597.
[113] : Adamson A.W., Physical Chemistry of Surfaces, John Wiley & Sons Inc. (éditeur), New York, 1990, pp. 329-420.
[114]: Blouet J., "Microgéométrie et Rugosimétrie" dans; "Méthodes et Caractérisation de surfaces», David et caplain (éditeur), Eyrolles, 1988, pp. 270-289.
[115] : Béranger G., « la notion de surface » dans ; "Méthodes et Caractérisation de surfaces», David et caplain (éditeur), Eyrolles, 1988, pp. 1-11.
[116] : Cargill R., Dee C.K., Malcolm S. An assessment of the strength of NG 108-15 cell adhesion to chemically modified surfaces, Biomaterials 20 (1999), 2417-2425.
[117]: Groth, Th., Altankov G., Klosz K., Adhesion of human periphera blood lymphocytes is dependent on surface wettability and protein preadsorption, Biomaterials 1994 vol 15 (6) 423-428.
[118]: Ruardy T.G., Schakenraad J.M., Vander Mei H.C., Buscher H.J., Adhesion and spreading of human skin fibroblast on physiochemically characterized gradient surfaces, Journal of Biomedical Materials Research 29 (1995), 1415-1423.
[119]: Linder S. Pinkowski W., Aepfelbacher M., Ashesion cytoskeletal architecture and activation status of primary human macrophages on a diamond like carbon coated surfaces (DLC), Biomaterials 23 (2002), 767-773.
[120]: Dubois J.C., Souchier C., Couble M.L., Exbrayat P., Lissac M., An image analysis method for the study of cell adhesion to biomaterials, Biomaterials 20 (1999)1841-1849.

[121]: H.G. Hansma, R. Golan, W. Hsiech, C.P. Lollo, P. Mullen-Ley and D. Kwoch, DNA condensation for gene therapy as monitored by atomic force microscopy, Nucleic Acid Res., 26 (1998), p. 2481.
[122]: B. Pignataro , L. Chi, S. Gao, B. Anczy, Kowski, C. Niemeyer, M. Adler, H. Fuchs, Dynamic scanning force microscopy study of self-assembled DNA-protein nanostructures, Applied Physics A, 74 (2002), p. 447.
[123]: F. Moreno-Herrer, J.Colchero and A.M. Bard, DNA height in scanning force microscopy , Ultramicroscopy , 96 (2003), p. 167.
[124]: R. Garcia and P. Pérez, Dynamic atomic force microscopy methods; Surface Science Reports, 47 (2002), p.197.
[125]: C. Bustamante, J. Vesenka, C.L. Tang, W Rees, M. Guthold and R. Keller, Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy, Biochemistry, 31 (1992), p. 22.
[126]: J.D. Andrade, College of Engineering, University of Utah, Salt Lake City, Utah 84112, "Polymers In Medicine II, Biomedical and Pharmaceutical Applications", Plenum Press, New York and London
[127]: Van Wagenen, R.A. Rockhord et Andrade J.D., Probing protein adsorption. II-Total internal reflection fluorescence. Amer. Chem. Soc. Adv. Chem. 199 (1982) 351.
[128]: Vroman L., Adams A.L., Klings M., Fisher G.G., Munoz P.C. et Solensky R.P. Reactions of formed elements of blood with plasma proteins at interfaces. Ann. N.Y. Acad. Sci., 283 (1977), 65.
[129]: Leonard E.F. et Vroman L., Is the Vroman effect of importance in the interaction of blood with artificial materials? J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 3 (1) (1991), 95-107.
[130]: Brach J., Role of plasma protein adsorption. dans Sharma C.P., Szycher M. (Eds): Blood compatible materials and devices: Perspective towards the 21st century, 3-25.
[131]: Hoffman A.S., A general classification schema for "hydrophilic" and "hydrophobic" biomaterial surfaces, J. Biomed. Mater. Res., 19 (1986), 211-228.
[132]: Hoffman A.S., Modification of material surfaces to affect how they interact with blood. Ann. N.Y. Acad. Sci., 516 (1987), 96-101.
[133]: Klee D. et Höcker H., Polymers for biomedical applications: improvement of the interface compatibility, dans Eastmond G.C., Klee D. et Höcker H. (Eds): Biomedical Applications Polymer Blends., 1-57.
[134]: Mc Farland C.D., Thomas C.H., DeFilippis C. Steele J.G. et Healy K.E. Protein adsorption and cell attachement to patterned surfaces. J. Biomed. Mater. Res. 49 (2000), 200-210.
[135]: Kikuchi A., Taira H., Tsuruta T., Hayashi M., Kataoka K., Adsorbed serum protein mediated adhesion and grown behaviour of bovine aortic endothelial cells on polyamine graft copolymer surfaces. J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 8 (1996), 77-90.
[136]: Garcia A.J., Ducheyne P. et Boettiger D. ; Effect of surface reaction stage on fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass., J. Biomed. Mater. Res. 40 (1) (1998), 48-56.
[137]: Iuliano D.J., Saavedra S.S., et Truskey G.A. Effect of the conformation and orientation of adsorbed fibronectin on endothelial cell spreading and the strength of adhesion. J. Biomed. Mater. Res. 27 (1993), 1103-1113.
[138]: Grinnel F. et Feld M.K., Adsorption characteristics of plasma fibronectin in relationship to biological activity. J. Biomed. Mater. Res. 15 (1981), 363-381.
[139]: Burmeister J.S., McKinney V.Z., Reichert W.M., et Turskey G.A., Role of endothelial cell-substrate contact area and fibronectin-receptor affinity in cell adhesion to HEMA/EMA copolymers. J. Biomed. Mater. Res. 47 (1999), 577-584.
[140]: Nomura H., Ishikawa C., Komatsuda T., Ando J., Kamiya A. A disk-type apparatus for applying fluid shear stress on cultured endothelial cell. Biorhéology 25 (1988) 461-470.

[141]: Ono O., Ando J., Kamiya A., Kuboki Y., Yasuda H. Flow effects on cultured vascular endothelial and smooth muscle cell functions. Cell. Stuct. Funct. 16 (1991) 365-374.
[142]: Rupnick M.A., Hubbard F.A, Prath K., Jarrell B.E., Stuart K.W. Endothelialization of vascular prosthetic surfaces after seeding or sodding with human microvascular endothelial cells. J. Vasc. Surg. 9 (1989) 88-795.
[143]: Schnittler H.J., Franke R.P., Akbay U., Mrowiertz C., Drenchhahn D. Improved in vitro rheological system for studying the effect of fluid shear stress on cultured cells. Am. J. physiol. 265 (1993) C289-98.
[144] : Claaec M. Genèse de l'athérosclérose: notions récentes.Angio-physio. Act. Med. Int. Angiologie. 13 (226) (1996) 4510-4514.
[145]: Tha S. P., J. Shuster, and H. L. Goldsmith (1986). Interaction forces between red cells agglutinated by antibody. IV Time and force dependence of break-up. Biophys. J. 50 : 1117-1126.
[146]: Kaplanski G., C. Farnarier, O. Tissot, A. Pierres, A-M. Benoliel, M-C Alessi, S. Kaplanski, and P. Bongrand.(1993) Granulocyte-endothelium initial adhesion. Analysis of transient binding events mediated by Eselectinin a laminar shear flow. Biophys. J., 64 : 1922-1933.
[147]: Bongrand P. (1999) Ligand-receptor Interactions. Rep. Prog. Phys. 62 : 921-968.
[148]: Pierres A., H. Feracci, V. Delmas, A. M. Benoliel, J. P. Thiéry, and P. Bongrand. 1998c. Experimental study of the interaction range and association rate of surface-attached cadherin 11. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*95:9256-9261.
[149]: Sato M, Ohshima N. Viscoelastic properties of culture porcine aortic endothelial cells exposed to shear stress. Journal of biomecanics 29 (1996) 461-467.
[150]: Evans, E., D. Berk, and A. Leung (1991). Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. I - Forces to rupture molecular-point attachments. Biophys. J. 59 : 838-848.
Florin E. L., V. T. Moy, and H. E. Gaub.(1994) Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs.Science 264 : 415-417.
[151]: Henderson E., (1994), Imaging of living cells by atomic force microscopy. Prog. Surf. Sci. 46 : 39-60..
[152]: Andrade J.D., Smith L.M. et Gregonis D.E., Surface and interfacial aspects of biomedical polymers-surface chemistry and physics-vol 1. Plenum Press, New York, 1985, 249-336.
[153]: Extrand C.W. et Kumagai Y., Liquid drops on an inclined plane : the relation between contact angles, drop shape, and retentive force. Journal of Colloid and Interface Science 170 (1995), 515-521.
[154]: Busscher H.J., van Pelt A.W.J., de Boer P., de Jong H.P., et Arends J., the effect of surface roughening of polymers on measured contact angles of liquids. Colloids and Surfaces, 9 (4) (1984b), 319-331.
[155]: Vergelati C., Perwuelz A., Vovelle L., Romero M.A., et Holl Y., Poly(ethylene terephtalate) surface dynamics in air and water studied by tensiometry and molecular modelling. Polymer, 35 (2) (1994), 262-270.
[156]: Extrand C.W. et Kumagai Y., Contact angles and hysteresis on soft surfaces. Journal of Colloid and Interface Science 184 (1996), 191-200.
[157]: M. Soler, S. Jego, B. Vacher, L. Ponsonnet, M. Fraterno, P. Bongrand; JM Martin, C. Foa. "Adhesion-related glycocalyx study : quantitative approach with imaging-spectrum in the EFTEM". *FEBS Letters* 429 (1998) 89-94.

CHAPITRE II

METHODOLOGIES

L'adhésion des cellules aux surfaces solides et à d'autres cellules est un phénomène d'une grande complexité fortement influencé par les propriétés et les capacités biologiques multiples des cellules ainsi que par les caractéristiques physicochimiques des surfaces.

Nous commençons par la présentation du substrat utilisé et sa fonctionnalisation puis nous détaillerons les trois méthodes de mouillabilité qui nous ont permis de définir ses propriétés physicochimiques, ainsi que l'AFM et deux méthodes hydrodynamiques (mesures biorhéologiques).

I- Caractérisations du substrat

I-1 Préparation et étude des propriétés physico-chimiques

I-1-1 Substrat en verre

a) Nettoyage de verre

Les substrats utilisés dans notre étude sont des lamelles de verre de très faible épaisseur et de coté 1,8 mm. Le protocole de nettoyage que nous avons adopté pour ce type de substrat consiste à rincer les substrats avec du chloroforme dans un bain ultrasonique pendant 10 min avant de les plonger dans une solution de Piranha H_2SO_4 / H_2O_2 : 7/3 pendant une dizaine des minutes dans un bain ultrasonique après les avoir séché sous flux d'azote. Les échantillons seront ensuite lavés avec de l'eau ultra pure et séchés sous flux d'azote.

b) Etude physico-chimique

Afin d'étudier les propriétés physico-chimiques du verre nu, nous avons mené des mesures de mouillabilité établies par trois différents techniques : la goutte posée, le bulle captive et la tensiomètrie. Le verre présente une surface hydrophile. L'angle de contact du verre illustré par la méthode de la goutte posée est de 11°±2°. Par contre, la bulle captive induit un angle de 50°±2.7°. Cette valeur est voisine de celle donnée par le tensiomètre qui affiche 43,1° ± 0.86°. Ces valeurs plaident en faveur d'un procédé de nettoyage adéquat. L'angle de contact dépend du temps, du volume de la goutte déposée et du liquide sonde testé. La lamelle de verre présente une énergie de surface de l'ordre de 52,9 ± 1,058 mJ/m^2.

La figure II.1 illustre une séquence chronologique de l'étalement d'une goutte d'un liquide sonde sur la surface de verre.

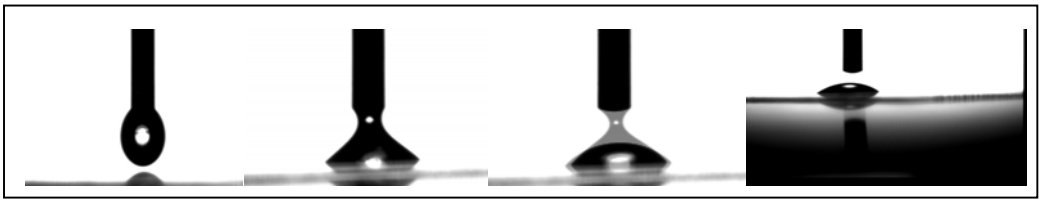


Figure II .1 : Photographie du dépôt d'une goutte sur une lamelle de verre

c) Etude morphologique par AFM

- Principe de la microscopie à force atomique (AFM)

Inventé en 1986 par Binning, Quate et Albrecht [1], le microscope à force atomique appartient à la famille des microscopes à champ proche. La microscopie à force atomique, que nous appellerons AFM, permet de mesurer les forces d'interaction d'origine atomique entre la pointe et l'échantillon. Cette pointe de forme pyramidale est généralement en nitrure de silicium. Les forces atomiques sont soit des forces de répulsions (Pauli) soit des forces d'attractions (Van der Waals) qui sont bien reproduites par le potentiel de Lennard-Jones.

La pointe est solidaire d'un levier dont le déplacement est mesuré par une méthode de réflexion utilisant un laser couplé à une photodiode. Contrairement au microscope à effet tunnel, qui mesure le courant tunnel entre une pointe et un échantillon tous les deux conducteurs, l'AFM est capable d'examiner avec la même résolution la surface de matériaux isolants comme les polymères ou les matériaux biologiques. L'AFM permet d'obtenir la topographie d'une surface grâce à la mesure du champ de forces présent entre la sonde constituée d'une pointe fine et la surface de l'échantillon.

La pointe supportée par un microlevier est placée presque en contact avec la surface. A l'échelle atomique, les forces dites de Van der Waals (forces locales autour des atomes) sont d'une importance toute particulière, comme présenter dans la figure II.2. En rapprochant la pointe de la surface, elle subit une attraction dès que la distance d est suffisamment petite, si nous continuons d'approcher la pointe, c'est une répulsion qui s'exercera sur elle. En règle générale, on travaille dans le domaine de répulsion, là où la sensibilité est la plus grande, et la pente à la courbe est suffisamment forte. Il faut donc un dispositif qui permette de mesurer la distance d et un entraînement mécanique capable de déplacer la pointe en x et y avec la précision exigée. En général, on utilise un élément piézoélectrique. Un montage en régulation se charge du bon fonctionnement, c'est à dire du maintien constant de la distance d. La force d'interaction entre la pointe et la surface est évaluée en mesurant la déflexion verticale du

levier. Pour mesurer la déflexion du levier, le faisceau d'une diode laser est focalisé sur l'extrémité de celui-ci et est réfléchi vers une diode photodétectrice sensible à la position constituée de deux quadrans. La déflexion du levier provoque un déplacement du faisceau réfléchi sur la diode et donc une variation de la différence de tension mesurée entre les deux quadrans. Au cours du balayage horizontal de l'échantillon, le signal sur la photodiode est mesuré et est comparé à un signal de référence. La figure II.3 montre schématiquement le dispositif décrit.

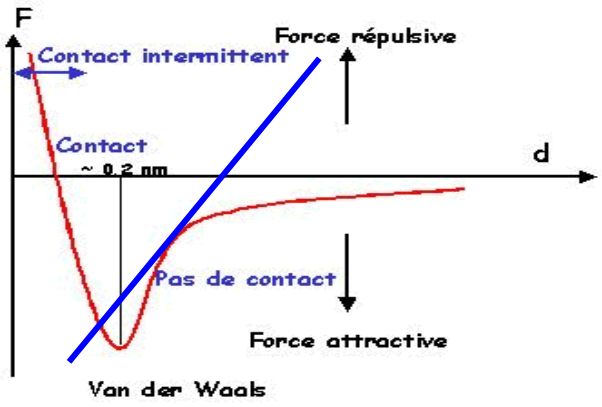


Figure II.2: Force entre une pointe et un échantillon en fonction de leur distance

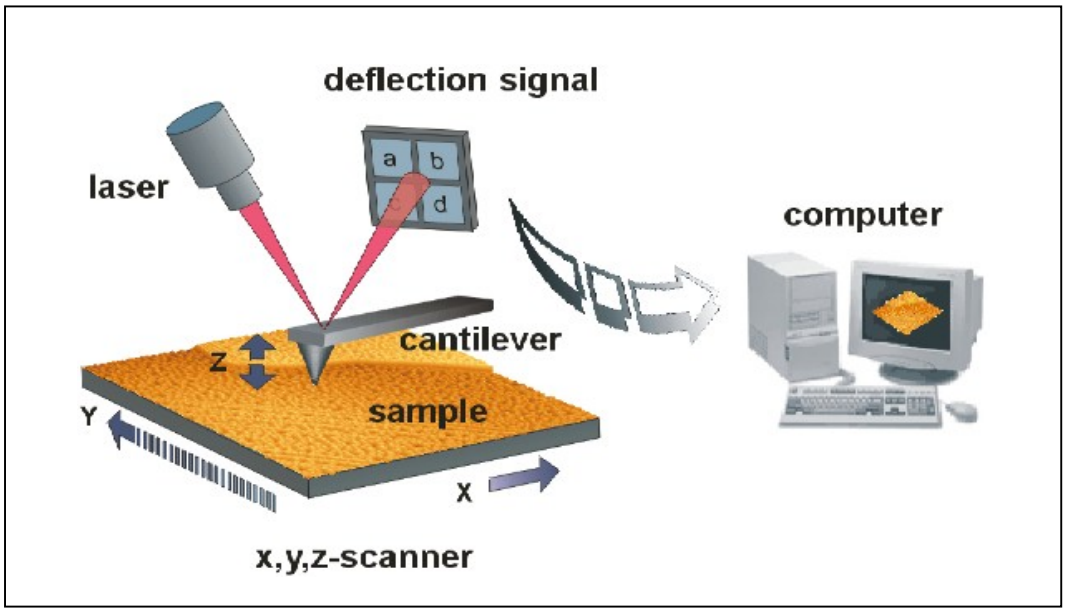


Figure II.3 : Schéma de principe d'un microscope de force atomique.

La figure II.4 montre une image de microscopie à force atomique (AFM) des substrats de verre nettoyés par le protocole décrit ci-dessus. Cette image topographique montre un état de surface homogène avec un taux de rugosité (RMS) de l'ordre de 2,6 nm.

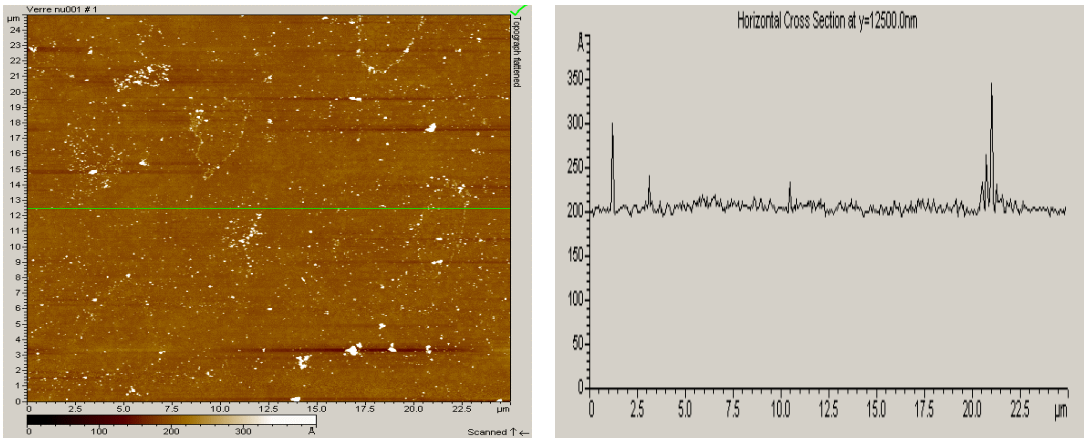


Figure II.4 : Image AFM d'un substrat de verre nu (à gauche), image de profil transverse (à droite).

I-1-2 Substrat d'or

a) Nettoyage de l'or

Les électrodes d'or utilisées sont élaborées par une évaporation d'une couche d'or, d'épaisseur 300 nm, sur des substrats de Si/SiO_2 en utilisant une couche d'accrochage de 30 nm de Titane (Ti). Ces électrodes d'or sont fournies par le Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS) à Toulouse. Une couche de résine est déposée sur la surface d'or afin de protéger cette surface pendant le transport. Le premier nettoyage consiste à enlever la couche de résine sur la surface d'or. Nous avons utilisé pour cela de l'acétone. L'échantillon est soumis à des ultrasons pendant 10 minutes. Il est ensuite séché sous flux d'azote (N_2). La deuxième étape de nettoyage est la plus importante. L'électrode d'or est nettoyée en utilisant le mélange "piranha". Cette solution est composée d'un mélange de 2/3 d'acide sulfurique concentré (96%), H_2SO_4, et de 1/3 d'eau oxygénée, H_2O_2. Le mélange est très exothermique. L'échantillon est laissé 1 minute dans la solution. L'échantillon est ensuite récupéré et abondamment rincé avec de l'eau ultrapure.

Un critère nécessaire d'un bon nettoyage est que la surface soit complètement mouillante. Si le film de liquide ne recouvre pas complètement la surface, il faut recommencer le nettoyage.

Attention, ce mélange "piranha" est extrêmement corrosif et peut réagir violemment avec des composés organiques. Il doit donc être manipulé avec précaution en prenant les protections qui s'imposent (hotte, gant, blouse, lunettes).

La caractérisation de la surface d'or après nettoyage est effectuée par spectroscopie d'impédance.

b) Etude physico-chimique

Les résultats de ces mesures montre qu'après le nettoyage, la surface d'or est de caractère hydrophile présentant un angle de contact inférieur à 10°.

Le tableau II.1 montre l'effet du nettoyage sur les valeurs et les images de l'angle de contact.

	Angle de contact de l'or nu avant nettoyage	*Angle de contact de l'or nu après nettoyage*
Angle de contact	*90° ± 3°*	*<10°*
Image de l'angle de contact		

Tableau II.1 : Effet de nettoyage sur valeurs et images de l'angle de contact

c) Etude morphologique

La figure II.5 montre une image de microscopie à force atomique (AFM) des substrats d'or nettoyés par le protocole décrit ci-dessus. Cette image topographique montre un état de surface homogène avec un taux de rugosité (RMS) de l'ordre de 11,6 nm.

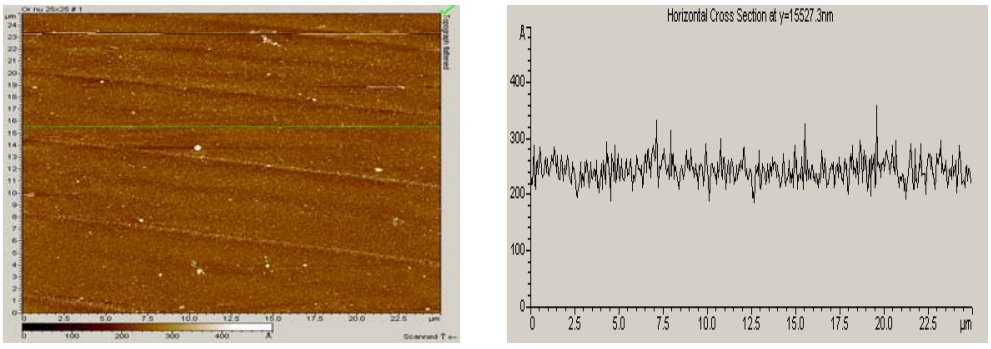


Figure II.5 : Image AFM d'un substrat d'or (à gauche), image de profil transverse (à droite).

II- Fonctionnalisation du substrat

- ✓ **Les monocouches auto-assemblées (SAMs)**

Des surfaces homogènes peuvent être réalisées par « auto-assemblage » de monocouches organiques (Self Assembled Monolayer, SAMs) [2,3]. L'auto-assemblage, ou formation spontanée de structures hiérarchiques complexes à partir de « briques » moléculaires est un phénomène omniprésent dans la nature. Lorsque ce processus se produit à l'interface solide/liquide, par adsorption de molécules tensioactives à partir d'une solution, il donne lieu à des assemblages moléculaires bidimensionnels qui peuvent être très ordonnés.

Dans des conditions adéquates (nature et propriétés des solvants, température de la solution) les monocouches se forment spontanément, dans un temps compris entre quelques minutes et plusieurs heures, par simple immersion d'un substrat solide dans une solution de molécules actives (voir figure II.6). Ces molécules sont généralement constituées d'une longue chaîne carbonée terminée par deux groupements chimiques : l'un a une affinité marquée avec la surface (groupement réactif), l'autre a des fonctions chimiques spécifiques qui seront celles de l'interface organique (groupement fonctionnel).

La force motrice du processus d'auto-assemblage est la réalisation de liaisons chimiques entre les groupements actifs des molécules de surfactant et la surface. Les forces d'interaction dispersives entre les chaînes alkyles sont responsables de la compacité et de l'ordre spatial de la monocouche. Ces propriétés remarquables font des SAMs des systèmes modèles pour l'étude des phénomènes interfaciaux tels que le mouillage [4]. Ces monocouches ont aussi trouvé une large application en biologie puisqu'elles peuvent être fonctionnalisées avec des molécules biologiquement actives. Ceci permet de mieux comprendre les phénomènes qui régissent l'adhésion des cellules et des protéines. Nombreuses sont donc les applications technologiques potentielles de ces couches auto-assemblées comme la réalisation de capteurs chimiques ou biologiques et l'élaboration de nouveaux biomatériaux [5,6].

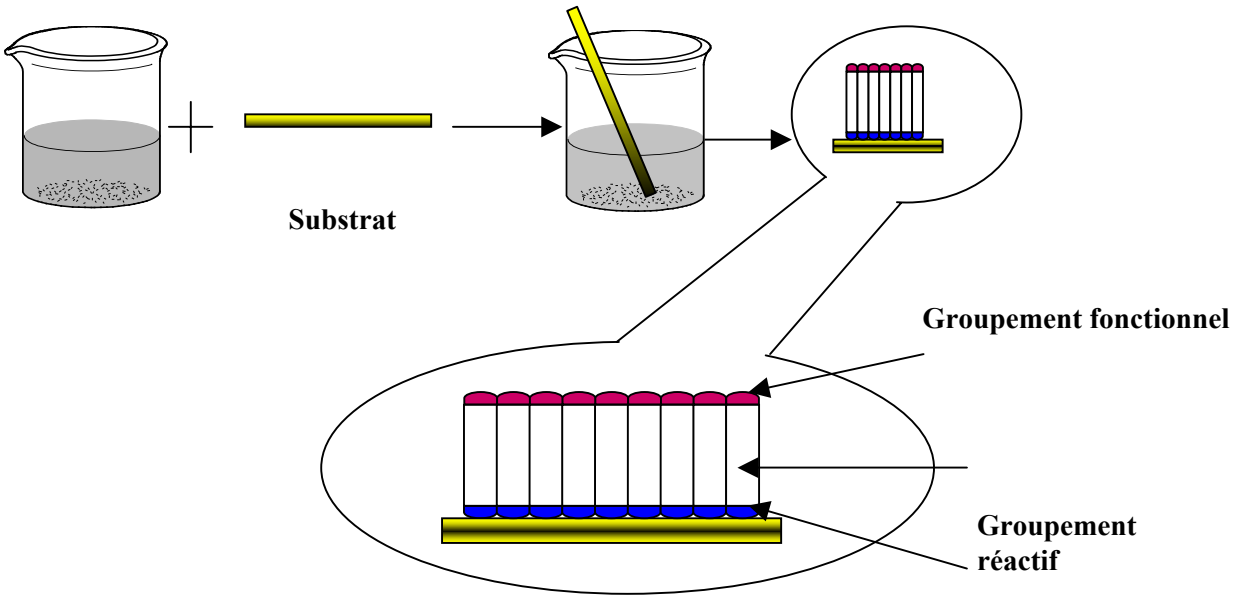


Figure II.6 : Les monocouches auto-assemblées (SAM) se forment spontanément par immersion du substrat dans une solution de molécules actives

- ✓ **Electrode d'or fonctionnalisée par du thiol**

Les monocouches auto-assemblées sont des structures monomoléculaires ordonnées se formant spontanément par adsorption sur une surface solide [7]. Les composés employés les plus utilisés sont les composés à base de soufre, les thiols (ou mercaptans) de formule générale R-SH. Ils se rencontrent dans de nombreux milieux organiques, dans les essences d'ail, de pamplemousse ou accompagnent les gaz domestiques en permettant la détection des fuites du fait de sa très forte odeur.

Les premières structures étudiées ont été les n-alcanethiols : $HS-(CH_2)_{n-1}-CH_3$ [8]. Par la suite, ce composé est resté la structure d'étude de référence même si des terminaisons R très variées ont été introduites (dithiol, alcool, carboxylique, benzénique), du fait de leurs nombreuses propriétés et applications potentielles [9,10].

- ✓ **Techniques d'études des monocouches auto-assemblées**

De très nombreuses techniques existent et sont utilisées pour caractériser les monocouches auto-assemblées [10-11]. Elles sont très souvent complémentaires, certaines ne donnant que des informations locales, d'autres décrivant la distribution spatiale des molécules. Aucune technique ne révèle toutes les propriétés de systèmes si complexes. Les techniques les plus employées sont basées sur :

- Les microscopies : microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy, AFM), à effet tunnel (Scanning Tunneling Microscopy, STM). Elles fournissent une image directe de la surface de la structure.
- Les techniques de diffraction telles la diffraction de rayons X (Grazing Incidence X-Ray Diffraction, GIXD), d'électrons de faibles énergies (Low Energy Electron Diffraction, LEED) ou encore d'atomes de faibles énergies (Low Energy Atom Diffraction, LEAD) permettent d'analyser en profondeur la périodicité atomique, l'épaisseur, les défauts….La diffraction d'atomes d'hélium (Helium Atom Reflectivity, HAR) détermine la morphologie de la surface à l'échelle atomique.
- La spectroscopie : des informations de la structure et de la croissance peuvent être obtenues par les nombreuses techniques spectroscopiques comme la spectroscopie infra-rouge (IR), la microscopie par génération de second harmonique (SHG), Raman (Surface Enhanced Raman Scattering, SERS)….

Ces techniques sont très performantes mais pour la plupart très lourdes à mettre en œuvre. De plus, elles ne sont pas exemptes de défauts comme par exemple la destruction ou la détérioration par contact de la pointe (AFM) ou par l'utilisation d'un faisceau trop énergétique (électrons). Nous avons aussi mentionné le fait que certaines de ces techniques ne donnent que des informations très locales.

II-1 Greffage de l'OTS

Les biomolécules sont attachées à la surface par l'intermédiaire d'un groupement chimique, appelé agent de couplage bifonctionnel. Cet espaceur présente une structure et une conformation qui offre d'avantage de degré de liberté stérique à la surface de verre.

Nous nous sommes alors attachés à établir un protocole de greffage permettant d'obtenir des couches denses et homogène de silane. Adopter le greffage de silane est donc un pré-requis pour étudier l'effet d'une protéine (déposée sur un substrat fonctionnalisé par des silanes puis du PS) sur l'adhésion cellulaire.

Les silanes C18 présentent deux facteurs favorables au greffage direct sur la surface de verre. Comme ce sont des chaînes courtes, l'énergie de cohésion entre les molécules est importante, les interactions entre chaînes seront donc importantes et le phénomène de réticulation peut se réaliser. De plus, le verre, présente un nombre de sites d'ancrage très important (environ 10^{14} site/cm²) et voisins.

On modifie le substrat avec une solution d'OTS (OTS, ®Aldrich, 10,481-7) de concentration 2 mM diluée dans le $CHCl_4$ pendant au moins deux heures. Puis on lave avec le même solvant et on sèche dans le four pendant deux heures à 100°C. En utilisant l'OTS on désire rendre le

substrat de verre hydrophobe afin de garantir une bonne fixation du polymère comme le polystyrène.

II-2 Greffage de thiol

Ce greffage a pour même objectif que celui de l'OTS : rendre la surface hydrophobe pour fixer le PS dessus, mais les thiols sont adaptés à l'or (électrode pour les meusres d'impédance) alors que l'OTS au verre.

II-3 Adsorption du polystyrène (Physiosorption)

Nous avons utilisé le polystyrène comme polymère à cause de ses propriétés optiques (transparence) et c'est un matériau de faible coût.

Le polystyrène est un thermoplastique dur bon marché. C'est un polymère vinylique. Il a une structure d'une longue chaîne d'hydrocarbones, avec un groupement phényle attaché sur certains atomes de carbone (voir figure II.7). Il est synthétisé par polymérisation radicalaire du monomère styrène. Il est caractérisé par une déformation thermique modérée, une bonne stabilité dimensionnelle, de la rigidité et de la résistance aux chocs.

On prépare une solution de polystyrène (Aldrich 327786) de concentration 1 g/l. En effet, le polystyrène possède un caractère hydrophobe évalué par les mesures d'angle de contact.

Le polystyrène fonctionnalisé par les protéines présente un bon modèle pour illustrer l'endothélialisation des prothèses cardiovasculaires.

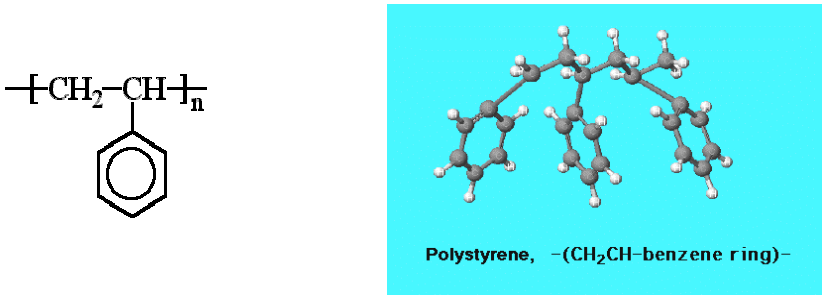


Figure II.7 : Structure chimique et conformationnelle de polystyrène.

II-4 Adsorption des protéines d'adhésion

On utilise cinq protéines différentes commercialisées par Sigma-Aldrich: la fibronectine, le collagène, l'immunoglobuline G, l'albumine et l'héparine à concentration de 5µgml^{-1}.

II-4-1 La fibronectine (du latin *fiber*, fibre, et *nectere*, joindre, connecter).

Structure

Les fibronectines sont composées de sous-unités polypeptidiques analogues ayant une masse moléculaire de l'ordre de 220 à 250 kD. Ces sous-unités sont liées par des liaisons disulfures

en dimères et en polymères d'ordre supérieur. Ce sont en fait des glycoprotéines complexes. Les fibronectines ont une structure remarquablement modulaire : elles contiennent 3 types de répétitions homologues (types I, II et III) qui sont les produits d'exons séparés.

Les données biophysiques spectroscopiques indiquent que les divers types de fibronectine ont une structure globale comparable. L'étude du comportement de ces molécules dans un champ de gravitation montre que la molécule n'est pas globulaire et qu'elle est relativement asymétrique. En microscopie électronique**,** le dimère de fibronectine plasmatique apparaît comme une molécule en forme de U, mince sans notable région globulaire. La molécule présente toutefois des sites de plus grande flexibilité dans les chaînes. Ceci suggère l'existence de régions flexibles séparant des domaines structurés plus rigides.

L'ensemble des méthodes physiques mises en œuvre indique que la fibronectine peut exister normalement comme une molécule pliée mais asymétrique et qui peut se déployer quand les interactions électrostatiques intramoléculaires sont rompues. Les configurations proposées comme modèles présentent la fibronectine comme une molécule dans laquelle des régions flexibles et désordonnées localisées entre les divers domaines de la molécules peuvent s'étirer ou se contracter. L'un des modèles imagine que les chaînes peuvent se replier sur elles-mêmes et sont maintenues en place par des attractions électrostatiques entre domaine aminoterminal et domaine carboxyterminal. Une autre proposition imagine que les bras de la molécule s'enroulent l'un autour de l'autre. Ces considérations sur la forme sont importantes dans l'optique d'un possible changement dans l'exposition des sites d'interaction avec d'autres molécules, après liaison d'un ligand ou clivage protéolytique.

La figure II.8 représente un schéma de structure de la fibronectine humaine.

Sites d'intéraction de la fibronectine

La fibronectine présente de sites d'interaction avec la cellule, le collagène, la fibrine, les glycosaminoglycannes sulfatés (héparine, héparane-sulfate), l'acide hyaluronique, etc.

Site d'interaction avec la cellule

La liaison de la fibronectine à la surface cellulaire exige l'intervention d'une région spécifique de la molécule, appelée "région de liaison à la cellule". La région se liant aux cellules peut convoyer l'attachement et l'étalement des cellules sur des substrats de plastique. Le domaine de liaison aux cellules est localisé dans la partie centrale de la molécule. La séquence primaire de ce domaine n'est pas particulièrement hydrophobe et suggère qu'il y existe une structure β.

Autres interactions de la fibronectine

Trois types d'interactions méritent d'être cités.

(a) Le premier concerne la fibronectine et les protéines du cytosquelette. La fibronectine se lie à l'actine. L'interaction se fait par le domaine aminoterminal de ces molécules. D'autres sites de liaison peuvent être révélés dans des conditions non physiologiques. L'existence d'interaction avec la myosine, la tropomyosine, l'actinine et la vinculine a été également rapportée.

(b) Le second a lieu entre la fibronectine et les polyamines**.**

(c) Enfin, la fibronectine est susceptible d'auto-association. Elle possède en effet un caractère très frappant, celui de s'arranger en fibrilles à la surface des cellules, arrangement qui résulte d'auto-interactions (*self-self*). Dans certains cas, les fibrilles de fibronectine peuvent être disposées parallèlement à des faisceaux intracellulaires de microfilaments.

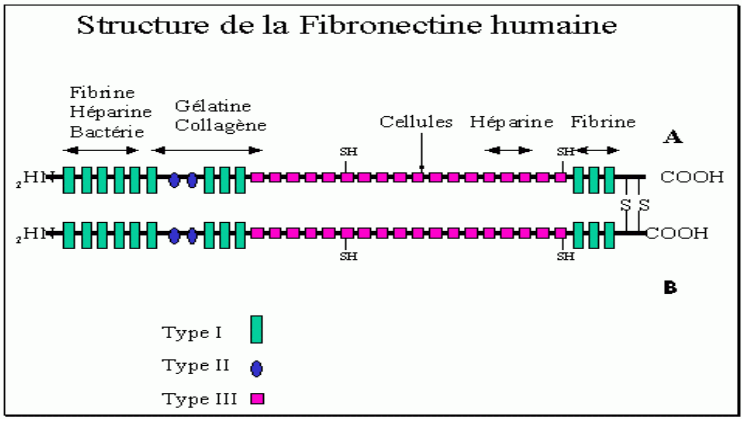


Figure II.8 : Structure de la fibronectine humaine

II-4-2 Le collagène

Structure

Un collagène peut être très simplement défini comme une protéine structurale extracellulaire dont les propriétés fonctionnelles dépendent significativement de l'existence d'un domaine ayant une structure en triple hélice. Outre ces segments à triple hélice, les collagènes contiennent aussi des domaines globuleux. Nombre de ces domaines sont de grande taille ; leur masse moléculaire s'étale de 10 à 150 kD par chaîne α. Des régions globuleuses plus petites peuvent être détectées par leur sensibilité aux protéases.

On distingue les collagènes qui engendrent des fibrilles présentant des bandes, et les collagènes disposés en réseaux de fibrilles dépourvues de bandes. Le collagène de type IV a un réseau fibrillaire sans bandes.

Le collagène de type IV a été le premier des collagènes à être localisé dans une structure spécifique, la membrane basale. On se bornera à exposer quelques indications utiles pour la culture cellulaire. La production de collagène de type IV par des cellules en culture a été décrite dans le cas des cellules endothéliales

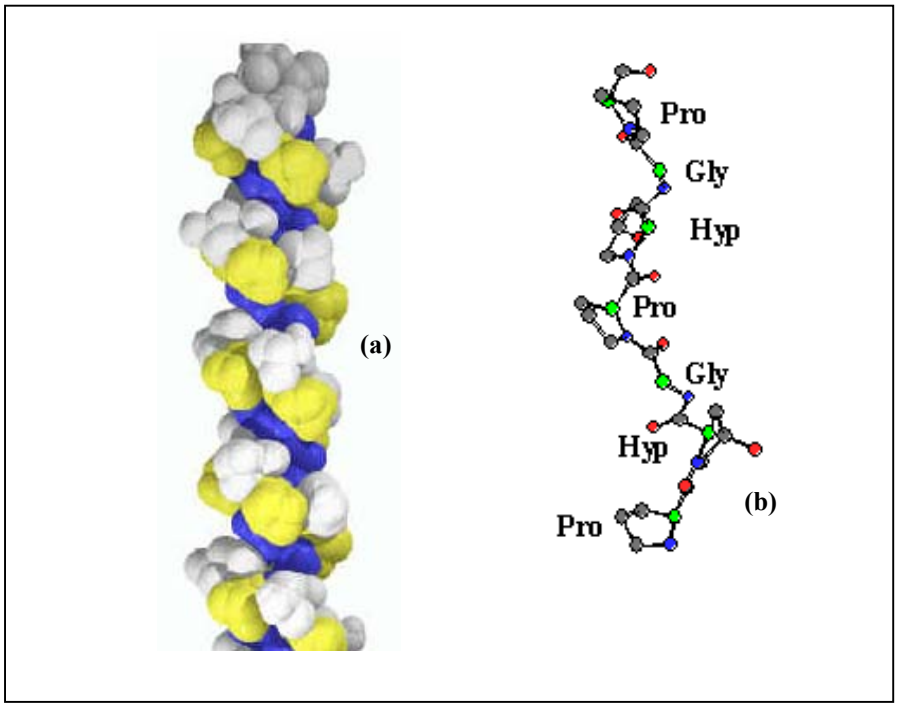


Figure II.9 : (a) Triple hélice de collagène (Gly (bleue), Pro (jaune), Hyp (blanc)), (b) composition de la triple hélice de collagène.

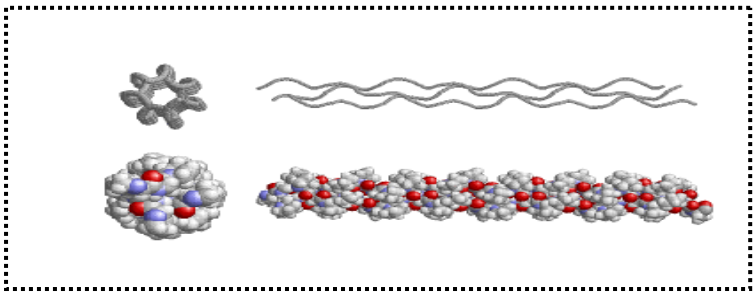


Figure II.10 : Structure fibreuse du collagène type IV

Les figures II.9 et II.10 montrent que la structure primaire des unités de base du collagène consiste en une répétition de la séquence suivante : $(Gly\text{-}x\text{-}y)_n$ où Gly est la Glycine, x est souvent la Proline et y est le souvent l'Hydroxyproline.

II-4-3 L'héparine

Les héparines sont très largement utilisées en pratique clinique depuis plus d'un demi-siècle et elles représentent un véritable standard dans la prophylaxie et le traitement anti-thrombotique.

La structure polysaccharidique plus ou moins richement sulfatée confère à l'héparine une affinitée accrue pour différentes structures biologiques. Ainsi, l'héparine se lie à de nombreuses protéines plasmatiques, des cellules du pool circulant, des cytokines et des chémokines. L'héparine est utilisée à la surface de certains cathéters, notamment ceux destinés à l'artère pulmonaire (cathéters de Swan Ganz). L'héparine prévient la thrombose en interagissant avec l'antithrombine, diminuant ainsi les dépôts de fibronectine.

A l'état natif, l'héparine est un protéoglycanne de masse moléculaire voisine de 10^6 dalton, comprenant un coeur protéique sur lequel sont fixées plusieurs chaînes polysaccharidiques dont la masse peut atteindre 100 000 dalton. Une molécule d'héparine est constituée par la répétition d'un motif disaccharidique de base comprenant un acide uronique et une glucosamine. La nature de l'acide uronique, la nature de l'unité de glucosamine ainsi que la position des esters sulfates portés par ces monosaccharides conduisent à envisager l'existence d'un grand nombre de structures disaccharidiques de base.

L'acide uronique est l'acide L-iduronique, remplacé quelquefois par l'acide D-glucuronique. Cet acide iduronique est lié par une liaison α-1,4 avec une glucosamine qui est liée à l'acide iduronique suivant. Un certain nombre de fonction alcool ou amine sont sulfatées : fonction amine de la glucosamine, fonction alcool primaire de la glucosamine, fonction alcool secondaire du carbone n° 3 de la glucosamine et quelquefois fonction alcool secondaire du carbone n° 2 de l'acide iduronique.

La figure II.11 illustre la structure chimique de la molécule d'héparine.

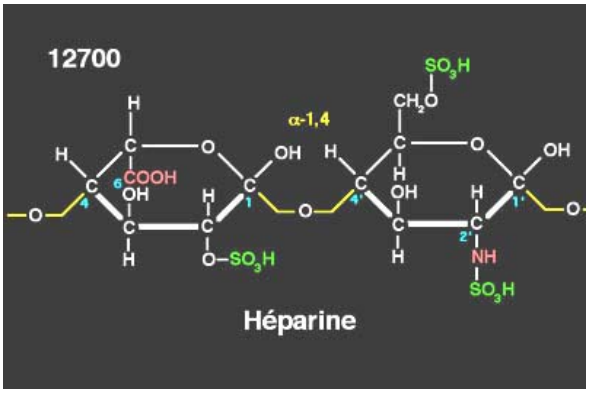


Figure II.11 : Structure chimique de l'héparine

II-4-4 L'immunoglobuline G

Les immunoglobulines (Ig) sont des protéines multimériques. En effet, les Ig sont constituées de 4 chaînes identiques 2 à 2. Ceci est montré dans la figure II.12 [12]:

- les chaînes lourdes ou "heavy" (H) formées de 446 acides aminés (environ)
- les chaînes légères ou "light" (L) formées de 214 acides aminés (environ)

Chaque chaîne légère est associée à une chaîne lourde par un pont disulfure intercaténaire. Il en est de même entre les deux chaînes lourdes au niveau de la région charnière.

Ces chaînes sont repliées en domaines de type sandwich ß d'environ 110 amino-acides, on a donc affaire à une superposition de 2 feuillets maintenue essentiellement par un pont disulfure intracaténaire et par interactions hydrophobes. La chaîne lourde est constituée de 4 domaines tandis que la chaîne légère n'en possède que 2.

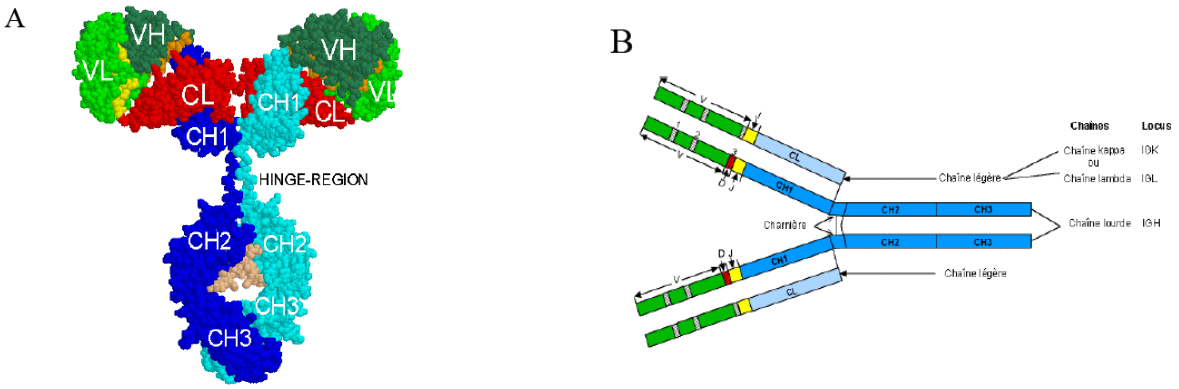


Figure II.12 : Structure des immunoglobulines (Ig), A : Représentation tridimensionnelle d'une IgG, B : Représentation bidimensionnelle d'une IgG, VH, VL : régions variables des chaines lourdes et légères, CH, CL : régions constantes des chaines lourdes et légères. Hinge : région charnière

Une molécule d'IgG, de nature protéique et d'un poids moléculaire de 150 000 daltons, est un dimère dont chaque monomère est constitué d'une chaîne lourde (H = heavy) comportant 440 à 450 acides aminés et d'une chaîne légère (L = light) de 200 à 220 acides aminés. Les deux monomères d'une même molécule d'IgG sont identiques entre eux (mêmes séquences protéiques).

Ces deux monomères sont solidarisés par deux ponts disulfure établis entre les deux chaînes lourdes. La molécule d'IgG peut être clivée par une enzyme, la papaïne, qui libère alors 3 fragments de tailles équivalentes : deux fragments identiques, constitué chacun d'une chaîne L et d'une première moitié de chaîne H et comportant chacun un site de reconnaissance de l'antigène (d'où leur nom de fragments Fab = Fragment antigen binding), et un fragment constitué des deux moitiés terminales des chaînes H, cristallisable (d'où son nom : Fc). Dans un fragment Fab, la chaîne lourde et la chaîne légère sont solidarisées, à la base, par un pont disulfure. Chaque chaîne lourde possède, entre les fragments Fab et Fc une partie flexible

renfermant un certain nombre de résidus proline, acides aminés dont la structure empêche le repliement de la molécule à cet endroit, tout en permettant une certaine mobilité : les fragments Fab peuvent donc prendre une orientation différente par rapport à Fc. Cette flexibilité permet d'adapter l'écartement entre les deux sites de reconnaissance en fonction de l'encombrement de l'antigène.

II-4-5 L'albumine

L'albumine est la protéine sérique la plus abondante. Celle du boeuf migre de la même façon (même vitesse) que celle du lapin (ou d'un autre mammifère), vers l'anode, quand on réalise une électrophorèse. Le modèle 3D du sérum albumine humaine (le seul disponible à ce jour) doit être assez proche de celui des albumines sériques présentes chez les autres mammifères. Elle est synthétisée par le foie. La figure II.13 montre la structure de l'albumine.

Bos et al. [13] ont reporté l'amélioration de la prolifération des cellules endothéliales qui ont été cultivées sur des substrats recouverts d'héparine-albumine en présence de facteur de croissance (voir figure II.14).

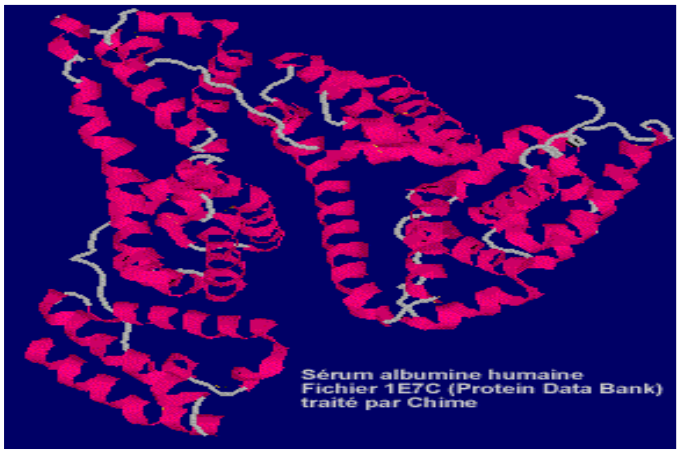


Figure II.13 : Structure de l'albumine [12]

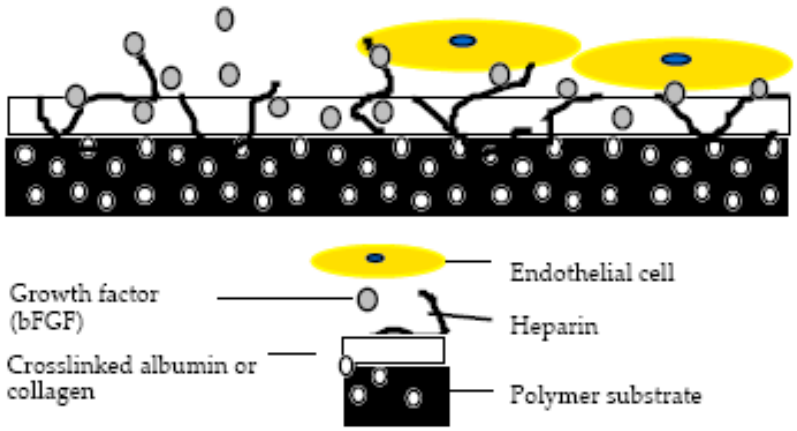


Figure II.14 : Représentation schématique des cellules endothéliales avec l'albumine et l'héparine [14]

III- Contrôle de la fonctionnalisation du substrat

La caractérisation des surfaces est un élément essentiel qui permet une meilleure compréhension des réactions qui ont lieu au niveau de l'interface des biomatériaux. Ces dernières années, les méthodes d'analyse des surfaces ont connu un essor extraordinaire avec la venue d'appareils de plus en plus sophistiqués et performants. Plusieurs méthodes permettent notamment une exploration approfondie des couches de surface. La profondeur analysée pouvant aller de quelques couches atomiques à quelques nanomètres. Le choix de l'un d'entre eux dépend essentiellement de la nature de l'information recherchée.

III-1 Mesure d'angle de contact par la méthode de la goutte posée

III-1-1 Principe de la méthode de la goutte posée

Cette balance de forces, extrêmement simple, fut proposée d'abord par Thomas Young en 1805. Sa précision, sa versatilité et la facilité avec laquelle elle permettait de déterminer l'énergie libre d'adhésion entre liquides et solides exactement à leur interface d'interactions ont été, jusqu'à ce jour, difficiles à reproduire par une autre méthode.

Le principe de cette technique consiste à déposer, sur le matériau à étudier, une goutte d'un liquide sonde et de mesurer l'angle de raccordement à la jonction des phases solide/liquide/vapeur. Pour la mesure de l'angle de contact, nous utilisons une méthode simple basée sur la photographie d'une goutte de dimensions définies. Pour cela, un appareil de la société GBX à Romans (appareil Digidrop) est utilisé. Une goutte de 2 µL d'un liquide sonde est déposée à l'aide d'une seringue. L'image de la goutte est capturée par une caméra vidéo. La procédure de mesure est répétée 20 fois. L'angle de contact et l'erreur expérimentale sont déterminés pour tous les matériaux.

Le profil de la goutte va varier en fonction des forces d'origine moléculaire (Van der Waals, liaisons « accepteur-donneur » d'électrons, électrostatique et les forces structurales) et d'origine topologique (de conformation).

Cette technique nous permet de déterminer :

- Le caractère hydrophile/hydrophobe des différentes surfaces.
- L'énergie libre totale des surfaces étudiées et ses composantes.

- *Caractère hydrophile/hydrophobe d'une surface :*

La nature hydrophile d'une surface est généralement décrite en terme de mouillabilité avec l'eau. La mouillabilité peut être considérée comme un phénomène d'étalement où l'angle de contact à l'avancée est déterminé en utilisant la méthode de la goutte posée. La surface est considérée hydrophile si l'eau s'étale spontanément sur celle-ci, ce qui équivaut à obtenir un

angle de contact proche de zéro et un coefficient d'étalement supérieur à zéro. Le coefficient d'étalement détermine, selon son signe, l'amplitude de l'étalement (mouillage) du liquide sur le substrat. Lorsque l'angle de contact est important ou que le coefficient d'étalement est inférieur à zéro, on dira de la surface qu'elle est hydrophobe.

- *L'énergie libre totale des surfaces et ses composantes :*

L'énergie de surface résulte des forces d'attraction et de répulsion existantes entre les matériaux présents au voisinage de la zone de séparation de chacune des phases. Cette énergie est représentée par la tension superficielle, dans le cas d'un liquide en équilibre avec sa phase vapeur ou par la tension interfaciale pour des systèmes solide-liquide ou liquide-liquide non miscibles. La mesure de l'énergie libre de surface d'un solide est déduite de la mesure de l'angle de contact de liquides sondes de tension superficielle connue sur le solide. La mesure de l'angle de contact se fait à la jonction de trois phases : liquide, solide et gazeuse, mises en jeu lorsque le liquide sonde est déposé sur le solide. En somme, la détermination de l'angle de contact permet d'évaluer l'affinité d'une surface vis-à-vis d'un liquide sonde, comme c'est indiqué dans la figure II.15.

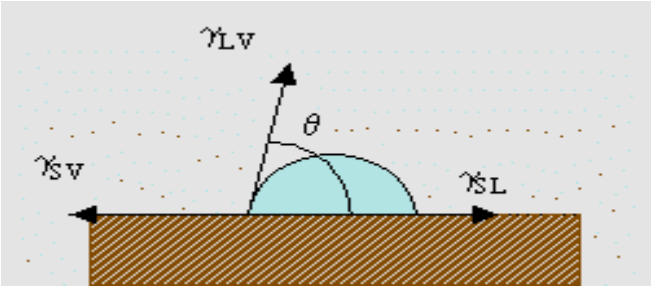


Figure II.15 : Dépôt d'une goutte de liquide sonde sur une surface.

L'équilibre d'une goutte de liquide déposée sur une surface est décrit par l'équation de Young

$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos\theta$ (1)

Avec :

γ_{SV} : la tension superficielle du solide en présence de la vapeur du liquide.

γ_{SL} : l'énergie libre interfaciale entre le solide et le liquide.

γ_{LV} : la tension superficielle du liquide en présence de sa vapeur.

θ : l'angle de contact.

Or, l'énergie de surface du solide dans le vide/air est réduite suite à l'adsorption de vapeur du liquide. On a alors : $\gamma_{SV} = \gamma_S - \Pi_{SV}$ avec Π_{SV} : la pression d'étalement du liquide sur le solide. Selon C.J. Van Oss , Π_{SV} est considérée comme négligeable car les polymères ont une énergie libre de surface faible [15]. Nous assimilerons donc lors de notre étude γ_{SV} à γ_S. Lors de la dépose d'une goutte de liquide sonde sur la surface, une interface est créée consommant une quantité d'énergie : γ_{SL}. Le travail d'adhésion réversible entre le solide et le liquide correspond au travail qu'il faut fournir pour séparer une unité d'aire de l'interface solide/liquide en interfaces solide/vapeur et liquide/vapeur. Cette valeur est donnée par la relation de Dupré :

$$W_{SL} = \gamma_{SV} + \gamma_{LV} - \gamma_{SL} \quad (2)$$

La combinaison des équations (1) et (2) conduit à la relation de Young-Dupré :

$$W_{SL} = \gamma_{LV}(1 + \cos\theta)$$

F.M. Fowkes a proposé que la tension de surface d'un liquide polaire ou que l'énergie libre de surface d'un solide polaire soit décomposée de la façon suivante [16] :

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^i + \gamma^p + \gamma^h + \gamma^{ab} + \gamma^e$$

Avec :

γ : la tension de surface du liquide ou l'énergie libre de surface.

γ^d : composante due à la dispersion.

γ^i : composante due aux interactions dipôle - dipôle induits

γ^p : composante due aux interactions dipôle - dipôle.

γ^h :composante due aux liaisons hydrogène.

γ^{ab} : composante due aux interactions accepteur - donneur d'électrons.

γ^e : composante due aux interactions électrostatiques.

Selon C.J. Van Oss *et al.*, les trois premiers termes peuvent être combinés dans la composante de Lifshitz van der Waals [17,18] :

$$\gamma^{lw} = \gamma^d + \gamma^i + \gamma^p$$

Dans notre cas, nous supposons qu'il n'y a pas d'interactions électrostatiques. L'énergie libre de surface d'un solide ou la tension de surface d'un liquide s'écrit :

$$\gamma = \gamma^{lw} + \gamma^{ab}$$

Avec γ^{ab} : la composante acido-basique de l'énergie de surface.

Selon Van Oss *et al.*, cette composante acido-basique peut s'exprimer en fonction de deux paramètres non additifs : la tension de surface accepteur d'électrons (γ^+, composante acide de l'énergie de surface) et la tension de surface donneur d'électrons (γ^-, composante basique de l'énergie de surface) qui résultent respectivement des interactions d'accepteur et de donneur d'électrons. Nous avons alors la relation suivante :

$$\gamma^{ab} = 2\,(\gamma^+ \times \gamma^-)^{1/2}$$

Le travail d'adhésion d'un liquide sur un solide, W_{SL}, s'écrit alors :

$$W_{SL} = \gamma_S + \gamma_{LV} - \gamma_{SL} = 2\,[\,(\gamma_S^{lw} \times \gamma_L^{lw})^{1/2} + (\gamma_S^+ \times \gamma_L^-)^{1/2} + (\gamma_S^- \times \gamma_L^+)^{1/2}] = \gamma_{LV}(1 + \cos\theta).$$

Cette équation comprend trois inconnues : γ_S^{lw}, γ_S^+ et γ_S^- qui seront déterminées en mesurant l'angle de contact de trois liquides sondes : un liquide apolaire (diiodométhane) et deux autres polaires (eau, formamide).

Le système peut être représenté par le modèle suivant : Il rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface et dépend des interactions entre le liquide et le solide. La mesure de cet angle nous donne trois types d'informations :

- ❖ Si on utilise l'eau comme liquide de mesure d'angle de contact, on peut déduire le caractère hydrophobe (faible énergie de surface) ou hydrophile (grande énergie de surface) de la surface.
- ❖ Si on utilise plusieurs liquides de référence différents, on peut accéder à l'énergie libre de la surface, tout en discriminant les composantes polaires ou apolaires de cette énergie.
- ❖ La mesure de l'hystérèse de mouillage, différence entre l'angle à l'avancée de la goutte et l'angle au retrait renseigne sur l'hétérogénéité physique (rugosité) ou chimique de la surface ou encore sur la réorganisation dynamique de la surface (gonflement, réorientation).

La forme d'une goutte à la surface d'un solide est régie par 3 paramètres :

- ➢ La tension interfaciale solide-liquide γ_{SL}
- ➢ La tension interfaciale solide-vapeur γ_{SV} (γ_S)
- ➢ La tension interfaciale liquide-vapeur γ_{LV} (γ_L)

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

$$-\gamma_{SV} + \gamma_{SL} + \gamma_{LV}\cos\theta = 0$$

Le cosinus de l'angle formé par la surface solide et la tangente à la goutte au point triple solide est la mesure de la résultante de l'énergie d'adhésion entre le liquide et le solide exprimée par $\Delta G_{SL.}$

Andrade a récapitulé les points essentiels à valider permettant une interprétation simple et directe des mesures d'angles obtenues :

- La surface du matériau à étudier doit être immobile et non déformable. Elle doit être rigide sans possibilité de réarrangement des chaînes exprimées en surface, en fonction de l'environnement dans lequel le matériau se trouve.
- La surface doit être homogène et uniforme.
- la tension superficielle du liquide sonde doit être parfaitement connue et constante.
- les phases solide et liquide ne doivent pas réagir autrement qu'au niveau de leurs interfaces.
- La pression d'étalement doit être nulle.
- la rugosité doit être inférieure à 100nm.

III-1-2 Description de l'appareillage utilisé

Le principe de cette technique consiste à déposer une goutte d'un liquide sonde (eau, formamide et diiodométhane, « Sigma Chemical CO - St Louis MO USA ») sur la surface étudiée, et de mesurer l'angle de raccordement à la jonction des phases solide/liquide/vapeur. Le dispositif utilisé est composé d'un appareil (DIGIDROP, GBX Scientific Instrument, Roman, France), et d'un système d'acquisition et d'analyse des images, comme le montre la figure II.16. Le système GBX permet le déplacement du porte-échantillon selon l'axe vertical et horizontal puis le dépôt d'un volume précis du liquide sur la surface de cet échantillon. La figure II.17 montre un schéma du dispositif expérimental de la mesure de l'angle de contact en statique.

L'image de l'évolution de la goutte déposée est enregistrée par une caméra puis traitée pour déterminer l'angle de contact et calculer l'énergie libre de surface selon différents modèles.

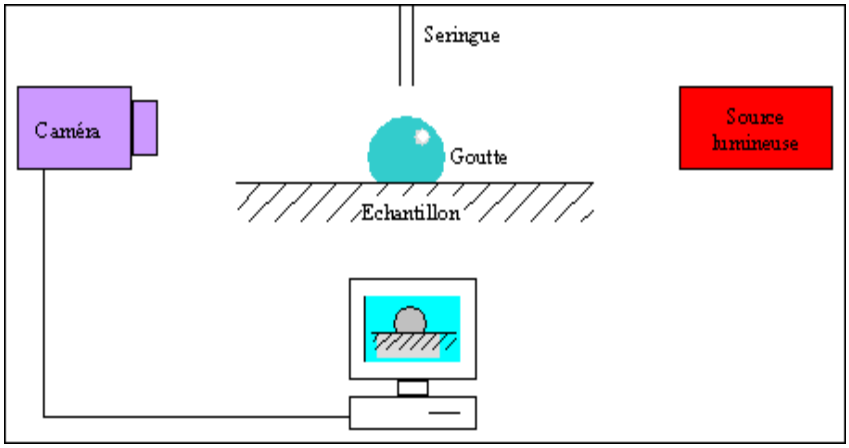


Figure II.16 : Schéma du dispositif expérimental de la mesure de l'angle de contact en statique

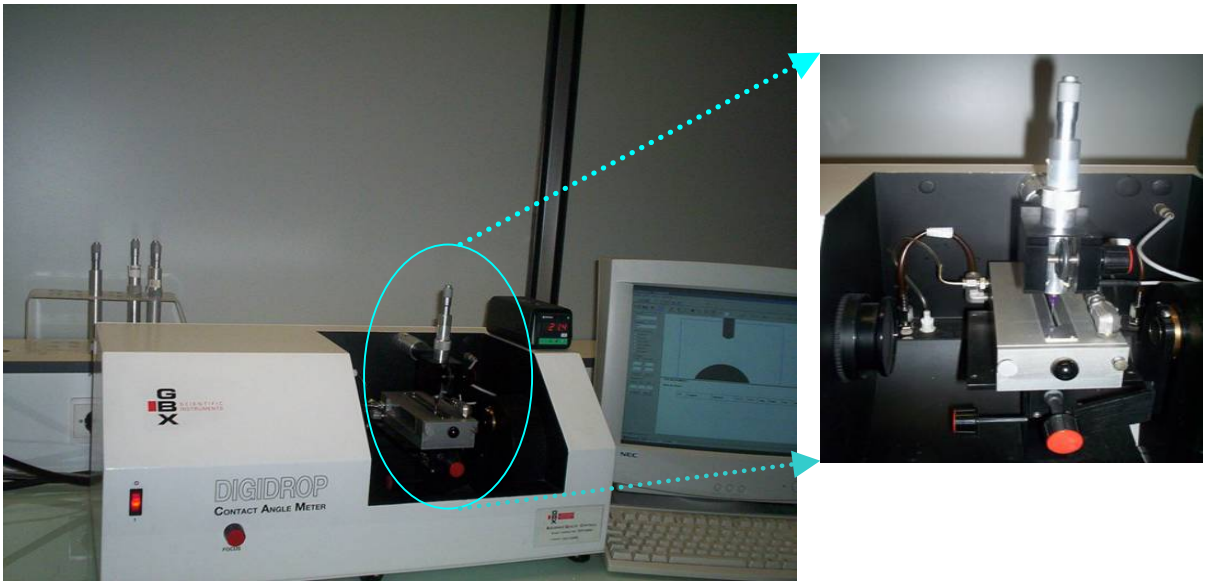


Figure II.17 : Photo du dispositif expérimental de l'appareillage DIGIDROP de GBX

III-2 Mesure d'angle de contact par la méthode de la bulle captive

Dérivée de la goutte posée, cette technique consiste à réaliser, sur le matériau immergé dans de l'eau pure, une bulle d'air de 2 µL ou une goutte d'un liquide non miscible dans l'eau tel que l'octane (99.9% Gold Label, Aldrich Chemical), comme le montre la figure II.18.

Pour chaque substrat, l'angle de contact est calculé à partir des mesures de dimension de la goutte. Ceci correspond à $\theta = \Phi$ (goutte d'air dans l'eau) and $\theta = \Theta$ (goutte d'octane dans l'eau)

Il est alors possible d'effectuer la mesure de l'angle de raccordement entre le fluide constituant la bulle, l'eau et le matériau.

Cette technique est moins souvent employée mais elle a l'avantage, dans le cas de certains matériaux, de mieux reproduire l'environnement dans lequel ils sont utilisés.
La figure II.19 montre les accessoires utilisés pour cette technique.

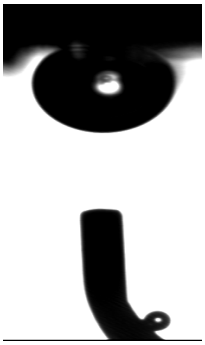


Figure II.18 : Photographie d'une goutte posée par la méthode de la bulle captive

Figure II.19 : Photo des accessoires utilisés dans la méthode de la bulle captive

III-3 Mesure d'angle de contact par la méthode du tensiomètre

III-3-1 Principe de la méthode du tensiomètre

L'hystérèse d'angle de contact est définie par différentes relations :

- la différence entre l'angle à l'avancée (θ_A) et l'angle au retrait (θ_R) [19] : $\Delta\theta = \theta_A - \theta_R$.

- la différence entre les cosinus de l'angle au retrait et de l'angle à l'avancée :

$$\Delta\cos\theta = \cos\theta_R - \cos\theta_A.$$

- une approche thermodynamique : calcul du travail d'adhésion de l'hystérèse d'angle de contact basé sur l'équation de Young : $\Delta W = \gamma_{LV}(\cos\theta_R - \cos\theta_A)$.

- une hystérèse d'angle de contact réduite : $H = (\theta_A - \theta_R)/\theta_A$ [20].

De nombreux physico-chimistes assimilent l'angle de contact obtenu par la méthode de la goutte posée à θ_A. La bulle captive, quant à elle, donnerait un angle équivalent à θ_R. Par conséquent, les mesures des angles de raccordement des phases eau/air/matériau obtenus par les méthodes de la goutte posée et de la bulle captive permettent d'accéder à l'hystérèse d'angle de contact.

La mesure d'angle de contact peut être réalisée suivant diverses méthodes :

- *la technique de l'aiguille plongeante* : les angles à l'avancée et au retrait sont obtenus lors de l'avancée ou du recul du front de liquide sonde. Cette méthode dépend de l'expérimentateur.

- *la technique du plateau incliné* : L'échantillon est placé sur un plateau qui s'incline progressivement. Une goutte de liquide sonde est posée sur le substrat. Le plateau est incliné jusqu'à atteindre un angle α critique (moment où la goutte se « décroche » du substrat). Les angles à l'avancée et au retrait sont alors mesurés lorsque le plateau a atteint cet angle.

- *la lame de Wilhelmy* : cette technique consiste à déduire les angles de contact obtenus lors de l'immersion et de l'émersion du matériau à partir de la mesure des forces exercées sur ce matériau en fonction de la profondeur d'immersion. On mesure la force qui s'exerce à la surface d'une lame de platine plongeant dans un liquide dont on cherche la tension superficielle.

D'après le bilan de la force suivant :

$$F = p \times \gamma_{lv} \times \cos\theta$$

F: force mesurée par mN/isotherme

γ_{lv} : mN/m

P : périmètre en cm

Sachant que l'angle de contact entre la lame de platine et tous les liquides est 0°, on obtient γ_{lv}. Cette mesure est obtenue grâce à un tensiomètre constitué d'une balance de pesée qui mesure la force exercée sur la lame de platine. La même expression peut être utilisée en remplaçant la lame de platine par une surface rectangulaire de section connue plongeant dans un liquide sonde de tension superficielle connue : l'angle de contact est alors déduit , à l'avancée et au retrait (cycle).

L'équation de Young est considérée valide pour l'angle mesuré comme « angle avançant » c'est à dire l'angle que fait la goutte quand elle vient de terminer son avancée, mesuré pendant les quelques secondes qui suivent.

III-3-2 Description de l'appareillage utilisé

Cette mesure est obtenue grâce à un tensiomètre constitué d'une balance de pesée qui mesure la force exercée sur une lame de platine lors de sa plongée dans un liquide dont la tension superficielle est à déterminer. La même expression peut être utilisée en remplaçant la lame de platine par une surface rectangulaire de section connue plongeant dans un liquide sonde de tension superficielle connue : l'angle de contact est alors déduit , à l'avancée et au retrait (cycle). Le principe de cette méthode est schématisé dans la figure II.20. La figure II.21 montre une photo de cet appareillage.

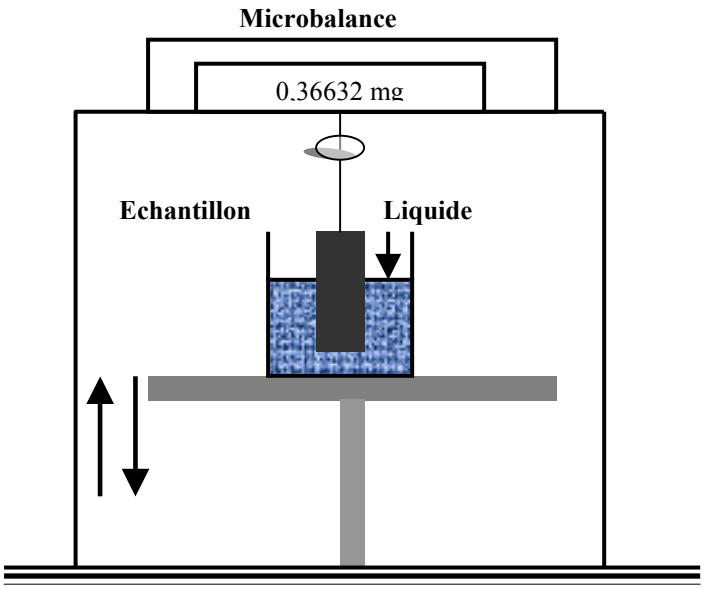


Figure II.20 : Schéma de principe du tensiomètre

Figure II.21 : Photo du dispositif expérimental de tensiomètre

Dans notre travail la mesure a été faite en adoptant les paramètres suivants :

- ✓ Vitesse de mesure : 50µm/s
- ✓ Profondeur d'immersion : 9500µm
- ✓ Vitesse de détection : 100 µm/s
- ✓ Température : 20°C

Trois liquides de mesure ont été utilisées pour en déduire l'énergie de surface du biomatériau étudié : eau, formamide et diiodométhane. Pour chaque substrat, cinq à dix cycles de mesure ont été enregistrés pour évaluer la reproductibilité de la mesure. La courbe d'immersion représente l'angle à l'avancée θ_a, celle d'émersion représente l'angle au retrait θ_r et la différence entre ces deux angles donne l'hystérèse H selon : $H= \theta_a - \theta_r$.

L'angle de contact n'est pas mesuré directement, il est déduit de la mesure de la force en fonction de la profondeur d'immersion dans le liquide. Ainsi, à partir de la courbe force-profondeur d'immersion, le logiciel de traitement des données procède automatiquement à une régression linéaire à la valeur zéro de profondeur d'immersion sur les courbes de cycle d'immersion et d'émersion séparément afin d'éliminer les effets de la pression d'archimède. Le résultat obtenu F/p sera utilisé pour calculer l'angle de contact selon l'équation suivante :

$$\cos\theta = \frac{F}{p\gamma_{lv}}$$

avec F : force mesurée par la balance, p : périmètre de substrat, γ_{lv} : l'énergie de surface du liquide et θ l'angle de contact.

Lam et al. [21] présument qu'il existe plusieurs angles de contact et divisent le profil d'un tensiographe en trois domaines (Figure II.22) : le premier débute avec le premier contact du matériau avec le liquide et s'achève à la valeur limite de la profondeur d'immersion (angle à l'avancée θ_a : domaine A). Le deuxième est celui de la transition vers l'angle au retrait, il débute dès que le matériau commence à se retirer du liquide et il est caractérisé par une courte durée (domaine B). Le troisième domaine débute dès que l'angle au retrait devient observable et se termine avec la fin des mesures (angle au retrait θ_r : domaine C).

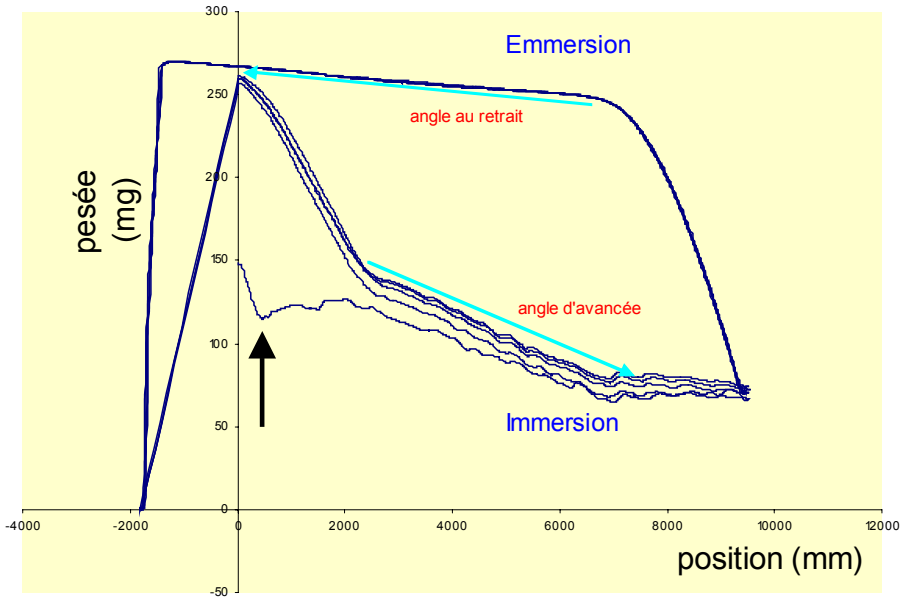


Figure II.22 : Schéma d'un tensiographe présentant cinq cycles d'immersion et d'émersion

IV- Culture cellulaire

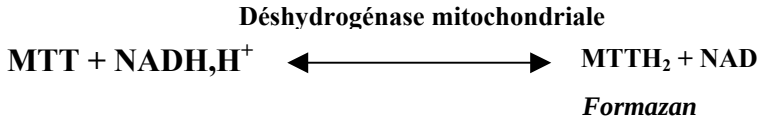
IV-1 Culture des cellules endothéliales

La mise en culture de ces cellules endothéliales, provenant d'une lignée Eahy926, s'effectue dans 5 ml de milieu frais complet composé de : M199 (Sigma, M2154), Pénicilline-streptomycine (Péni. = 10000 U/ml, Strepto. =10 mg/ml, Sigma, P0781), AmphothéricineB (250 µg/100 ml, Sigma, A2942), glutamine (2 mM, Sigma, G7513), et une solution tampon Hepes (15 mM, Sigma, H0887). Du sérum de veau fœtal décomplémenté (Sigma, F7524) y est ajouté à 10 % [22].

IV-2 La prolifération cellulaire : Test de viabilité et de cytotoxicité cellulaire

Les cellules vivantes ont une activité enzymatique mithochondriale qui transforme le MTT (un sel de tétrazolium jaune : 3-(4,5- diméthyl thiazol-2-yl 2,5-diphényltetrazolium bromide) en cristaux de formazan de couleur bleue grâce à la succinate déshydrogénase. La quantité du produit formé, déterminée par la mesure de la densité optique à $\Delta DO = DO_{550\ nm} - DO_{690\ nm}$, est proportionnelle à l'activité cellulaire ; ce qui nous permet d'évaluer quantitativement leur viabilité, signe de leur prolifération. C'est un test de viabilité cellulaire ou de l'activité biochimique cellulaire.

La réduction du MTT est schématisée par la réaction suivante :



Procédure expérimentale

La prolifération des cellules a été suivie pendant 9 jours.

La méthodologie de préparation est la suivante [23]:

- ✓ Préparer 10 échantillons pour chaque protéine. Le dénombrement des cellules se fait par la mesure de densité optique (D.O) à J0, 3ème jour (J_3), le 5ème jour (J_5) et le 9ème jour (J_9),
- ✓ Utiliser des plaques à 24 puits, les répertoires protéiques sont bien notés sur les boites qu'on veut doser,
- ✓ Trypsiner une boite à 25 cm², prendre 200 µl de la suspension cellulaire, mettre la suspension cellulaire dans une solution blanche transparente visqueuse «isoton» (7,5 ml) et comptage du nombre de cellules à l'aide d'un compteur automatique : 1,05 x 10^6 cellules/ml,
- ✓ Ensemencer avec une densité de 10 000 – 15 000 cellules/cm²,
- ✓ Les échantillons en verre déjà traités par les différentes protéines reçoivent 1 ml de suspension cellulaire. On laisse les cellules s'incuber pendant 1h,
- ✓ Mettre 50µl/puit de MTT (Sigma M2128) et laisser adhérer 4h. Sachant que la solution de MTT est à une concentration de 5mg/ml dans du PBS (PH=7.4) et elle est filtrée sur 0.22µm,
- ✓ Révélation de la coloration,
- ✓ Enlever le milieu et mettre 500µl de mélange Ethanol 100% et de DMSO (diméthyl sulfoxyde Amresco, Etats-Unis) (vol/vol),
- ✓ Agiter doucement pendant 5 min,
- ✓ Transférer le contenu de la plaque à 24 puits dans une autre à 96 puits,

✓ Lecture avec un lecteur de plaques (Bio-Tek instrument, Microplate reader EL 308 (λ= 570nm)).

La figure II.23 montre une photo de l'appareillage utilisé pour cette technique.

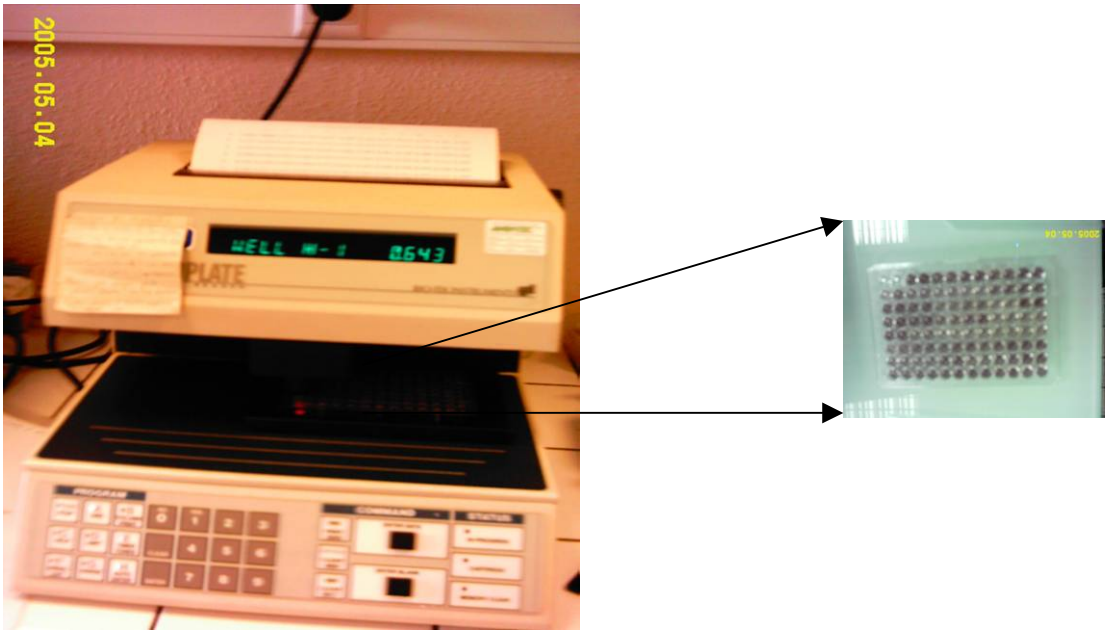


Figure II.23 : Photo de lecteur de plaques Bioteck instruments

Cette première méthode nous indique la cinétique de prolifération des cellules endothéliales sur des substrats fonctionnalisés par différentes couches. Une autre méthode qui nous permet de décrire la viabilité de ces cellules, indépendamment du temps, a été mise en oeuvre comme suit:

Procédure expérimentale *[24,25]* :

✓ Traiter des plaques de 96 puits avec les différentes protéines suivantes : fibronectine, collagène, immunoglobuline G, héparine, avec une même concentration (5µg/ml) et albumine à deux concentrations différentes (5µg/ml, et 1%),

✓ Ensemencer des cellules dans deux plaques à 96 puits avec une densité de 20 000 cellules/puit,

✓ Laisser adhérer 24h (100µl/puit),

✓ Mettre du MTT kit I (Roche N° 1 465 007),

✓ Laisser incuber 4h,

✓ On ajoute ensuite100µl de solution de solubilisation (10% SDS dans 0 .01M HCl),

✓ Après 4h d'incubation on passe à la lecture de plaques à deux longueurs d'onde différentes 550 nm et 690 nm (lecteur de plaques Biotek instruments INC Powerwave X, logiciel KC4).

Le tableau ci-dessous présente la variation de la densité optique (D.O) en fonction des échantillons utilisés.

Echantillon	*Milieu de culture sans cellules (tube blanc)*	*Polystyrène sans protéine*	*Fibronectine*	*Collagène*	*Immunoglobuline G*	*Héparine*	*Albumine*
Δ D.0	*0,040*	*0,475*	*0,527*	*0,615*	*0,498*	*0,439*	*0,493*
Incertitude	*0,019*	*0,058*	*0,030*	*0,051*	*0,020*	*0,048*	*0,041*

Tableau II.2: Variation de la densité optique en fonction des substrats

V- Elaboration de techniques hydrodynamiques

V-1 Chambre d'écoulement à plaques parallèles

V-1-1 Caractérisation théorique de l'écoulement

Le dispositif expérimental utilisé est un canal d'écoulement rectangulaire qui peut être schématisé par la figure II.24.

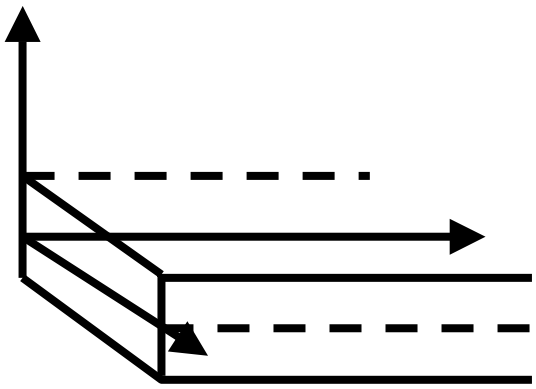


Figure II.24: géométrie du canal d'écoulement

Les axes y et z, perpendiculaires à la direction x de l'écoulement définissent la largeur et l'épaisseur du canal. Ces dernières sont choisies volontairement très inférieures par rapport à la longueur du canal afin d'obtenir un profil de vitesse poiseuille.

Avec cette géométrie et les conditions aux limites caractérisées par une vitesse nulle au niveau de la paroi, la résolution des équations classiques d'hydrodynamique (Equation de Navier Stokes) aboutissent à l'expression du débit de l'écoulement et de la contrainte pariétale par les relations suivantes :

$$Q = \frac{\tau w h^2}{6\eta} \longrightarrow \tau = \frac{6Q\eta}{w h^2}$$

avec

τ : force de cisaillement (dynes/cm²)

Q: débit du canal (cm^3/s)

w: largeur de la chambre à flux (cm)

h: hauteur de la chambre à flux (cm)

η : viscosité du fluide (poise)

Le profil de vitesse suivant l'axe z pour différentes valeurs de la variable y montre une distribution parabolique caractéristique de l'écoulement poiseuille.

Comme, la vitesse de l'écoulement sanguin est fréquemment exposée à un changement de direction et d'amplitude du à une contraction du vaisseau, notre équipe a montré que lorsque ces changements sont soudains et brusques, il y a formation d'une zone de recirculation appelée aussi vortex. La taille de cette zone devient de plus en plus importante chaque fois que le nombre de Reynolds augmente.

La chambre d'écoulement à deux plaques que nous avons conçue nous permet, en effet, de simuler cette situation grâce à une diminution locale de l'épaisseur du canal de l'écoulement. Ce dernier se transforme alors en un diffuseur. L'orifice de ce diffuseur détermine le degré de la contraction brusque du vaisseau. Selon ce degré, le profil de vitesse peut être uniforme, caractéristique d'un écoulement laminaire, comme le montre la figure II.25, ou variable indiquant un écoulement turbulent (figure II.26).

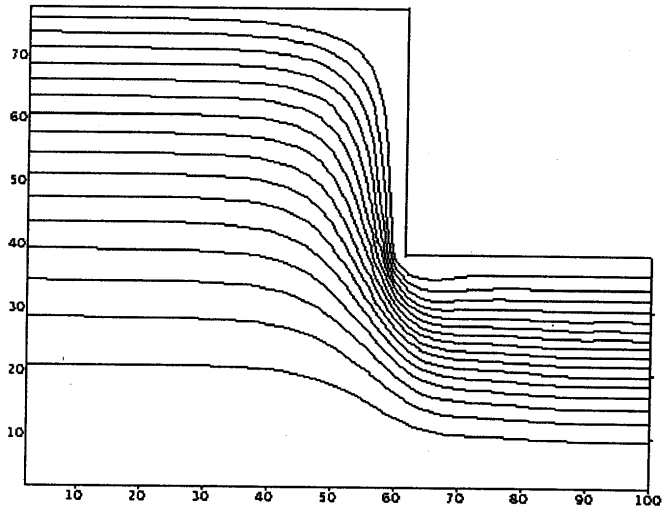


Figure II.25 : Développement des lignes de courant décrivant une brusque contraction

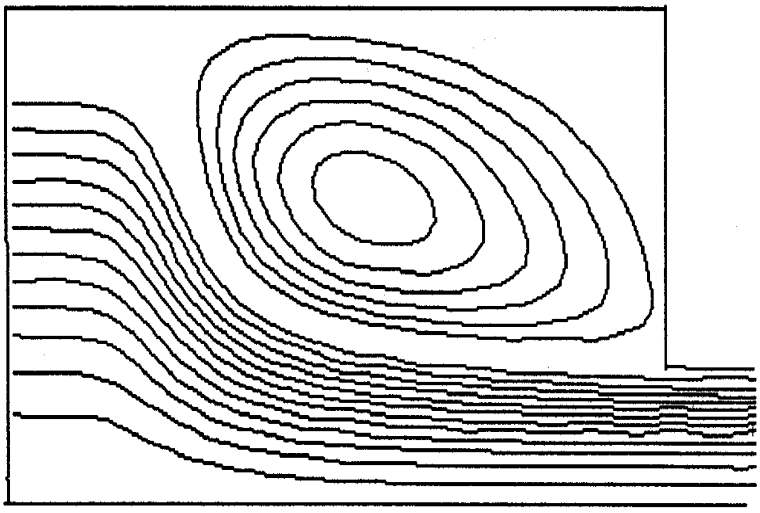


Figure II.26 : Variation des lignes de courants et formation de vortex

V-1-2 Dispositif expérimental

Dans le but d'étudier la réponse morphologique de la cellule endothéliale à l'écoulement et de mesurer son énergie d'adhésion à un matériau, nous avons conçu une chambre d'écoulement à deux plaques parallèles. Elle est présentée dans la figure II.27.

La première plaque en plexiglas biocompatible ayant les dimensions (longueur : 6.7 cm ; largeur : 4,1 cm ; hauteur : 1,2 cm) constitue le support du dispositif. Une entrée et une sortie d'écoulement sont créées à chaque extrémité de la plaque. Chacun de ces trous communique avec un réservoir créé sous forme de fente sur la face supérieure de la plaque. Ces fentes stabilisent l'écoulement et minimisent l'effet d'entrée. Une rainure (largeur:0.3 cm, longueur: 5,7 cm) est effectuée sur tout le périmètre de la plaque pour appliquer une dépression ΔP de l'ordre de 0,5 bar.

Sur cette rainure, on place un joint biocompatible en silicone (40-32NT-8-04253, INC (70P001-100-010) sous forme de cadre ayant les mêmes dimensions que celles de la plaque. L'épaisseur du joint détermine celle du canal d'écoulement.

La deuxième plaque est une lamelle en verre (Gold scal, 3335) (longueur : 6,5 cm; largeur : 4,8 cm) sur laquelle une mono-couche de cellules endothéliales est cultivée après dépôt d'un film de fibronectine. Cette deuxième plaque est appliquée sur la membrane avec la couche cellulaire dirigée vers le bas.

L'ensemble du dispositif est placé sur la plate-forme d'une caméra à fibre optique qui est reliée à un micro-ordinateur équipé d'un logiciel d'acquisition et de traitement d'images.

Le dispositif est, par ailleurs, relié à une pompe péristaltique. L'avantage de cette pompe est qu'elle permet d'imposer des débits très faibles, variables et ce de manière continue. Un système, conçu au laboratoire puis réalisé par Air liquide permet de créer une dépression ΔP variable, conduisant à l'application l'une sur l'autre des deux plaques séparées par la membrane. Ce système, relié à un compresseur, fonctionne selon le principe du tube de Venturi.

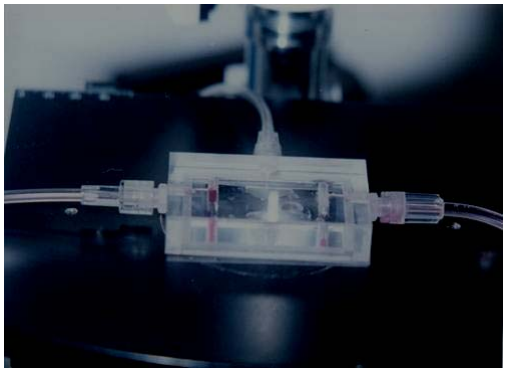


Figure II.27 : Chambre de perfusion à plaques parallèles

V-1-3 Quantification de la force d'adhésion des cellules endothéliales au substrat

Détermination du facteur de forme S

L'étude hémodynamique de la microcirculation implique la prise en compte, entre autres, des propriétés mécaniques des cellules endothéliales de la paroi vasculaire et des cellules sanguines ainsi que leurs interactions. L'écoulement engendre des modifications aussi bien morphologiques que fonctionnelles au niveau de ces cellules. Plusieurs techniques ont été proposées pour quantifier cette réponse cellulaire à l'écoulement.

Les images enregistrées illustrent que la morphologie de la cellule endothéliale, soumise à un écoulement laminaire, change en fonction de la contrainte pariétale et de sa durée

d'application. Cette modification morphologique, décrite également par Charara et al. [26], traduit l'adaptation cellulaire aux conditions d'écoulement pour minimiser son détachement du support. Cette capacité d'adaptation se traduit par une orientation et une élongation de la cellule. Pour caractériser la réponse cellulaire, le facteur de forme cellulaire a été mis en évidence. Ce facteur a été défini dans la littérature par Van Kooten T.G. et al. [27] par la formule ci-dessous :

$$S = P/ 2 (\pi A) ½$$

S: Facteur de forme,

A: Aire de la zone de contact de la cellule au substrat (μm^2),

P: Périmètre de la cellule (μm).

Le facteur de forme est proportionnel au rapport du périmètre au carré de l'aire cellulaire. Plus sa valeur est proche de 1, moins les cellules sont étalées. Cette capacité d'étalement constitue un des premiers critères de l'adhésion des cellules.

V-2 Jet vertical

V-2-1 Caractérisation théorique de l'écoulement

Un jet laminaire vertical de solution tampon saline est projeté sur une lamelle en verre où des cellules endothéliales sont ensemencées afin de créer une lésion. Le jet est orienté perpendiculairement à la plaque cible et à une hauteur de 1,4 mm (ce qui correspond à deux fois le diamètre de l'aiguille ; 0,7 mm). Cette hauteur, notée h, a été modélisée afin d'éviter d'autres régimes de flux et de s'écarter surtout de la turbulence. Elle est fixée à quatre fois le diamètre interne de l'aiguille sachant que le rayon interne de l'aiguille est de l'ordre de a_0 = 0,35 mm ; h = 4 a_0. La couche cellulaire est soumise au flux hydrodynamique pendant 30s. Cette valeur de temps d'exposition a été déjà établie par Deshpande et al [28]**.**

Pour caractériser le flux utilisé, le nombre de Reynolds a été calculé selon l'équation suivante :

$$\mathbf{Re = 2\rho\bar{u}a_0/\mu}$$

Où

Re: Le nombre de Reynolds,

$\bar{u}$: la vitesse moyenne de la sortie du jet,

μ: la viscosité du fluide,

ρ: la densité du fluide,

a_0 = 0,35 mm, le rayon interne de la seringue.

Le profil de la vitesse à la sortie du jet est parabolique ce qui décrit l'écoulement Poiseuille. La seringue est plongée dans la solution saline qui est maintenue à 18mm dans une boite de pétrie. Pour des nombres faibles de Reynolds, Re =1, la vitesse radiale est basse à cause de l'action diffusive de la viscosité. Une étude numérique des champs de flux a été illustrée par Deshpande et Vaishnav [29] pour quantifier l'effet du stress mécanique sur l'endothélium.

La variation radiale du taux de la contrainte de cisaillement dans le cas où $h/a_0 = 4$ pour les différents nombres de Reynolds a été établie par Vaishnav et al. [30] (figure II.28).

La contrainte de cisaillement est déterminée par l'équation suivante :

$$\tau' = \tau / 4\rho\bar{u}^2$$

Où,

τ': le taux de la contrainte de cisaillement non dimensionnelle

τ: le taux de la contrainte de cisaillement

ρ: la densité du fluide

$\bar{u}$: la vitesse moyenne de la sortie du jet

Le taux de la contrainte de cisaillement peut être nul quand R = 0 où $R = r/a_0$ (r est la distance radiale de l'axe du jet). C'est le point de stagnation du flux. La contrainte mécanique varie asymptotiquement pour des grandes valeurs de R. Elle peut aussi atteindre un optimum puis diminue. Pour des valeurs de nombres de Reynolds de 1, R prend une valeur de 1,8.

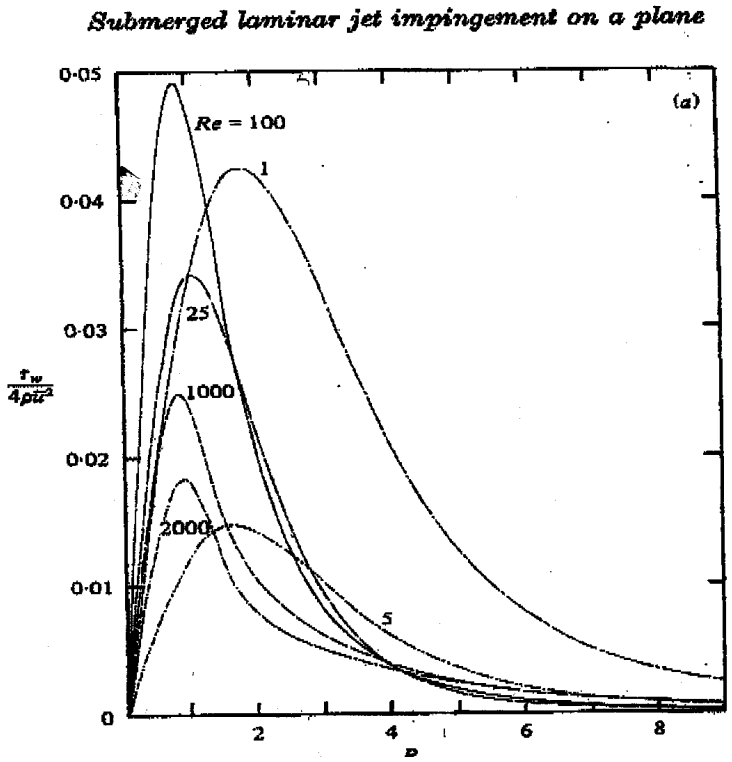


Figure II.28 : Variation de la contrainte de cisaillement non dimensionnelle en fonction de R avec R= r/a_0 ou r : la distance radial de l'axe du jet et a_0 :le rayon radial interne de la seringue

L'érosion endothéliale par le jet inclut plusieurs variables : intensité du jet et durée de l'exposition de la plaque au jet. L'objectif de cette étude est la mesure des contraintes de cisaillement nécessaires à détacher des cellules endothéliales adhérées à des substrats couverts par des protéines. La force mécanique créée au niveau du périmètre de la lésion par les courants du flux est déterminée selon la théorie de Deshpande et Vainshnav illustrée dans la figure II.28 [29]. Cette force nécessaire pour détacher les cellules du substrat peut être calculée à partir de la mesure de la surface de la lésion. Cette surface est déterminée après acquisition et traitement d'images obtenues en fonction de la contrainte imposée.

V-2-2 Dispositif expérimental

Un deuxième dispositif hydrodynamique a été également réalisé au Laboratoire d'après Deshpande et al. [31] pour quantifier la force d'adhésion cellulaire à un biomatériau dont les dimensions sont faibles.

Son principe consiste à appliquer un jet à travers une seringue sur la surface du matériau recouverte par une monocouche de cellules. Le matériau est immergé dans une boite de Pétri par le milieu de culture. La distance entre le bout de la seringue et la couche cellulaire a été optimisée par Deshpande et Vainshnav [32] à une valeur équivalente au double du rayon interne de la seringue. Le flux alors appliqué aux cellules est un flux laminaire. Grâce à un microscope inversé (Axiovert 25, Zeiss) qui est connecté à un ordinateur équipé d'un logiciel

de traitement d'images (image J), on peut évaluer la lésion et la force responsable de sa création. Cette relation sera présentée avec plus de détails dans le chapitre quatre.

Les figures II.29 et II.30 montrent respectivement le schéma de dispositif expérimental et son principe.

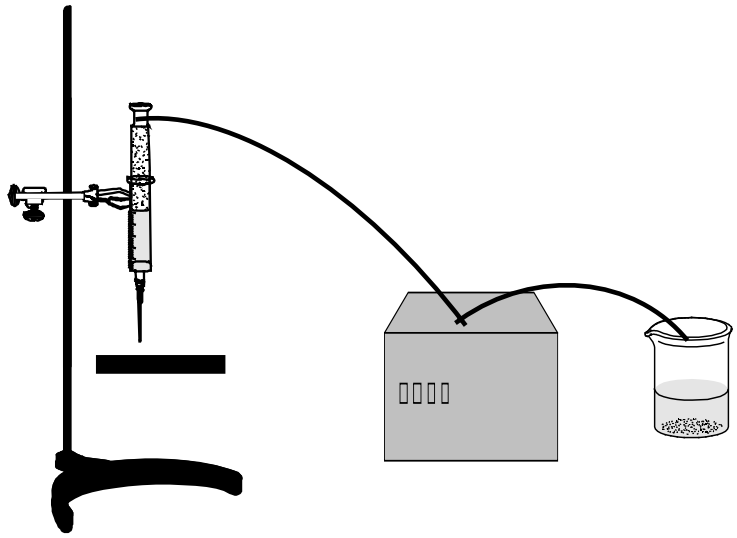


Figure II.29: Dispositif expérimental du jet vertical

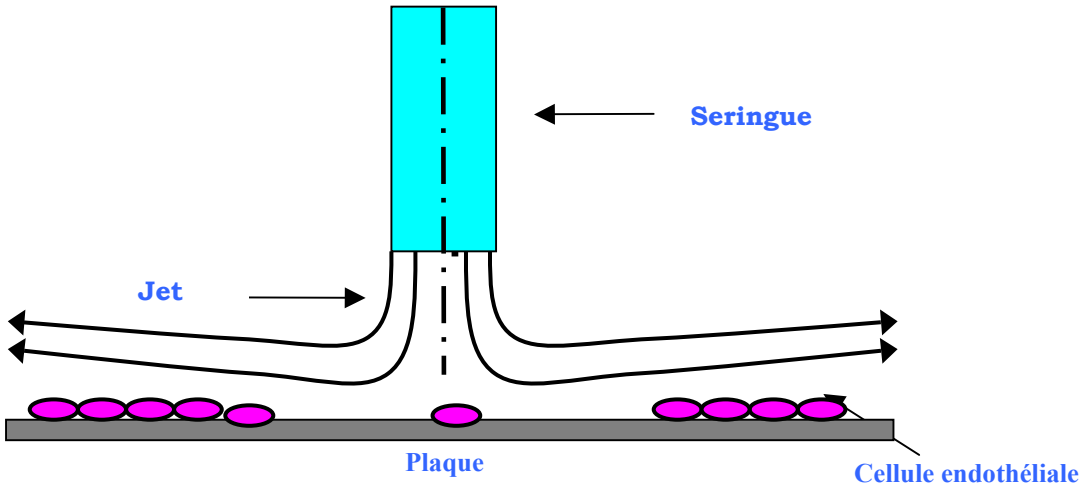


Figure II.30 : Schéma explicatif du jet vertical

VI- Microscopie à immunofluorescence

VI-1 Marquage de cytosquelette : filaments d'actine

Le cytosquelette est une structure tridimensionnelle complexe issue de l'assemblage, à différents niveaux, de biopolymères filamenteux interconnectés. Il en existe trois classes : les

filaments d'actine ou microfilaments (encore appelés actine-F), les microtubules et les filaments intermédiaires. Grâce à ses interactions, ce réseau de biopolymères présente les caractéristiques d'une charpente tridimensionnelle permettant à la cellule de se déformer, d'adapter sa forme en fonction des forces mécaniques venues de l'environnement tridimensionnel. Le recours à la technique du marquage de l'actine nous permet d'évaluer l'état de la cellule.

L'organisation des microfilaments d'actine dans les cellules a été étudiée en introduisant une sonde conjuguée qui associe un fluorochrome et un ligand spécifique de l'actine. Ce fluorochrome est lié à un ligand de l'actine FITC-phalloidine ou rhodamine phalloidine.

La phalloidine est phallotoxine (phaloidine, phallacine) extraite d'un champignon vénéneux l'amanite phalloide. Cet heptapeptide bicyclique se lie aux monomères d'actine et déplace l'équilibre entre monomères et polymères en favorisant l'état polymérisé de microfilaments d'actine F [33]. La fixation de la phalloidine conduit à une diminution de la vitesse de dissociation des monomères d'actine à partir des extrémités des filaments, ce qui stabilise ceux-ci dans la forme polymérisée. La phallotoxine est couplée au FITC (isothiocyanate de fluorsceine) ou avec de la rhodamine qui sont des fluorochromes dérivés de la fluorescène ou de la rhodamine. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission maximales se situent respectivement dans le visible à 543 nm dans le vert.

Procédure expérimentale

Le protocole de marquage est directement inspiré de la méthode appliquée par Nishiyama et al. [33] pour marquer l'actine des fibroblastes humains en culture. Les cellules sont tout d'abord fixées avec du formaldéhyde à 3,7% dans du tampon PBS (solution tampon de phosphate monosodique à pH=7,1). La fixation dure 20 min et se réalise à température ambiante. Les aldéhydes sont d'excellents fixateurs mais ils ne permettent pas souvent de perméabiliser suffisamment la membrane aux macromolécules. La perméabilisation doit donc être achevée par un traitement avec un détergent. Après trois rinçages au PBS afin d'éliminer le fixateur, les cellules sont alors incubées pendant 10 minutes dans une solution de perméabilisation contenant 0,5% de triton X-100 dans du PBS. Les cellules sont rincées trois fois afin d'éliminer le détergent, puis incubées 1h à l'obscurité en présence de 5µg/ml de phalloidine-FITC dilués dans du PBS. Après rinçage, les lamelles sont mises au PBS et observées au microscope.

VI-2 Marquage de noyaux

Pour le marquage des noyaux, le protocole expérimental suivi est le même que précédemment en utilisant le 4, 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI : Molecular probes

D 1306) (1/200) dans une solution phosphate. Le comptage de noyaux fluorescents est une technique semi quantitative de l'adhésion des cellules à un matériau.

VII- Techniques de mesures électriques

VII-1 Impédance électrique

Ces dernières années la spectroscopie d'impédance électrochimique [34-36] s'est imposée comme outil analytique puissant permettant de sonder les propriétés électriques de nombreux systèmes. Les domaines d'application de cette technique sont divers, on cite surtout le secteur des capteurs [37-39]. D'autre part, les études théoriques de l'impédance d'électrodes fonctionnalisées par des entités biologiques (enzyme, anticorps, ADN ou cellule) permettent de comprendre les processus à l'interface métal/élément biologique/solution. Dans notre travail, nous utilisons la spectroscopie d'impédance pour étudier les propriétés électriques résistives ou capacitives de cellules endothéliales immobilisées sur une électrode en or [40,41]

VII-1-1 Théorie

En électrochimie on s'intéresse souvent aux processus et aux facteurs qui influencent le transport de charges à travers l'interface entre deux phases distinctes chimiquement (électrodes et électrolytes). Le plus souvent l'une des deux phases de part et d'autre de l'interface étudiée est un électrolyte dans lequel les charges sont transportées par le mouvement des ions. La deuxième phase est une électrode, c'est à dire une phase dans laquelle le transport des charges a lieu par le mouvement d'électrons. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous intéressons à l'interface métal/électrolyte. Un tel transfert de charge, qui correspond au passage d'un courant électrique à travers l'interface électrochimique, a pour principal effet de produire une transformation chimique appelée réaction d'oxydoréduction.

En régime sinusoïdal, la relation entre le courant qui traverse un circuit et la tension qui est appliquée aux bornes de celui-ci peut s'exprimer par le rapport Z entre les valeurs efficaces de la tension et du courant et du déphasage j_φ entre les vecteurs tournants qui, à chaque instant, représentent la tension V et le courant *I*. À ces grandeurs, on peut donner la signification de module et de phase d'un vecteur **Z** représentable comme un nombre complexe R + j X. Si ce circuit est linéaire, cette quantité est indépendante de la tension V, ou du courant *I*, mais dépend seulement de leur rapport.

L'impédance de l'interface électrochimique Z (ω) est un nombre complexe qui peut être représenté soit en coordonnées polaires (Z, φ) soit en coordonnées cartésiennes (Re Z, Im Z) :

$$Z(\omega) = |Z| \exp j\varphi = \mathrm{Re}Z + j\mathrm{Im}Z$$

Les relations entre ces quantités sont :

- d'une part :

$$|Z|^2 = (\mathrm{Re}Z)^2 + (\mathrm{Im}Z)^2 \text{ et } \varphi = \arctan \frac{\mathrm{Im}Z}{\mathrm{Re}Z}$$

- d'autre part

$$\mathrm{Re}Z = |Z| \cos\varphi \text{ et } \mathrm{Im}Z = |Z| \sin\varphi$$

Deux types de tracé sont utilisés pour décrire ces relations ; ils sont illustrés sur la figure II. 31 dans le cas du circuit équivalent d'une cellule électrochimique qui a pour impédance :

$$Z(\omega) = R_e + \frac{1}{\frac{1}{R_t} + jC_d\omega}$$

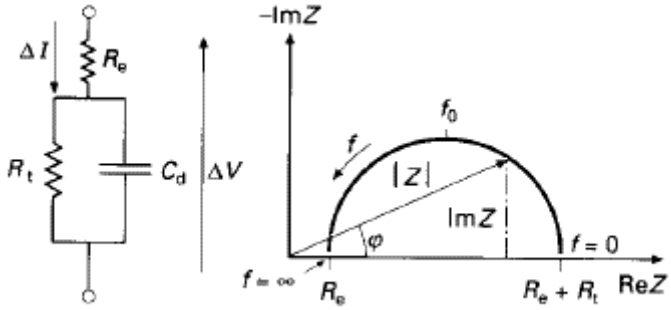


Figure II.31 : Circuit équivalent et tracé de l'impédance d'une cellule électrchimique

Z (ω) est tracé sur la figure II.32 dans le plan complexe (- Im Z, Re Z) avec la partie imaginaire négative portée au-dessus de l'axe réel comme il est habituel de le faire en électrochimie.

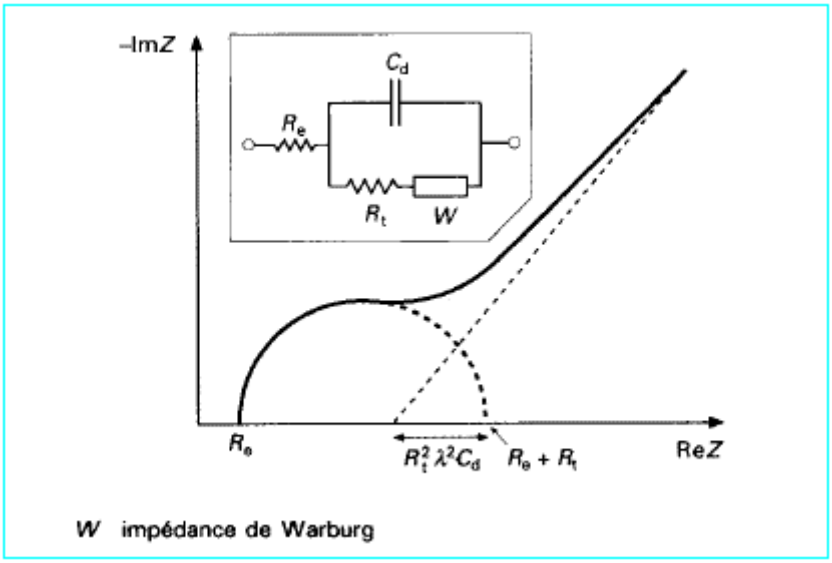


Figure II.32 : Impédance du circuit de Randles (R_e : résistance de l'électrolyte, R_t : résistance de transfert de charge, C_d : capacitance de la double couche, W : impédance de Warburg

Le principe de la spectroscopie d'impédance sera présenté avec plus de détails dans l'annexe 2.

VII-1-2 Description de la cellule électrochimique

Les mesures d'impédance et les voltamétries cycliques ont été effectuées dans une cellule, en verre, à trois électrodes ; une électrode de travail en or, une contre électrode en platine et une électrode de référence au calomel saturée (SCE). Cette cellule, présentée dans la figure II.33, est conçue de façon à maintenir une distance fixe entre les trois électrodes. L'électrode de référence au calomel saturé est utilisée pour polariser l'électrode de travail par rapport à la solution. Le potentiel de polarisation est choisi de façon à obtenir un courant très faible dans la cellule. Techniquement, pour que l'électrode de référence conserve un potentiel constant, son impédance d'entrée doit être très grande ($>10^7\Omega$). Le passage du courant dans la cellule se fait donc à travers la contre électrode. Celle-ci a souvent une surface très importante par rapport à celle de l'électrode de travail (au minimum deux fois plus grand) et donc son impédance peut être négligée dans le calcul de l'impédance totale de la cellule.

Pour satisfaire la condition de linéarité de la réponse du système électrochimique étudié, il faut que l'amplitude de la tension perturbatrice (ΔE) soit assez faible (pour toutes les expériences une valeur de 10 mV a été choisie).

Toutes les mesures électrochimiques ont été conduites en utilisant l'analyseur d'impédance Voltalab 80 de Radiometer Analytical S.A., piloté par ordinateur (figure II.34). Il permet

d'appliquer une tension alternative d'amplitude 10mV et d'effectuer un balayage dans la gamme de fréquences comprises entre 500mHz et 100kHz.

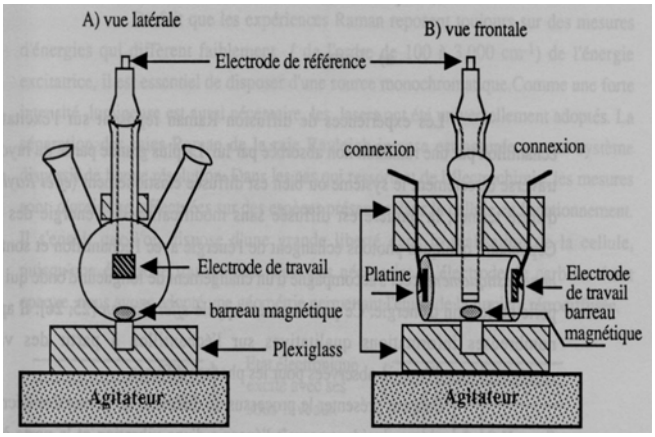


Figure II.33: Vue latérale (a) et vue frontale (b) de la cellule électrochimique

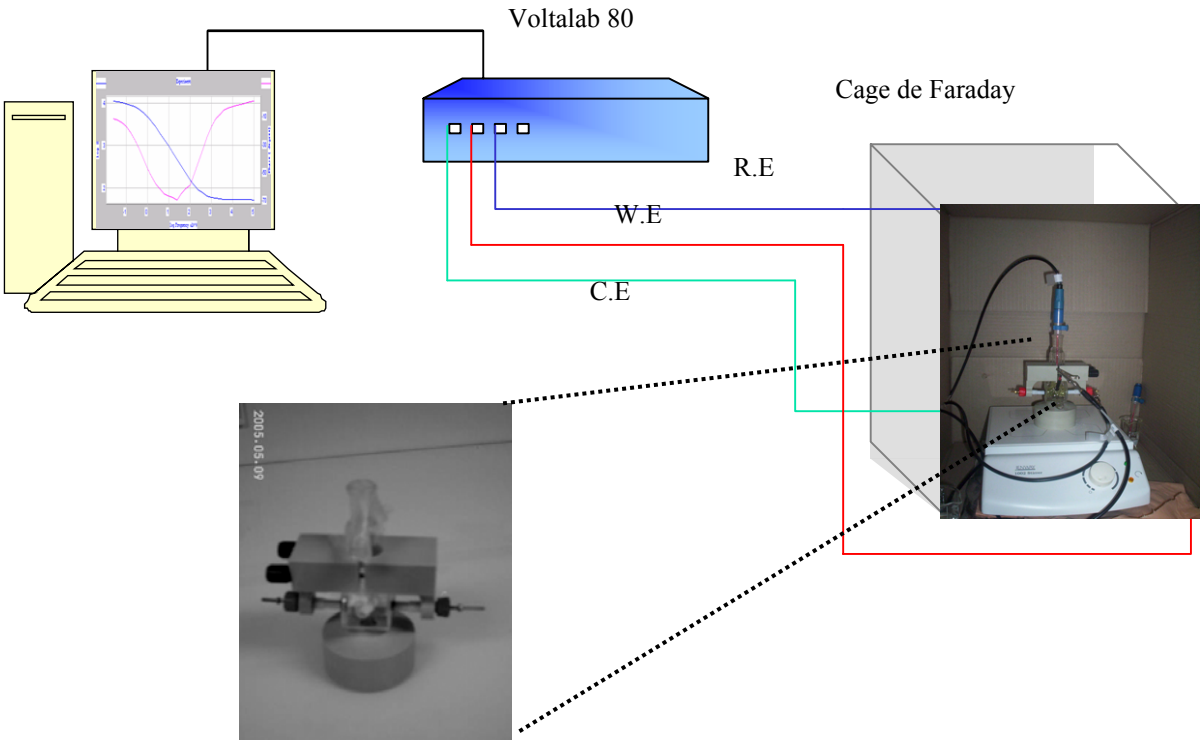


Figure II.34 : Montage expérimental d'analyseur d'impédance

VII-1-3 Caractérisation par spectroscopie d'impédance

Le thiol utilisé est l'Octadecylmercaptane $CH_3 (CH_2)_{17} SH$. Après les opérations de nettoyage, l'électrode est plongée dans une solution de 2mM d'Octadecylmercaptane dans l'éthanol

pendant 21h. L'échantillon, sorti du réacteur était alors rincé avec l'éthanol et séché sous flux d'azote.

VII-2 Voltamétrie cyclique

La voltamétrie est une technique d'électroanalyse basée sur la mesure du flux de courant résultant de la réduction ou de l'oxydation des composés tests présents en solution sous l'effet d'une variation contrôlée de la différence de potentiel entre deux électrodes (travail et référence). Elle permet d'identifier et de mesurer quantitativement un grand nombre de composés (cations, anions) et également d'étudier les réactions chimiques incluant ces composés.

Principe [42]

La voltamétrie cyclique est une méthode d'analyse pour détecter et caractériser des composés oxydables et réductibles en solution. Comme son nom l'indique, on mesure (*métrie*) un courant (*ampère*) en appliquant une tension (*volt*).

En voltamétrie, le potentiel E appliqué à l'électrode de travail varie en fonction du temps et le courant i est mesuré en fonction du potentiel E. Les courbes i = f(E) obtenues sont appelées voltamogrammes. La variation du potentiel E peut être linéaire ou modulée. Le courant i dans le circuit est principalement la somme de deux courants : le courant faradique, i_f, et le courant capacitif, i_c.

En principe, on porte une électrode (électrode de travail) à un potentiel donné par rapport à une électrode de référence. L'électrode de travail est chimiquement inerte, elle ne réagit donc ni avec la solution, ni par application d'un potentiel. Par contre, des substances présentes en solution peuvent être oxydées ou réduites à la surface de l'électrode (figure II.35).

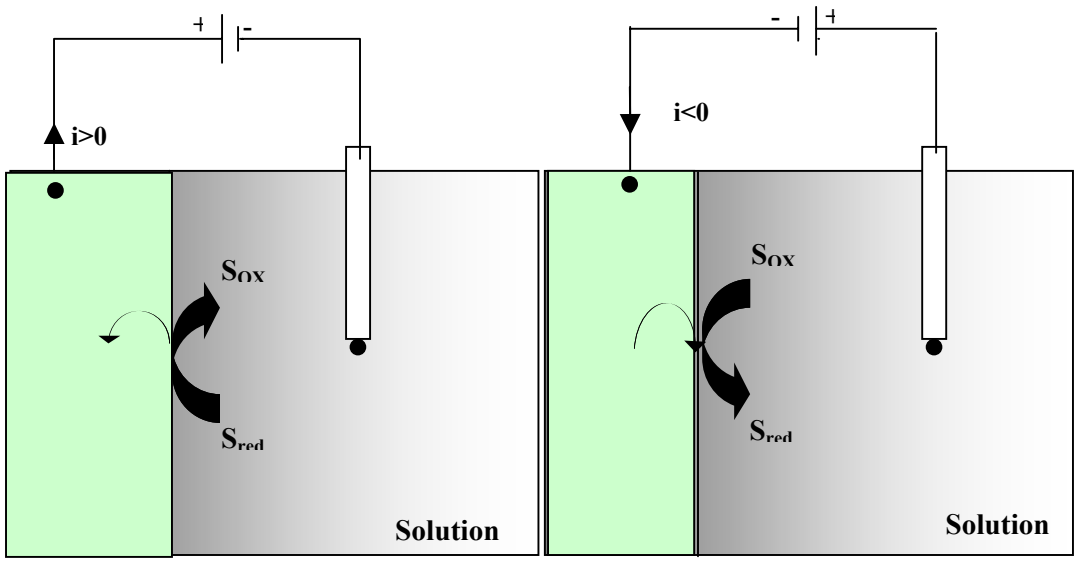


Figure II.35 : Schéma explicatif du processus électrochimique

Si une réaction redox se passe à la surface de l'électrode de travail, un courant circule entre la solution et l'électrode. Par définition, on compte un courant positif, si les électrons passent de la solution à l'électrode, donc si la substance est oxydée. Inversement, on compte un courant négatif si la substance est réduite, les électrons passent alors de l'électrode dans la solution.

En voltamétrie cyclique, on varie continuellement le potentiel de l'électrode de travail : en partant d'un potentiel initial E_0, il augmente jusqu'au potentiel E_{max} avant de retourner à E_0. Un enregistreur trace le courant en fonction du potentiel. En absence d'une réaction chimique, il y a seulement un courant capacitif. Dès qu'une réaction chimique se déroule à la surface de l'électrode de travail, le courant augmente. Il passe par un maximum avant d'atteindre un palier. Cette forme particulière s'explique par l'évolution de la concentration de la substance électrochimiquement active au voisinage de l'électrode.

Dans le cas d'une réaction réversible, on trouve un courant inverse au retour de balayage de potentiel. L'intensité du courant est la même, par contre les potentiels au maximas sont décalés de 0,059/n Volt (n = nombre d'électrons échangés dans la réaction).

Si l'on observe les deux signaux symétriques, le produit de la réaction redox est stable pendant le temps de la mesure. On parle alors d'un système réversible.

Pour le choix adéquat de potentiel de travail, nous avons tracé les courbes de voltamétrie cyclique avec le couple redox. Les figures II.36 (a), (b) et (c) montrent respectivement les courbes de voltamétrie cyclique de Au nu, Au/thiol et Au nu +Au/thiol.

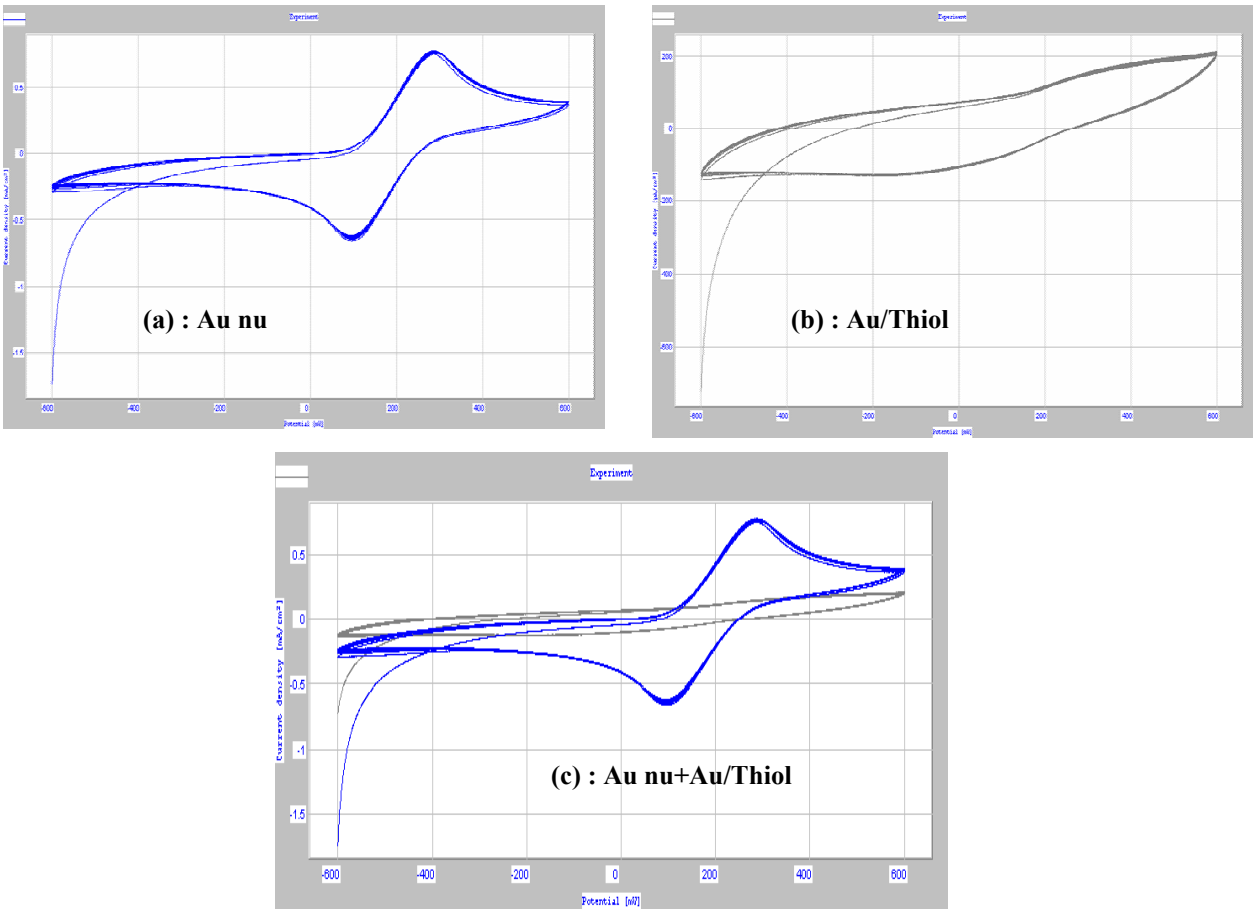


Figure II.36 : Courbes de voltamétrie cyclique de l'or nu et de l'or fonctionnalisé par de thiol

VIII- Conclusion

Les substrats utilisés sont composés de matériaux polymériques (polystyrène, PS) fonctionnalisés par des peptides ou des protéines d'adhésion afin de modifier l'énergie de surface.

Le polystyrène est adsorbé sur du verre fonctionnalisé par des greffages spécifiques (fonctions silanes). Cette surface modèle a été caractérisée par la mesure de l'angle de contact par les trois technique : la goutte posée, la bulle captive et le tensiomètre.

Afin de favoriser l'adhésion des cellules endothéliales, différentes protéines ont été déposées sur la surface avant la culture cellulaire : la fibronectine, le collagène, l'héparine, l'albumine, et l'immunoglobuline G.

La microscopie à force atomique (AFM) a été utilisée pour caractériser les différentes structures élaborées.

La réponse des cellules endothéliales adhérées sur les substrats étudiés est évaluée par :

- une étude qualitative des variations morphologiques de la cellule endothéliale : alignement, orientation selon la direction du flux et formation de pseudopodes.
- une quantification de la force d'adhésion cellulaire, du taux de détachement, de l'indice d'élongation ou du facteur de forme, du module d'élasticité et du coefficient de l'efficacité de détachement cellulaire. Ceci est réalisé par des techniques hydrodynamiques.
- un test d'adhésion réalisé par le marquage et le comptage des noyaux fluorescents des cellules endothéliales ensemencées sur les substrats fonctionnalisés par différentes protéines d'adhésion.
- un test de cytotoxicité pour quantifier la viabilité des cellules endothéliales sur ces différents substrats.
- la spectroscopie d'impédance électrochimique pour déterminer les propriétés électriques des cellules endothéliales.

Les résultats obtenus et leurs discussions feront l'objet des chapitres suivants.

Références bibliographiques

[1]: G. Binnig, C.F. Quate, Ch. Gerber, Atomic Force Microscope, Phys. Rev. Lett, 56 (1986), 930-933.
[2]: Harry O. Finklea; Self-assembled Monolayers on Electrodes, Electroanalytical Methods.
[3]: J. Collet, M. Bonnier, O. Bouloussa, F. Rondelez, D. Vuillaume; Electrical properties of end-group functionalised self-assembled monolayers, Microelectronic engieering, vol. 36, pp. 119-122, 1997.
[4] : Antonio CHECCO; Mouillage à l'échelle manométrique: effet des forces à longue portée et des hétérogénéités du substrat, Thèse de doctorat de l'université paris 6, 2003.
[5]: T. Nagaoka, Z. Chen,H. Okuno, M. Nakayama, K. Ogura; Self-assembled monolayer-based electrodes for selective determination of Cu^{2+} and Ag^{+} ions with antifouling activity against protein adsorption, Analytical Sciences, vol. 15, pp. 857-862, 1999.
[6]: J. Justin Gooding et all.; Parameters important in fabricating enzyme electrodes using self-assembled monolayers of alkanethiols, Analytical Sciences, vol. 17, pp. 3-9, 2001.
[7]: Frank Schreiber; Structure and growth of self-assembling monolayers, Progress in Surface Science, Vol. 65, pp. 151-257, 2000.
[8]: Cui, X., Jiang, D., Diao, P., Li, J., Tong, R., Wang, X., Assessing the apparent effective thickness of alkanethiol self-assembled monolayers in different concentrations of $Fe(CN)_6^{3-}$/$Fe(CN)_6^{4-}$ by ac impedance spectroscopy . Electroanalytical Chemistry. 470, 9-13, 1999.
[9]: Vladimir M. Mirsky, Michael Riepl, Otto S. Wolfbeis; Capacitive monitoring of protein immobilization and antigen-antibody reactions on monomolecular alklthiol films on gold electrodes, Biosensors & Bioelectronics, Vol. 12, pp. 977-989, 1997.
[10]: Lital Alfonta, Amos Bardea, Olga Khersonsky, Eugenii Katz and Itamar Willner; Chronopotentiometry and Faradaic impedance spectroscopy as signal transduction methods for the biocatalytic precipitation of an insoluble product on electrode supports: routes for enzyme sensors, immunosensors and DNA sensors, Biosensors & Bioelectronics, Vol. 16, pp. 675-687, 2001.
[11]: A. Ulman, An introduction to ultrathin organic films: from Langmuir-Blodgett to self-assembly, Academic Press, Boston, A, 1991.
[12] : Christophe Sirac, Thèse de Doctorat, Université de Limoges, 2003
[13] : Bos G.W., Scharenborg N.M., Poot A.A., Engbers G.H.M., Terlingen J.G.A., Beugeling T., Van Aken W.G., Feijen J., Adherence and proliferation of endothelial cells on surface-immobilized albumin-heparin conjugate, Tissue Enginering, 1998.
[14] : Wissink M.J.B., Beernink R., Poot A.A, Engbers G.H.M, Beugeling T., Van Aken W.G., Feijen J., Improved endothelialization of vascular grafts by local release of growth factor, submitted to J. Contr. Rel.
[15] : Van Oss C.J. (1996) Forces interfaciales en milieu aqueux. Ed.Masson, Paris.
[16] : Fowkes F.M., Attractive forces at interfaces. Industrial Engineering and Chemistry, 56 (12) (1964) 40-52.
[17]: Van Oss C.J., Chaudhury M.K., et Good R.J., The mechanism of phase separation of polymers in organic media-apolar and polar systems. Separation Sciences Technology, 24 (1989a) 15-30.
[18]: Van Oss C.J., Ju L., Chaudhury M.K., et Good R.J. Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact angle measurements on gels. Journal of Colloid and Interface Science, 182 (1989b), 313-319.

[19]: Extrand C.W. et Kumagai Y., Liquid drops on an inclined plane : the relation between contact angles, drop shape, and retentive force. Journal of Colloid and Interface Science 170 (1995), 515-521.
[20]: Busscher H.J., van Pelt A.W.J., de Boer P., de Jong H.P., et Arends J., the effect of surface roughening of polymers on measured contact angles of liquids. Colloids and Surfaces, 9 (4) (1984b), 319-331.
[21]: Lam C.N.C, Wu R., Li D., Hair M.L, Neumann A.W. ; Study of the advancing and receding contact angles: liquid sorption as a cause of contact angle hysteresis. Advancs in Colloid and Interface Science, 96 (2002), 169-191.
[22]: Bouaziz A., Richert A. Caprani A. Vascular endothelial cell responses to different electrically charged poly(vinylidene fluoride) supports under static and oscillating flow conditions. Biomaterials 18 (1997) 107-112.
[23]: Wirth C., Comte V., Lagneau C., Exbrayat P., Lissac M., Jaffrezic-Renault N., Ponsonnet L., Nitinol surface modulates invitro cell response: A comparaison between fibroblasts and osteoblasts. Materials Science and Engineering C25 (2005) 51-60
[24]: Masmann Tim, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, Journal of immunological methods 65 (1983) 55-63.
[25]: Berridge M., Tan A., characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction
[26] Charara J., Doillon C., Lemay J., Ruel J., Dumas G., Effet de l'écoulement sur le devenir des cellules endothéliales : dispositifs d'études revue et commentaires. RBM. 8 (15) (1993) 435-445.
[27] Van Kooten T.G., Schakenraad J.M., Vander Mei H.C., Dekker A., Kirkpatrick C.J., Walter M., Korzec D., Engemann J., Busscher J. H., Fluid shear induced endothelial cell detachment from modified polystyrene substrata, Colloids and surfaces B: Biointerfaces 3 (1994) 147-158.
[28] Deshpande M. and Vaishnav R. W., Wall stress distribution due to jet impingement Journal of Engineering Mechanics 2 (109) (1983) 479-493

[29] Deshpande M. and Vaishnav R. W., Submerged laminar jet impingement on a plane J. Fluid Mech. 114 (1982) 213-236
[30] Vaishnav R. W., Patel D.J., Atabek H. B., Deshpande M., Plowman F. and Vossoughi J. Determination of the local erosion stress of the canine endothelium using a jet impingement method, Biomechanical Engineering 105 (1983) 77-83
[31]: Deshpande M. and Vaishnav R. W. "Wall stress distribution due to jet impingement", Journal of Engineering Mechanics 2 (109) (1983) 479-493
[32]: Deshpande M. and Vaishnav R. W., "Submerged laminar jet impingement on a plane", J. Fluid Mech. 114 (1982) 213-236
[33]: Nishiyama T., Tsunenaga M., Akutsu N., Horii I., Nakayama Y., Adachi E., Yamato M., Hayashi T., Dissociation of actin microfilament organization from acquisition and maintenance of elongated shape of human dermal fibroblasts in three dimensional collagen gel, matrix 13 (1993) 447-455.
[34]: F. Josse, R. Lukas, R. Zhou, S. Schneider, D. Everhart, AC-impedance-based chemical sensors for organic solvent vapors, Sensors and Actuators B, 1996, 363-369.
[35]: Saito Y., Kataoka H., Sakai T., Deki S., Conduction properties of lithium gel electrolytes investigated by impedance spectroscopy and pulsed-field gradient NMR with electric field, Electrochimica Acta, 2001, 1747-1751.
[36]: Wei-Chih Chen, Ten-Chin Wen, A. Gopalan, Negative capacitance for polyaniline: an analysis via electrochemical impedance spectroscopy, Syntthetic Metals, 2002, 179-189.

[37]: Ya-Jie Chen, Xiao-Yu Zheng, Zhen-Ya Li, Role of grain boundaries on magnetoresistance of CrO_2-TiO_2 composites: impedance spectroscopy study, Journal Of Magnestism and Magnetic Materials, 2003, 152-160.
[38]: Yu-Qing Miao, Jian-Guo Guan, Probing of antibody-antigen reactions at electropolymerized polyaniline immunosensors using impedance spectroscopy, Analytical Letters, 2004, 1053-1062.
[39]: J. R. Collet-Lacoste, The electrochemical impedance spectroscopy and associated transfer functions non-equilibrium thermodynamics consideration, Electrochimica Acta, 2004, 4967-4977.
[40]: J. Zhang, X. D. Su, S. J. O'Shea, Antibody/antigen affinity behavior in liquid environment with electrical impedance analysis of quartz crystal microbalances, Biophysical Chemistry, 2002, 31-41.
[41]: Irene Barinaga-Rementeria Ramirez, Lars Ekblad, Bengt Jergil, Affinity partitioning of biotinylated mixed liposomes: effect of charge on biotin-neutravidin interaction, Journal of Chromatography B, 2000, 389-396.
[42] : Hubert H. Girault, Electrochimie : physique et analytique, Presses polytechnique et universitaires romandes.

CHAPITRE III

Résultats et discussion : 1ère partie : Caractérisation du substrat

Plusieurs techniques ont été adaptées pour modifier les propriétés physiques et chimiques de la surface d'un matériau (tableau ci-dessus). Ces méthodes conduisent à des variations de l'énergie de surface, de la nature des charges présentes et de la composition chimique de la surface. Ces modifications modulent la réponse du système biologique lors de son contact avec le matériau.

Revêtement non covalent de la surface	**Revêtement covalent de la surface**
Dépôt de film Langmuir-Blodgett*	Greffage chimique
Couches auto-assemblées (thiol/or)	Silanisation
Modification biologique par adsorption de molécules biologiques	Modification biologique par adsorption de molécules biologiques

Tableau III-1 Techniques de modification de surface (* méthode non utilisé)

I- Caractérisation physico-chimique du substrat

I- 1 Etude comparative de différentes techniques d'évaluation de la mouillabilité : La goutte posée, la bulle captive et le tensiomètre

Après examen des angles de contact ainsi que les énergies de surface calculées en se basant sur le modèle de Van Oss [1], on a pu conclure que les trois techniques goutte posée, bulle captive et tensiomètre convergent vers les mêmes tendances pour l'état d'hydrophobicité ou d'hydrophilicité du substrat. Lorraine et ses collaborateurs [2] pensent que la tensiométrie réduit la subjectivité de l'opérateur puisque toutes les mesures sont automatisées et c'est pour cette raison que nous l'avons adoptée pour la caractérisation des substrats fonctionnalisés par différentes protéines. Cependant les mesures sont dynamiques et si elles apportent des informations très riches sur la dynamique moléculaire des chaînes polymériques, la goutte posée et la bulle captive restent des mesures à l'équilibre intéressantes au sens où elles permettent de vérifier l'hétérogénéité d'une surface avec une meilleure résolution spatiale que le tensiomètre dont la mesure est globale. En revanche la goutte posée reste sensible à la contamination par l'environnement extérieur (forme de goutte perturbée au point triple par la diffusion d'espèces adsorbées sur la surface) alors que la bulle captive et le tensiomètre y sont moins sensibles. Cependant, la bulle captive ne permet pas d'obtenir une mesure fiable avec un substrat trop hydrophile car un film d'eau se forme à la surface et les bulles d'air ont du mal à se fixer pour une bonne mesure de l'angle. Ainsi, dans notre étude, notre choix s'est porté sur le tensiomètre essentiellement en vertu de ses capacités à apporter des informations

sur la mobilité des chaînes de protéines (via l'hystérèse) car la conformation des protéines, leur mobilité potentielle en milieu aqueux et leur capacité à se réorienter lors des processus bioadhésifs sont des paramètres qui peuvent moduler l'adhésion des cellules eucaryotes sur ces protéines.

I-2 Résulats

L'énergie de surface est évaluée pour tous les différents états de substrat par la goutte posée, la bulle captive et le tensiomètre (figure III -1a). Pour chaque état de surface, la valeur de la mouillabilité dépend de la méthode adaptée. L'énergie de surface varie avec l'étape de fonctionnalisation du substrat et traduit l'état de surface étudié. Les valeurs de l'énergie de surface données par la bulle captive sont inférieures à celles données par la goutte posée sauf pour les échantillons fonctionnalisés par la fibronectine. Il s'est avéré aussi que la technique de la bulle captive aboutit à des énergies de surface inférieures à celles déterminées par la balance de Wilhelmy sauf pour les échantillons fonctionnalisés par la fibronectine et le polystyrène. L'énergie de surface suit un ordre croissant qui est le suivant : V/OTS <V/OTS/Ps <V/OTS/Ps/Fn<V (V : verre, OTS : Octadécyltrichlorosilane, Ps : Polystyrène, Fn : Fibronectine). Cet ordre a été vérifié pour les trois méthodes.

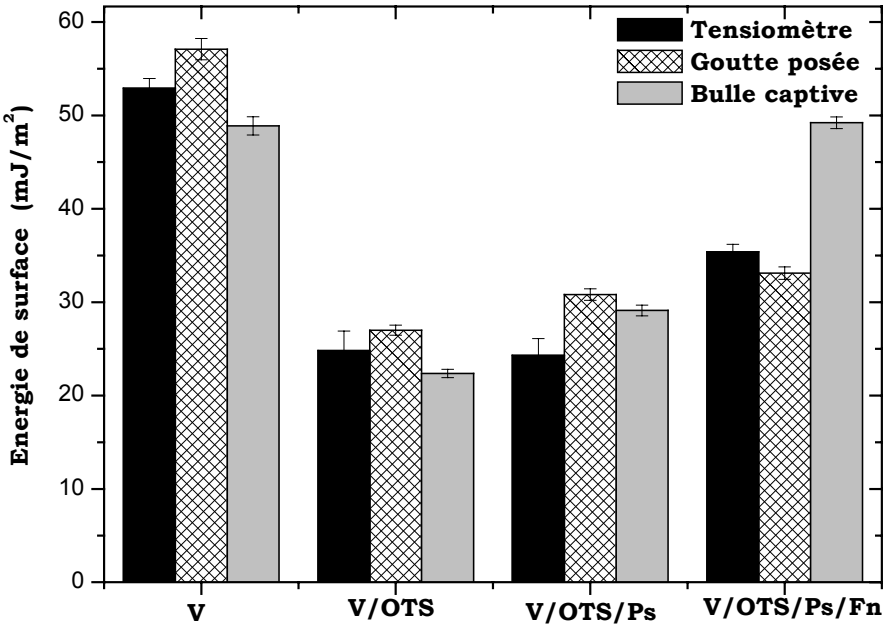


Figure III. 1a : La variation de l'énergie libre totale (γ^S: SFE) en fonction des méthodes de caractérisation de la mouillabilité: tensiomètre, goutte posée et bulle captive

Les angles de contact montre la même variation que l'énergie de surface (figure III- 1b). La hiérarchie d'hydrophobie est la suivante V< V/OTS/Ps/Fn< V/OTS≤ V/OTS/Ps.

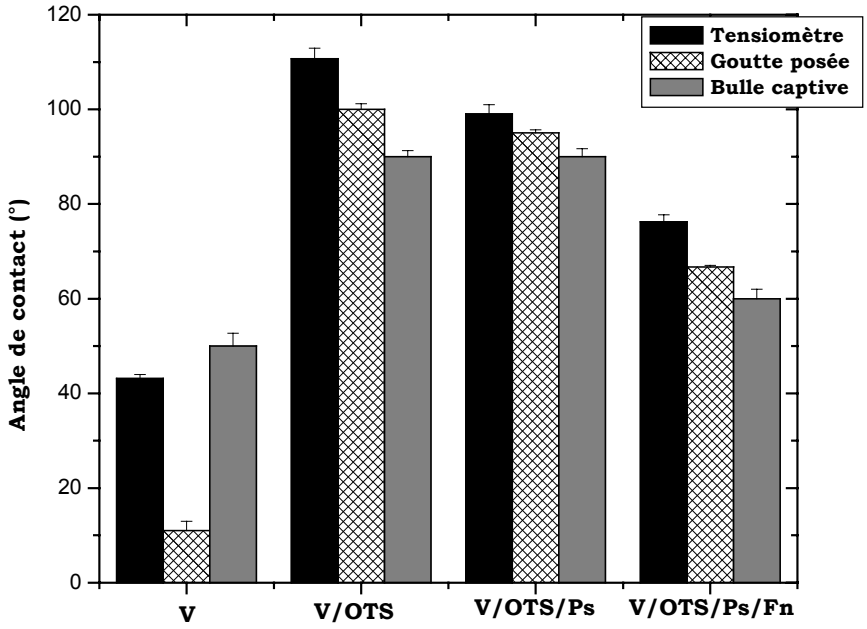


Figure III.1b : La mesure de l'angle de contact par les trois techniques: tensiomètre, goutte posée et bulle captive. V: verre, OTS: Octadecyltrichlorosilane, Ps: Polystyrène, Fn: Fibronectine.

Les composantes dispersives calculées, à partir des mesures d'angle de contact par la goutte posée et le tensiomètre, sont similaires. Cette composante suit le même ordre trouvé pour l'énergie de surface. Cependant, la technique de la bulle captive donne des résultats différents de ceux trouvées par les deux autres méthodes surtout pour le verre, le verre fonctionnalisé par l'octadécyltrichlorosilane et le verre couvert par les différentes couches de silane, de polystyrène et de fibronectine. La composante dispersive du verre traité à la fois par le silane et le polystyrène montre des valeurs voisines pour les trois méthodes (Figure III- 1c).

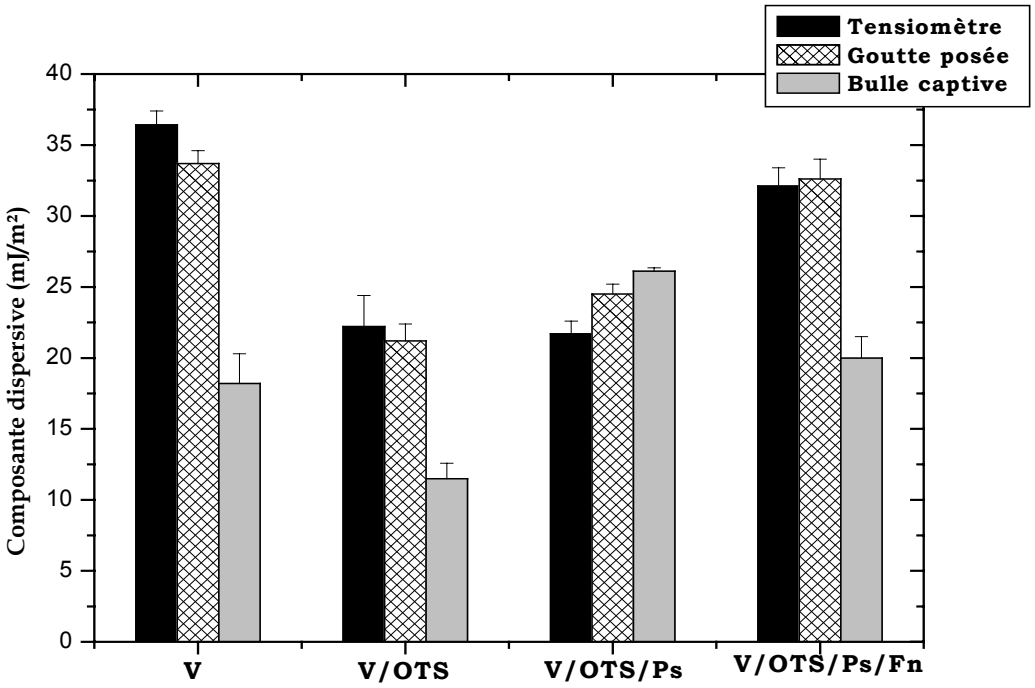


Figure III.1c : La composante Dispersive de l'énergie libre de surface (γ^D) pour différents substrats mesurée par les trois techniques: tensiomètre, goutte posée et bulle captive. V: verre, OTS: Octadecyltrichlorosilane, Ps: Polystyrène, Fn: Fibronectine

La valeur de la composante polaire révélée par la bulle captive est supérieure à celles détectées par les deux autres techniques. Les trois méthodes convergent en composante polaire pour le substrat traité par le silane et le polystyrène. La classification de différents substrats suit l'ordre croissant suivant en composante polaire selon la goutte posée et le tensiomètre : V/OTS/Ps/Fn <V/OTS/Ps < V/OTS <V. Par contre, cet ordre change avec la technique de la bulle captive : V/OTS/Ps < V/OTS < V/OTS/Ps/Fn <V (figure III- 1d).

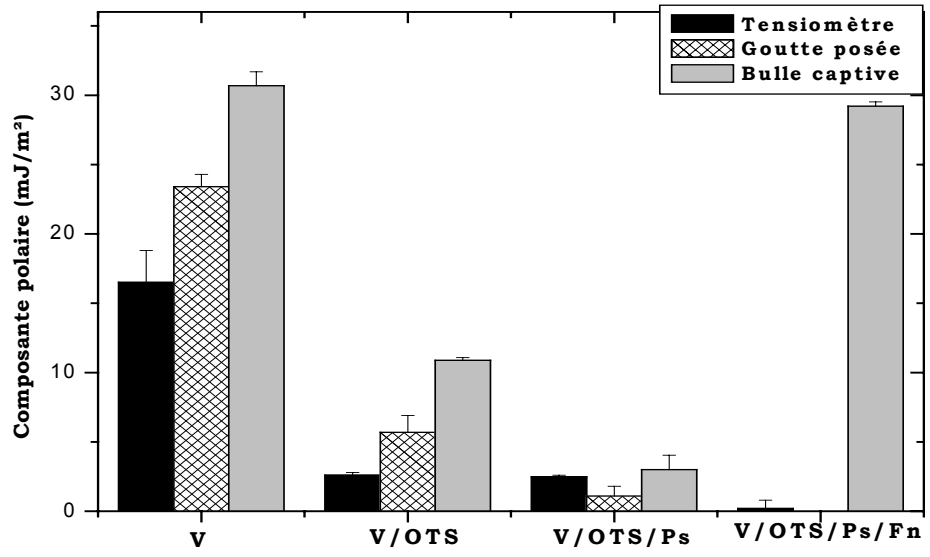


Figure III.1d : Composante polaire de l'énergie libre de surface (γ^P) pour différents substrats mesurée par les trois techniques: tensiomètre, goutte posée et bulle captive. V: verre, OTS: Octadecyltrichlorosilane, Ps: Polystyrène, Fn: Fibronectine.

Le verre couvert par les différentes couches de silane, de polystyrène et de protéine montre une composante acide faible révélée par les deux techniques de la goutte posée et de la balance de Wilhelmy. Le caractère basique domine tout état de surface utilisé sauf pour le silane et polystyrène qui se comportent en tant qu'échantillons neutres. La hiérarchie croissante de la composante basique est la suivante : V/OTS/Ps ~ V/OTS < V/OTS/Ps/Fn <V (figure III- 2).

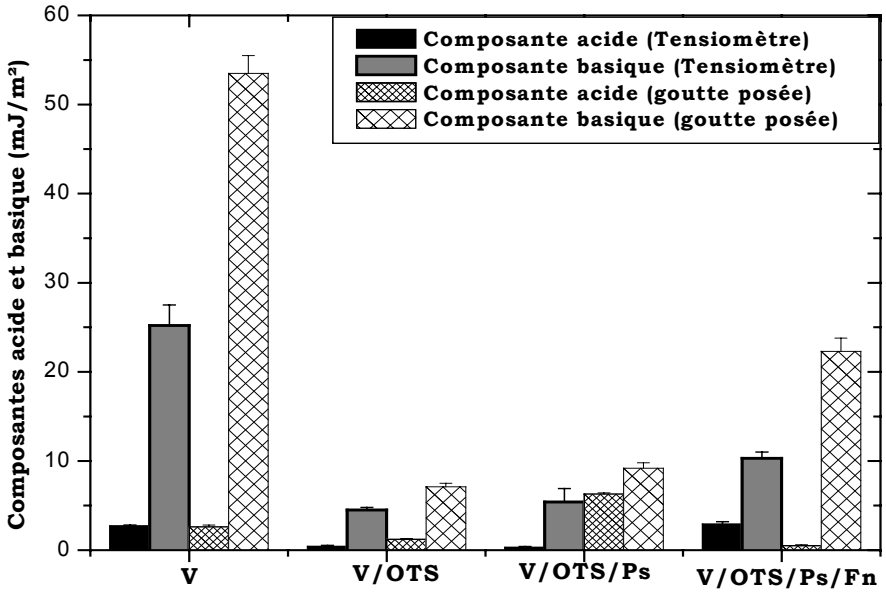


Figure III.2 : Composantes acides et basiques (γ^A, γ^B) pour différents substrats obtenues par les deux techniques: tensiomètre, goutte posée. les différents substrats sont V, V/OTS, OTS/Ps et V/OTS/Ps/Fn.

Les résultats montrés dans la figure III- 3 (a, b, c, et d) sont obtenus par le tensiomètre pour les différentes protéines utilisées. Les angles à l'avancée et en retrait sont présentés par la figure 3a. La hiérarchie d'hydrophobicité pour les substrats est la suivante : V < V/OTS/Ps/A < V/OTS/Ps/IgG <V/OTS/Ps/Fn < V/OTS/Ps/H < V/OTS/Ps/C < V/OTS/Ps < V/OTS (A : albumine, IgG : immunoglobuline G, Fn : fibronectine, H : héparine, C : collagène). Le verre et l'albumine ont le même caractère hydrophile. Les angles de contact donnés par les protéines balayent tout le spectre de l'hydrophilie à l'hydrophobicité. Les angles au retrait sont inférieures aux angles à l'avancée et atteignent une valeur nulle pour la fibronectine et l'héparine.

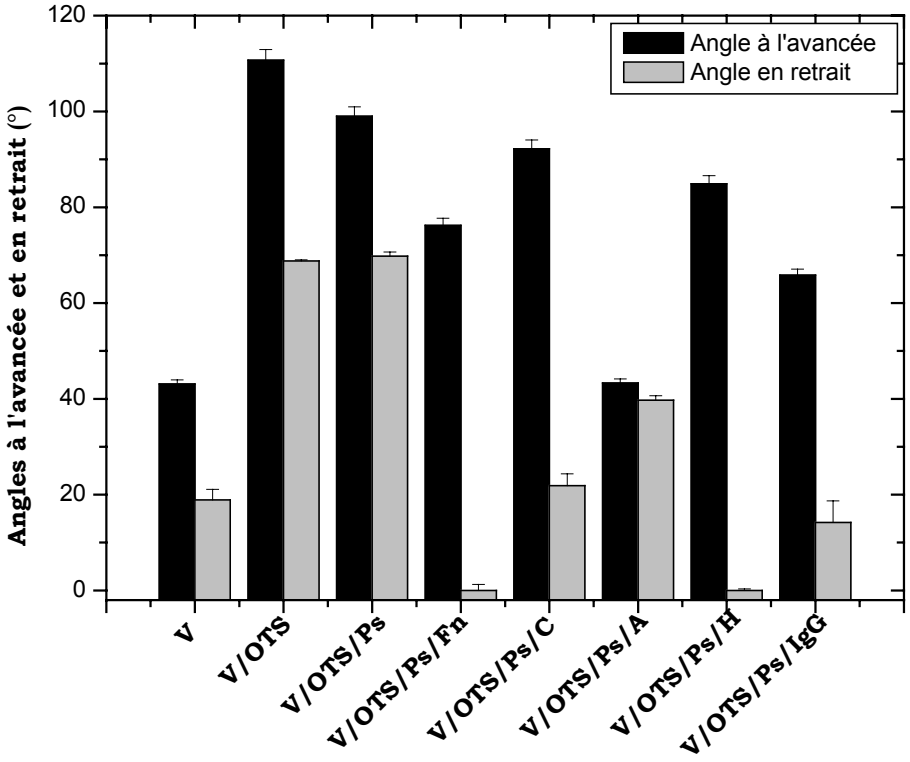


Figure III.3a : Mesure de l'angle de contact en dynamique: angle à l'avancée et de retrait (θ_a, θ_r).

L'hystérèse est déduite des courbes stables et reproductibles de cinq cycles successifs observés pour chaque substrat. L'ordre suivant peut être mentionné : V/OTS/Ps/A < V < V/OTS/Ps < V/OTS < V/OTS/Ps/IgG < V/OTS/Ps/C < V/OTS/Ps/Fn < V/OTS/Ps/H. On peut constater que l'hystérèse de l'albumine est particulièrement faible (figure III- 3b).

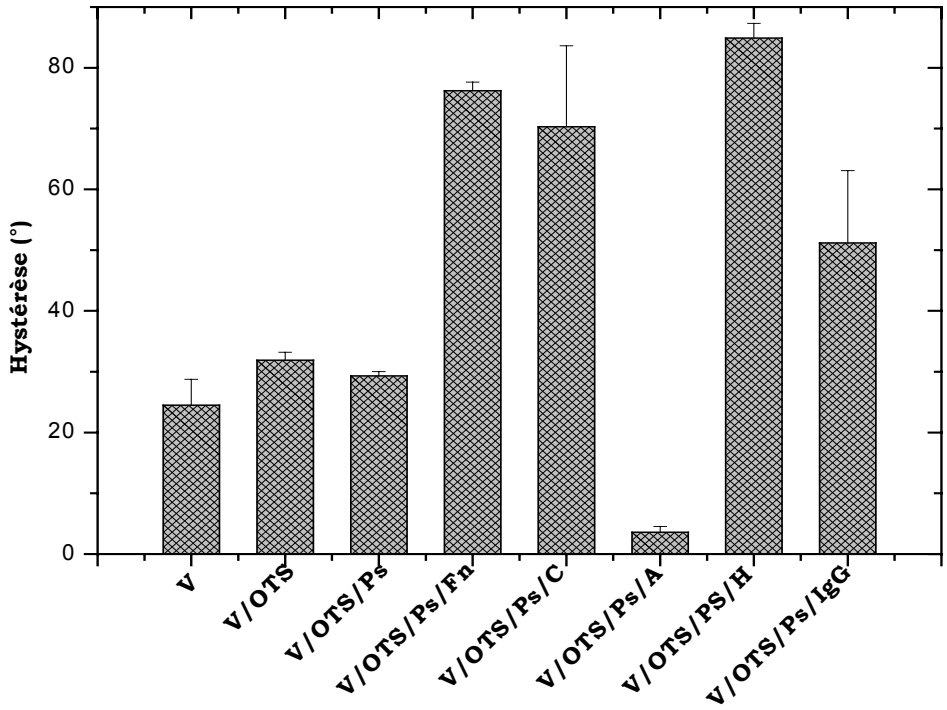


Figure III.3b : Mesures de l'hystérèse pour différents substrats ($H = \theta_a - \theta_r$),

L'énergie de surface et la composante dispersive des protéines sont présentées dans la figure III- 3c. Le même ordre pour les angles à l'avancée mentionné dans la figure III- 3a, est révélé ici pour les énergies de surface.

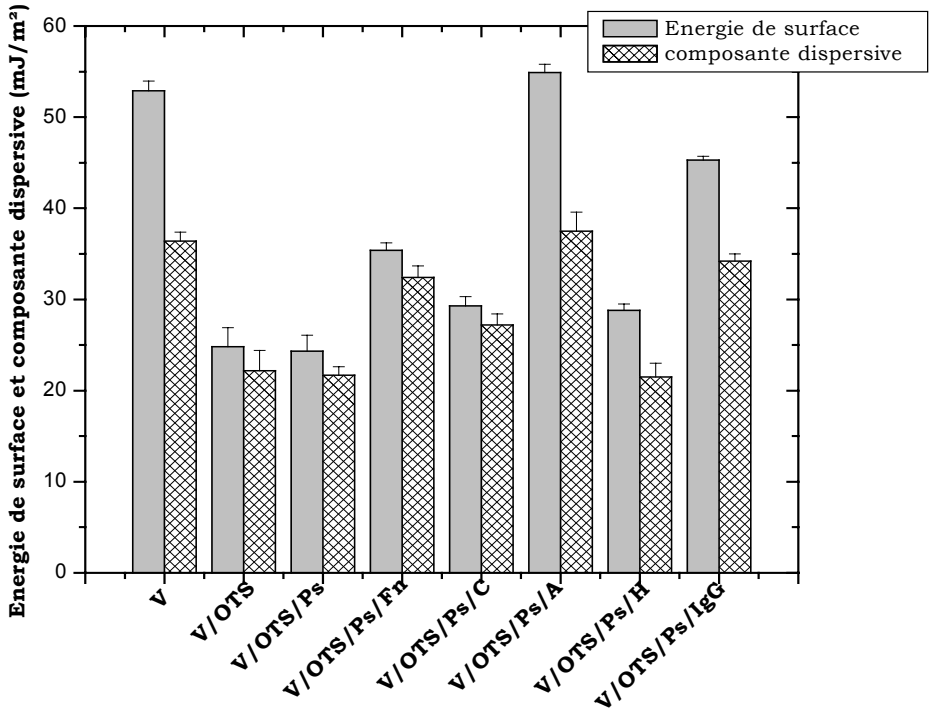


Figure III.3c : La composante de l'énergie libre totale (SFE) et la composante dispersive (γ^S, γ^D) pour différents substrats.

Le caractère basique est évident pour le verre et aussi pour la fibronectine et l'albumine. Les substrats fonctionnalisés par l'albumine, l'héparine et l'immunoglobuline G se comportent en tant que échantillons acides. On peut dire alors que l'albumine présente à la fois une composante acide et une composante basique importantes. Les substrats les plus polaires sont le verre et l'héparine (figure III- 3d).

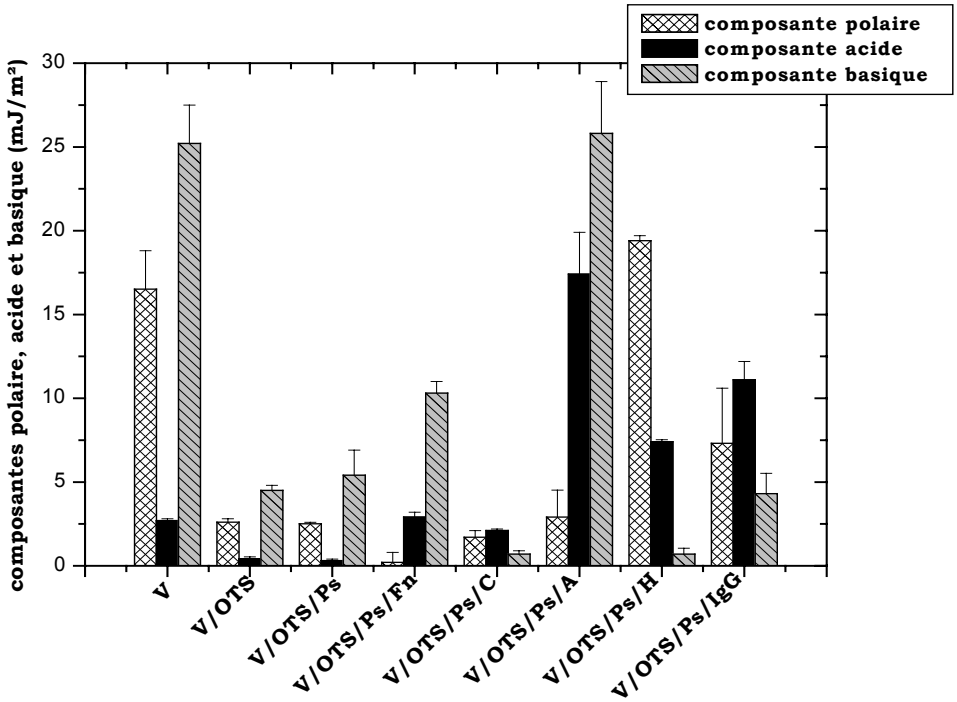


Figure III.3d : Les composantes Polaire, acide et base (γ^P, γ^A, γ^B) pour différents substrats.

I-3 Discussion

I-3.1 Etude de la mouillabilité du Verre/Octadécyltrichlorosilane/Polystyrène

Tout d'abord en examinant les angles de contact à l'eau, on remarque que le verre se comporte comme une surface hydrophile ayant une composante polaire (16,5±2) et une composante basique (25±2,3). Pour passer de ce caractère hydrophile à un autre hydrophobe, il suffit de traiter le verre par l'octadécyltrichlorosilane. La mesure dynamique de l'angle de contact d'une surface traitée par un silane indique le caractère hydrophobe ($\theta = 110,7^o \pm 3$), ce qui a été déjà révélé par Buijs et Hlady pour tous les silanes [C_{18}, $\theta = 107^o$] [3]. Cet agent de couplage facilite l'adsorption du polystyrène. Un tel angle de contact a été évoqué par Spasford et ses collaborateurs ($\theta = 90^o \pm 5,1$) et Kooten ($\theta = 88^o$) [4,5]. D'autre part Kooten signale qu'une hystérèse de l'ordre ($\Delta\theta = 39^o$-41^o) est un argument de l'hétérogénéité de surface et une réorientation des groupes fonctionnels. Timmons et Zisman mentionnent, par contre, que cette pénétration apparente des molécules d'eau peut causer une hystérèse élevée ;

ceci est du au volume moléculaire faible de l'eau ($18cm^3$/gmoles). Good et ses collaborateurs ont modélisé ces boucles reproductibles et stables [6]. Ayant une mobilité suffisante, les films de polystyrène se réorientent et se restructurent en réponse à leur microenvironnement local pour minimiser leur énergie libre interfaciale avec la phase globale. Cette énergie est la cause principale de l'orientation du dipôle dans la phase aqueuse. Ces processus sont fonction du temps et de la température et correspondent aux caractéristiques de relaxation. De ce fait, on travaille à 20ºC où on est à égale unité des électrons donnés et des électrons acceptés de l'eau [1]. Il est alors difficile de mesurer des angles de contact sur des surfaces biologiques à cause de l'hydratation, de la porosité et de l'hétérogénéité du substrat. La présence des polymères peut entraîner des interactions stériques qui peuvent soit permettre soit inhiber l'adhésion cellulaire [7].

I-3.2 Etude de la mouillabilité de différentes protéines

L'ordre établi dans la figure 3, correspond à une hydrophobicité croissante des substrats fonctionnalisés et spécialement à une classification de l'état hydraté des protéines utilisées : V <V/OTS/Ps/A<V/OTS/Ps/IgG<V/OTS/Ps/Fn<V/OTS/Ps/H<V/OTS/Ps/C<V/OTS/Ps<V/OTS

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Van Oss pour l'immunoglobuline G et l'albumine humaine, pour leur adsorption à une surface hydrophobe. Cet ordre est valable pour l'énergie de surface et la composante dispersive.

La contribution des protéines de la matrice extracellulaire pendant les processus d'adhésion est investiguée. Les protéines sont des surfactants polymériques et ne sont pas seulement adsorbées mais aussi altérées à cause de leur activité interfaciale. Les interactions majeures qui entraînent cette activité protéique sont les effets hydrophobes, les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogènes. Tout d'abord, la fibronectine avec 460-500 kDa (120 x 2,5nm³) en chaîne allongée montre un angle de contact de (θ = 76,2º±10) ce qui marque l'optimum de l'activité biosynthétique cellulaire évoquée par Groth et Altankov (θ = 60º) [8]. Comme la fibronectine, l'héparine a un angle au retrait très faible et une hystérèse importante (figures 3-a, 3-b) ce qui peut être expliqué par sa grande masse moléculaire de 10^6 Da et par son hétérogénéité chimique caractéristique. L'hydrophobicité du collagène est similaire à celle de la fibronectine, ce qui nous rappelle sa structure fibreuse rigide et sa faible polarité. Bartolo et ses collaborateurs [9] indiquent un angle à l'eau θ = 84º±2,2 pour le collagène naturel ce qui confirme nos résultats.

L'affinité des peptides d'adhésion pour des cellules est étroitement signalée par les intégrines. On cite le motif RGD identifiée pour le collagène et la fibronectine [10] (Durrieu et al, 2003). L'albumine du sérum bovin (67KDa, 11x6x2,7x2,7) a une conformation ellipsoïde à multidomaines (3), avec des groupements disulfides et un degré élevé des hélices α. Le modèle cinétique de l'adsorption de cette protéine à l'interface est maîtrisé par les processus de diffusion et de son taux de collision. Cette diffusion est tolérée par les sites hydrophobiques non périphériques. L'adsorption de cette protéine globulaire à l'interface air/liquide commence par une étape de diffusion suivie d'un dépliement partiel des chaînes à l'interface. L'immunoglobuline G (PM=150KDa, 14,2x8,5x3,8, forme, ellipsoïde) est une protéine formée par deux chaînes légères et deux chaînes lourdes identiques. Une telle conformation rend la molécule très active et capable d'agréger vu sa polarité et son affinité monomoléculaire. Le contact entre ces protéines est étroit et ceci les rend instables à cause de l'élévation de leur volume moléculaire. Alors ces polymères tendent à l'agrégation pour atteindre la plus petite énergie de combinaison. Cette agrégation peut être expliquée par la théorie de la structure dissipative [11]. Lassen et Malnsten affirment que l'adsorption de l'albumine et l'IgG sur des surfaces hydrophobes dépend de la quantité adsorbée et de la viscosité de cette adsorption. Ils proposent l'ordre suivant IgG > BSA ce qui correspond à l'ordre de leur hydrophobicité dans l'état hydraté (θ = 65,8º > 43,3º). D'autre part, Schamberger et ses collaborateurs [12] proposent que IgG et BSA soient des inhibiteurs de l'adhésion cellulaire. Du point de vue interactions électrostatiques, Ho et Hladay [13] montrent que les zones électrostatiques locales d'une protéine interagissent avec les charges complémentaires de la surface.

II- Etude de la morphologie de la surface

II-1 Paramètres conventionnels de mesure de la rugosité

La rugosité joue un rôle important dans tout processus où la surface est impliquée en tant qu'interface, tel qu'en médecine dentaire, en orthopédie, en chirurgie cardiaque [14]. De nombreux paramètres et fonctions statistiques ont été définis afin de quantifier les propriétés topographiques moyennes d'une surface [15]. Ces fonctions caractérisent deux aspects de base de la topographie, la hauteur des aspérités (amplitude) et l'écart longitudinal entre ces dernières (période spatiale). Les données sont normalement prises le long d'une ligne et sont définies en terme de profil de surface bidimensionnelle y(x). De plus, la caractérisation microgéométrique d'une surface rugueuse passe par un certain nombre d'étapes obligatoires qui sont l'acquisition des données z(x,y) puis par le traitement des informations (redressement

des profils, filtrage, calculs de paramètres de forme d'une courbe : degré d'arrondissement, degré d'élongation). Les irrégularités augmentent la surface réelle du métal au contact du milieu réactionnel [16].

L'étude géométrique d'une surface est définie [15-16] par $\mathbf{R_a}$ (évaluée en µm), le paramètre le plus utilisé, qui est la moyenne arithmétique des valeurs des écarts par rapport à un plan moyen pris sur la surface de l'échantillon

$$\mathbf{Ra = L_0^{-1} \int (y(x))\, dx}$$

Où L_0 est la longueur d'évaluation et y(x) l'amplitude du tracé par rapport à la ligne moyenne. Celle-ci est une ligne idéale ou l'aire des espaces pleins au-dessus d'elle est égale à l'aire des espaces vides en dessous d'elle. Cependant cette valeur ne donne aucune idée de la forme des aspérités par exemple, aigues ou émoussées.

Un deuxième paramètre, $\mathbf{R_q}$ (ou RMS : root mean square) est la valeur de la racine carrée de la moyenne des carrés des écarts le long du profil de surface de la ligne échantillonnée. Mesuré en µm, ce paramètre est plus sensible aux valeurs extrêmes que ne l'est le R_a en raison de l'utilisation de la racine carrée.

$$\mathbf{R_q = (L_0^{-1} \int (y^2(x)dx))^{1/2}}$$

II-2 Topographie du verre fonctionnalisé

La topographie et la rugosité des matériaux sont des paramètres importants dans l'adhérence et la prolifération cellulaire. En effet, selon le type cellulaire, les cellules adhèrent plus ou moins sur des surfaces lisses ou rugueuses.

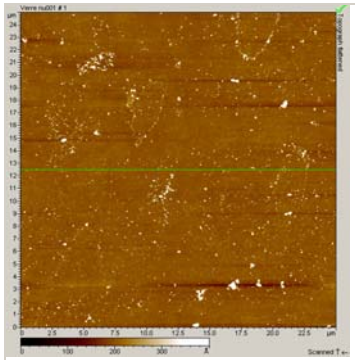
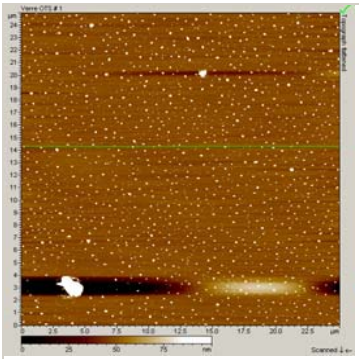
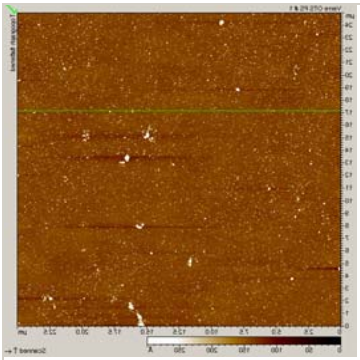
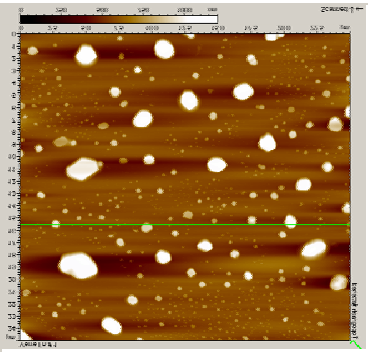
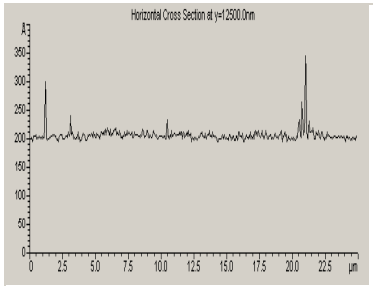
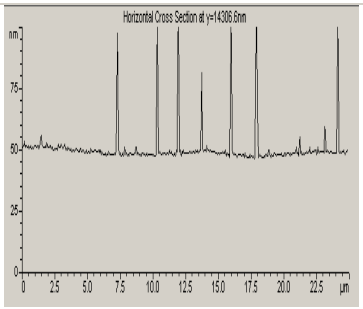
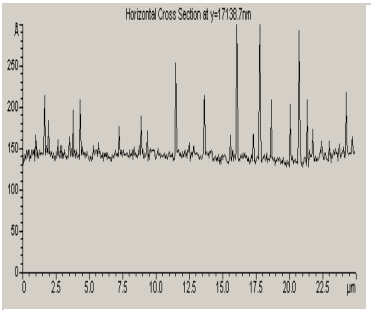
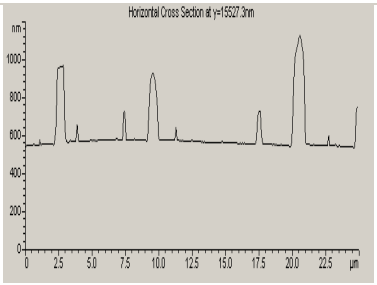
Echantillons	*Verre nu*	*V/OTS*	*V/OTS/PS*	*V/OTS/PS/FN*
Image AFM				
Profil transverse				
RMS (nm)	*2,62*	*24*	*2,23*	*130*

Tableau III- 2 : Images AFM, profil transverse et calcul de rugosité pour les structures suivantes : Verre nu, V/OTS, V/OTS/PS et V/OTS/PS/FN.

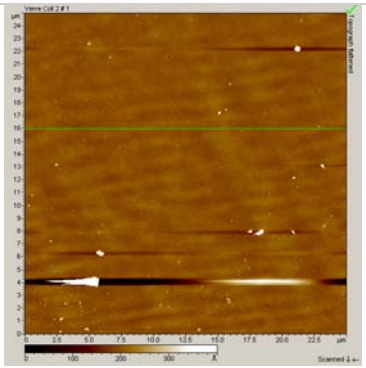
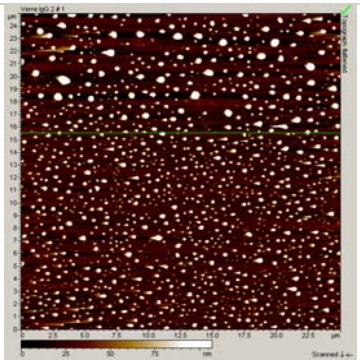
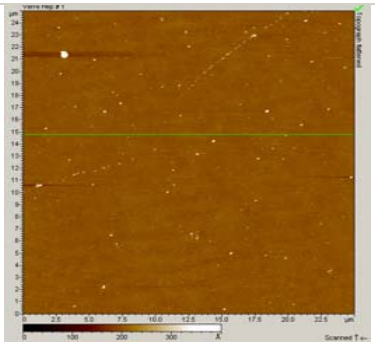
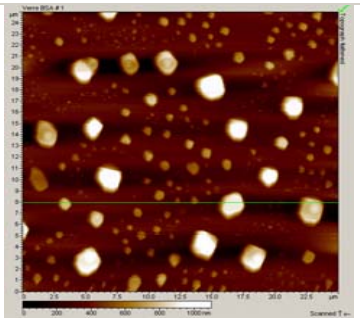
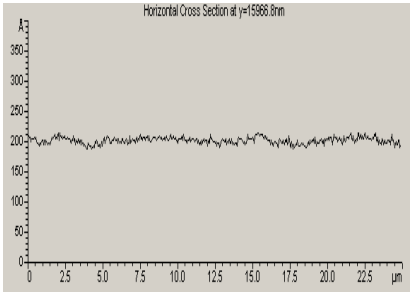
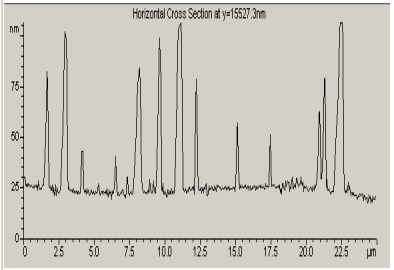
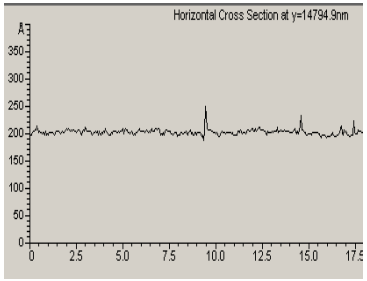
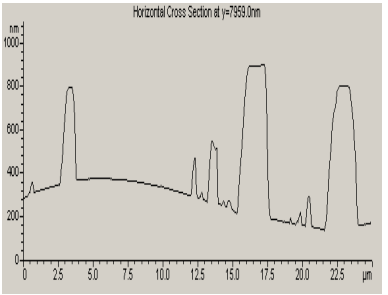
Echantillons	*V/OTS/PS/Coll*	*V/OTS/PS/IgG*	*V/OTS/PS/Hép*	*V/OTS/PS/BSA*
Image AFM				
Profil transverse				
RMS (nm)	***5,30***	***24,3***	***1***	***163***

Tableau III -3 : Images AFM, profil transverse et calcul de rugosité pour les structures suivantes : V/OTS/PS/Coll, V/OTS/PS/IgG, V/OTS/PS/Hép et V/OTS/PS/BSA.

Le suivi de l'évolution de la topographie du substrat, estimée comme un critère de caractérisation de l'état de surface, a été présenté dans les tableaux ci-dessus (mesures obtenues en mode tapping par Mr Olivier Thoumire de l'Université de Rouen). L'image topographique de la surface du verre nu révèle une haute uniformité caractéristique d'une surface plane et dépourvue d'agrégats. Sa rugosité est de l'ordre de 2,62 nm. L'analyse de l'image AFM de l'échantillon de structure verre/OTS montre la formation d'agrégats de petite taille qui sont uniformément repartis sur toute la surface de l'échantillon. L'image donnée par le profil transverse indique que ces agrégats sont de largeur de l'ordre de 0,5 µm et de plus de 40nm de hauteur. Nous obtenons une rugosité moyenne RMS de 24 nm pour ces échantillons. La surface de la structure Verre/OTS/Polystyrène est particulièrement plane par comparaison à celle de la surface de verre fonctionnalisé par l'OTS qui est très rugueuse. Elle présente une rugosité de l'ordre de 2,23 nm.

Nous proposons dans le cadre de cette caractérisation morphologique d'étudier l'effet de différente protéine sur l'état de surface des substrats de type Verre/OTS/Polystyrène. Dans le cas de la fibronectine, l'image AFM obtenue montre une distribution bimodale en taille des agrégats. Cette répartition hétérogène révèle l'existence de deux populations d'agrégats de dimension latérale respectivement 1 et 0,3 µm. Ils s'élèvent à une hauteur respectivement de 350 et 100 nm. Ce qui donne une rugosité RMS très élevée de l'ordre de 130 nm. Contrairement à la fibronectine, le collagène a pour effet de ne pas augmenter significativement la rugosité de surface de polystyrène. Pour les échantillons de type Verre/OTS/PS/Collagène, l'image topographique nous montre un état de surface uniforme et homogène. Ceci est bien illustré dans l'image de profil transverse qui révèle un état de surface plan et dépourvu d'agrégats. L'immunoglobuline présente une morphologie différente de celle des autres couches de protéines déposées sur le substrat Verre/OTS/PS. Son image AFM montre la formation des îlots qui sont répartis quasiment sur la totalité de la matrice de polystyrène. La rugosité RMS de ce type d'échantillon est de l'ordre de 24 nm. L'héparine possède un état de surface plan, homogène et très peu rugueuse similaire à celui obtenu avec le collagène. L'image AFM des échantillons d'albumine montre la formation d'îlots de grande taille qui atteignent 2,5 µm et leur hauteur est de l'ordre 600 nm. Cette hétérogénéité de surface nous donne une valeur très élevée de la rugosité RMS qui est de 160 nm.

Cette étude qualitative, nous a permis de conclure que les diverses protéines étudiées présentent différentes morphologies indiquant des états de surface variés.

II-3 Topographie de l'or fonctionnalisé

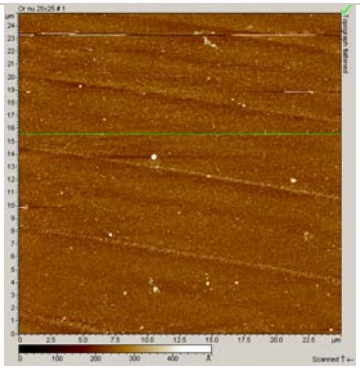
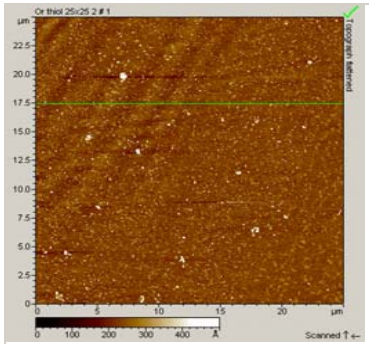
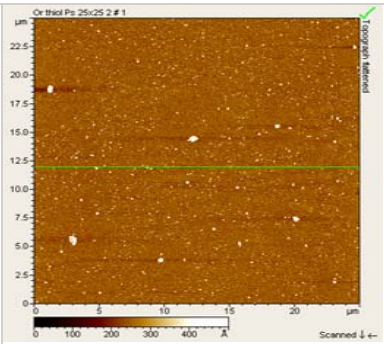
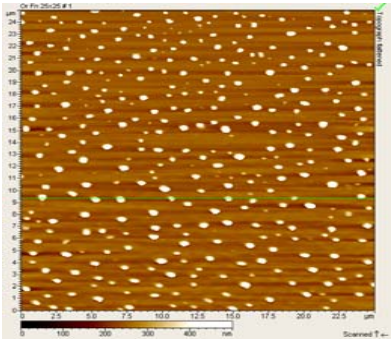
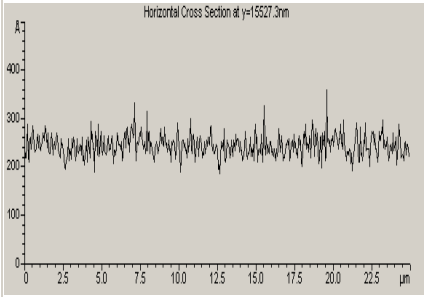
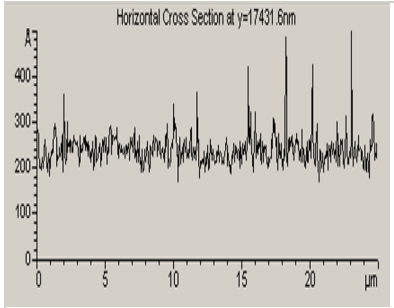
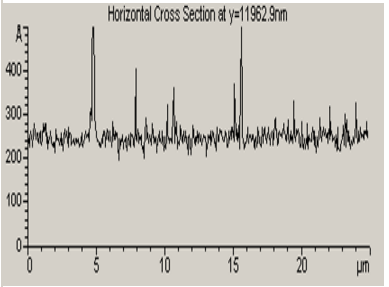
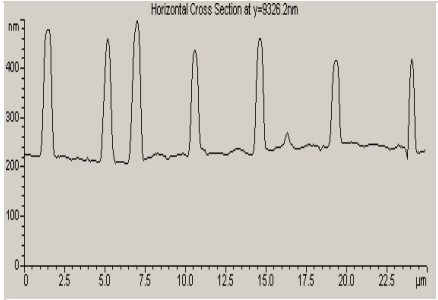
Echantillons	*Or nu*	*Or/Thiol*	*Or/Thiol/PS*	*Or/Thiol/PS/FN*
Image AFM				
Profil transverse				
RMS (nm)	*11,6*	*3,82*	*2,82*	*47,1*

Tableau III-4 :Images AFM, profil transverse et calcul de rugosité pour les structures suivantes : Or nu, Or/Thiol, Or/Thiol/PS et Or/Thiol/PS/FN.

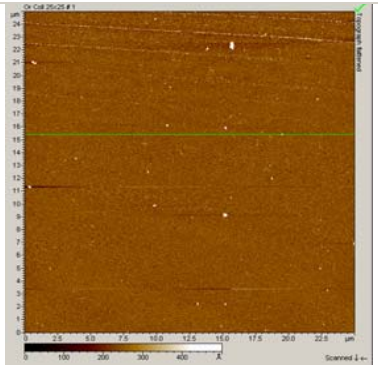
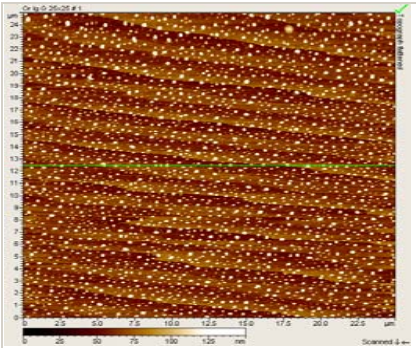
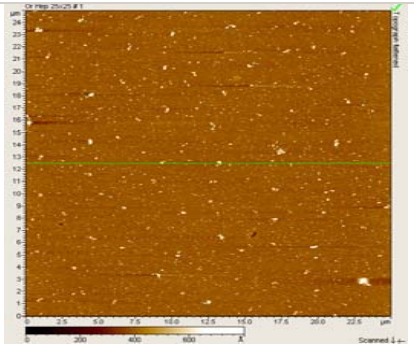
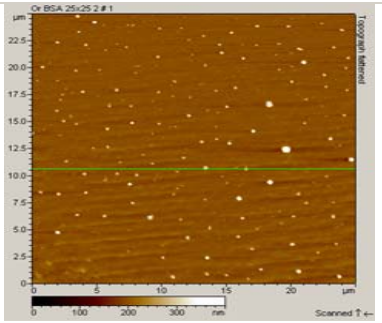
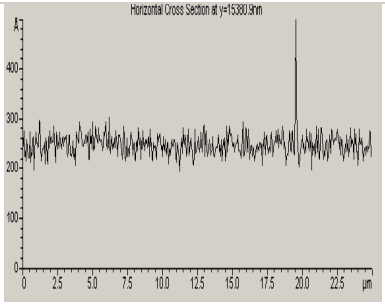
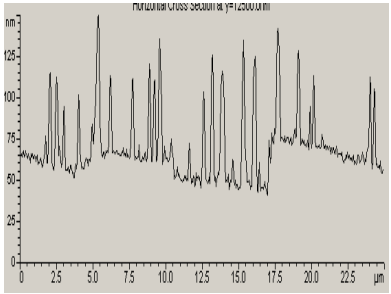
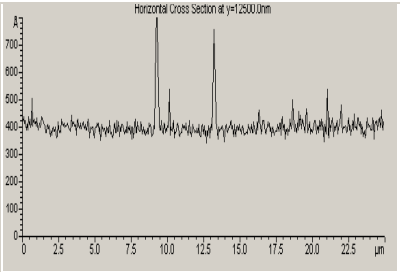
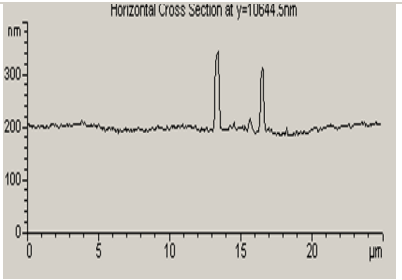
Echantillons	*Or/Thiol/PS/Coll*	*Or/Thiol/PS/IgG*	*Or/Thiol/PS/Hép*	*Or/Thiol/PS/BSA*
Image AFM				
Profil transverse				
RMS (nm)	*2,67*	*19,1*	*3,69*	*12,4*

Tableau III- 5 :Images AFM, profil transverse et calcul de rugosité pour les structures suivantes : Or/Thiol/PS/Coll, Or/Thiol/PS/IgG Or/Thiol/PS/Hép et Or/Thiol/PS/BSA.

Les tableaux présentés ci-dessus montre les différentes morphologies de l'or fonctionnalisé par des multicouches (SAMs et protéines). L'or nu présente une surface homogène et uniforme avec une rugosité de l'ordre de 11 nm. Les images AFM des échantillons Or/Thiol et Or/Thiol/PS témoignent d'un état de surface similaire, qui est uniforme et peu rugueux.

Dans la suite, nous étudierons les différents états morphologiques relatifs aux diverses protéines déposées sur les substrats de type or/thiol/polystyrène. Dans le cas de la fibronectine, l'image AFM révèle la formation de petits agrégats réguliers répartis de façon uniforme et homogène sur la matrice de polystyrène. Ces agrégats s'élèvent à une hauteur de l'ordre de 250 nm. Nous obtenons une valeur de rugosité de 47 nm pour ces échantillons. L'image AFM des structures Au/Thiol/Polystyrène/Collagène, donne un état de surface homogène et uniforme, similaire à celui donné par la même protéine sur le substrat de verre/OTS/polystyrène. L'état de surface des échantillons de structure Au/thiol/PS/IgG, présente des agrégats de petite taille relatifs à la protéine IgG déposée sur le polystyrène. La rugosité de ces échantillons est supérieure à celle des structures contenant de collagène, elle est de l'ordre de 19 nm. Les images topographiques de l'héparine et l'albumine montrent des surfaces quasiment planes à l'exception de quelques îlots qui sont répartis d'une façon hétérogène sur la totalité de la surface de l'échantillon. On trouve que la surface de l'albumine présente une rugosité supérieure à celle de l'héparine. Les valeurs de rugosité RMS sont égales à 3,69 nm et 12,4 nm pour l'héparine et l'albumine respectivement.

Dans cette partie de l'étude de la morphologie du verre et de l'or fonctionnalisés, nous avons mis en évidence que le greffage de l'OTS et de groupements silanes ou de thiol sur les substrats de verre ou d'or respectivement, tend à modifier leur état de surface. Nous avons souligné que les diverses protéines (fibronectine, collagène, IgG, héparine et l'albumine) ont différentes conformations et distributions sur le polystyrène. Leurs changements de conformation et de morphologie ont été illustrés par une étude qualitative basée sur la microscopie à force atomique en mode tapping.

III- Caractérisations électriques des substrats

III-1 Etude par voltamétrie cyclique

La figure ci-dessous représente les résultats de mesures voltamétriques, à une vitesse de balayage de 50 $mV.s^{-1}$, de l'électrode d'or avant et après immobilisation de la couche de thiol. Dans le cas de l'électrode modifiée avec la couche de thiol, les pics dus à l'oxydation puis à la réduction des ferri-ferro-cyanures ont presque disparus laissant place aux courants capacitifs.

La superposition des voltammogrammes de l'électrode de l'or nue et de l'électrode d'or fonctionnalisée par une couche de thiol, dans du milieu de culture contenant ou non un couple redox $K_3[Fe(CN)_6]$/ $K_4[Fe(CN)_6]$ (5mM), montre les deux pics d'oxydo-réduction. En s'éloignant des pics d'oxydation et de réduction, on peut choisir une valeur de polarisation, le courant qui circule dans la cellule électrochimique est très proche de zéro à une tension qui a une valeur de -300 mV. On remarque que chaque étape de bioactivation de la surface peut être caractérisée par la voltamétrie.

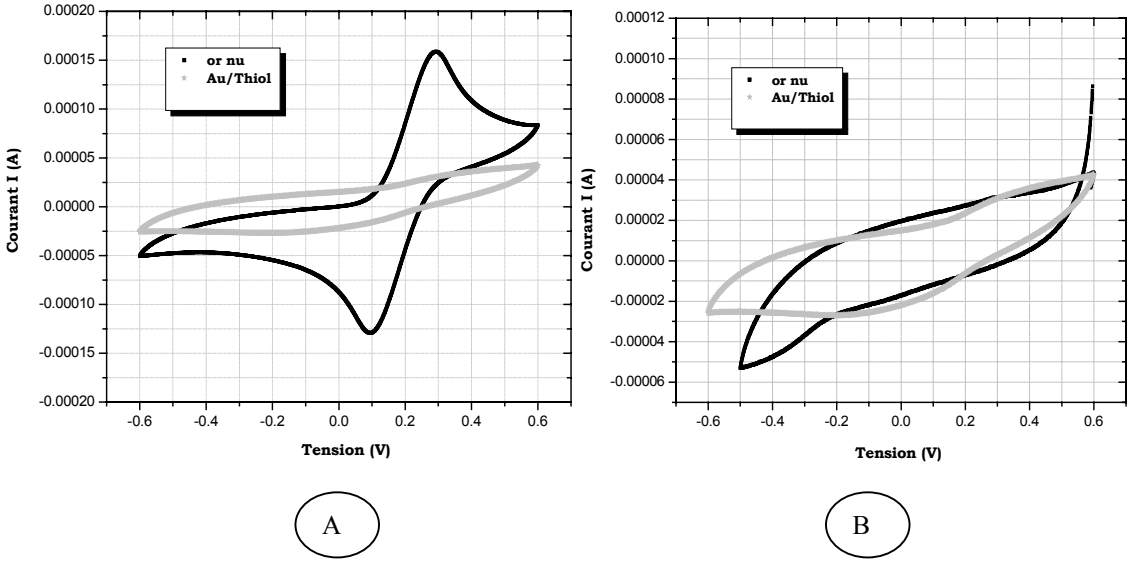


Figure III.4 Voltammogrammes pour une électrode d'or nue puis modifiée par une couche autoassemblée de Thiol dans (A) le milieu de culture complet et dans (B) contenant un couple redox $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$. Vitesse de balayage 50 $mV.s^{-1}$.

La figure III.4 (A) montre l'effet de couple redox $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ sur les courbes de voltamétrie cyclique pour une électrode d'or nue et une électrode d'or fonctionnalisée par une couche autoassamblée de Thiol. Dans la figure III.4 (B), ces deux courbes sont quasiment superposées alors que dans la figure III.4 (A) la courbe courant (tension), pour une électrode d'or fonctionnalisée par le thiol, présente deux pics d'oxydoréductions.

III-1-1 Description de la bioactivation de l'électrode d'or

Les composés organosulfurés tels que les alcanethiols ont une très forte affinité avec les substrats métalliques (or) et forment par adsorption une monocouche très stable [17], cela conduit à la formation d'un édifice très stable. Dans cette optique, l'adsorption de longues chaînes de thiol est étudiée en terme de voltamétrie cyclique. Le thiol utilisé possède un

groupement terminal CH_3 qui donne à la surface un caractère hydrophobe et qui crée des interactions avec le polystyrène. Ce dernier est présenté dans la littérature comme un modèle reproductible pour l'étude de l'interface cellule-substrat [18]. La fibronectine, protéine prometteuse de l'adhésion des cellules endothéliales est adsorbée en dernier dépôt. L'électrolyte utilisé est un milieu de culture complet qui est le milieu M199 supplémenté par le sérum à 10%, L-glutamine et les antibiotiques (pénicilline streptomycine). Cette solution contient le couple redox $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ à une concentration de 5mM.

III-1-2 Caractérisation de l'électrode d'or fonctionnalisée

La voltamétrie cyclique des espèces électroactives comme le $Fe(CN)^{4-}_6$ / $^{3-}$est un outil efficace pour tester la barrière cinétique de l'interface. La voltamétrie cyclique est choisie comme une technique de caractérisation du comportement de l'électrode à chaque étape d'activation. En modifiant l'état de surface de l'électrode, le transfert cinétique des électrons est perturbé. La figure III-5 montre des voltamogrammes de différentes structures élaborées qui sont : or nue, Au/thiol, Au/thiol /polystyrène, Au/thiol/polystyrène/fibronectine et Au/thiol polystyrène/fibronectine/cellules endothéliales.

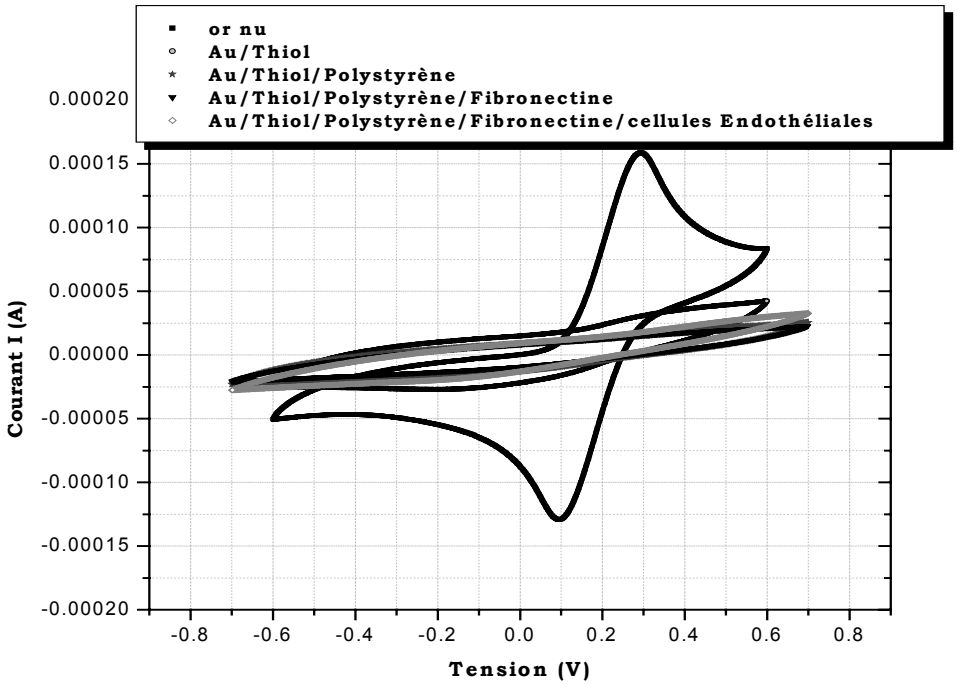


Figure III.5: Les courbes de voltamétrie cyclique avec 5mM de couple redox $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$dans du milieu de culture : électrode d'or nu, électrode d'or +thiol, électrode d'or + polystyrène et électrode d'or fonctionnalisée par le fibronectine. Toutes ces mesures sont effectuées dans le milieu de culture : pH 7.8, vitesse = 50 mV/s.

Les longues chaînes de thiol peuvent former une monocouche stable, dense et ordonnée sur l'électrode d'or. L'étape d'ajout de cette couche de thiol montre une diminution de l'intensité de pics et un élargissement entre les tensions anodiques et cathodiques.

Ceci conforte la formation de la couche de thiol. Par contre, l'addition des autres couches ne modifie pas l'allure du voltamogramme de la couche autoassemblée. L'effet de la bioactivation de l'électrode d'or par les couches de thiol, polystyrène et fibronectine est détecté par la spectroscopie d'impédance électrochimique. Ce qui fera l'objet du paragraphe suivant.

III-2 Etude par spectroscopie d'impédance

III-2-1 Interface Métal-Electrolyte

Lorsqu'un métal est placé au contact d'un électrolyte, une interface électrique est immédiatement développée. La zone de l'interface métal/solution où coexistent les espèces chargées est appelée double couche électrique. A un potentiel donné, l'interface électrode/solution est caractérisée par une capacité de double couche, Cd.

Le coté de la double couche situé dans la solution est constitué de plusieurs couches. Celle qui est le plus proche de l'électrode est appelée couche d'Helmholtz. Elle contient les molécules de solvant et parfois certaines espèces (ions ou molécules) qui sont spécifiquement adsorbées sur l'électrode. Le lieu des centres électriques des ions spécifiquement adsorbés est appelé plan interne d'Helmholtz (PIH), situé à une distance x_1 de l'électrode. Les ions solvatés ne peuvent s'approcher du métal qu'à une distance au plus égale à x_2; le lieu des centres des ions solvatés situés à cette distance (x_2) est appelé plan externe d'Helmholtz (PEH). L'interaction des ions solvatés avec le métal chargé met en jeu uniquement des forces électrostatiques à grande distance. Ces ions sont dits non spécifiquement adsorbés. En raison de l'agitation thermique dans la solution, les ions non spécifiquement adsorbés sont situés dans une région appelée couche diffuse, qui s'étend du PEH au sein de la solution (Figure III-6).

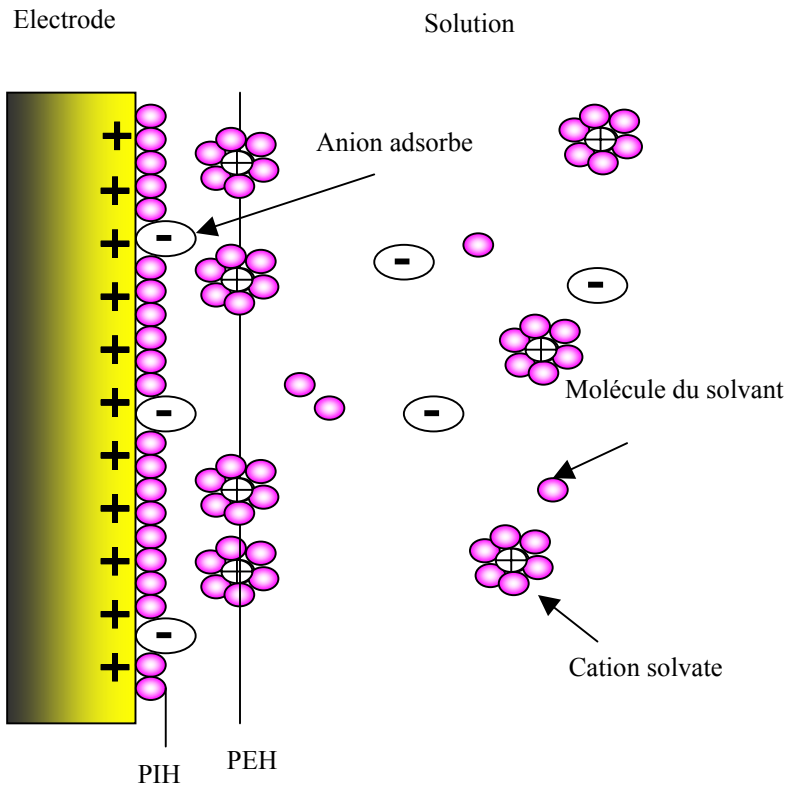


Figure III-6: Modèle proposé pour la double couche à l'interface métal/solution.

III-2-2 Détermination du taux de couverture

On peut définir le taux de couverture (θ_c) de la surface de l'électrode fonctionnalisée en utilisant la formule suivante :

$$\theta_c = 1 - R^{Or} / R^{Or\ fonctionnalisée}$$

Où R^{Or} et $R^{Or\ fonctionnalisée}$ représentent les valeurs de la résistance de l'or nu et la résistance de l'or après fonctionnalisation de la surface d'or, respectivement. Dans ce cas, le taux de couverture est égal à 78 %. La grande valeur de l'impédance de Warburg (tableau III-6) et le taux de couverture montrent que la couche de thiol ne constitue pas une couche isolante mais plutôt une couche diffusionelle.

Dans le tableau III- 6 nous présentons les paramètres électriques de l'or nu et de thiol greffé sur l'or.

	Or nu	**Or/Thiol**
R_S (Ω cm²)	51,9 ± 0,32	50,03 ± 0,338
CPE (μFcm^{-2})	16,04 ± 0,2	1,4 ± 0,001
α	0,94 ± 0,007	0,93 ± 0,0007
R_m (Ω cm²)	475,8 ± 0,01	2152 ± 0,01
W (Ω cm²)	1428 ± 0,01	6149 ± 0,03

Tableau III- 6 Paramètres électriques de l'or nu et de thiol greffé sur l'or

III-2-3 Circuit de Randels

Le circuit électrique équivalent le plus souvent utilisé est celui de Randels qui est illustré dans la figure III-7. Il comporte une résistance R_s de l'électrolyte, une impédance de Warburg Z_w résultant de la diffusion des ions du volume de la solution à l'interface, la capacité de la double couche C_{dl} et la résistance de transfert de charge R_{tc} qui existe s'il y a un couple redox dans la solution. Les éléments agissant en parallèle ($C_{dl,}$ R_{tc} et Z_w) du circuit équivalent sont introduits car le courant total qui traverse l'électrode est la somme du courant faradique, I_F , et du courant capacitif, I_C. Ce circuit équivalent formé d'éléments idéaux, capacités et résistances, ne peut pas tenir compte des imperfections de l'interface notamment de la rugosité et de l'inhomogénéité de la couche organique. Pour remédier à ce problème, une alternative intéressante consiste à substituer ces éléments idéaux par des impédances généralisées dites aussi des CPEs (constant phase élément) [19-21] qui traduisent la non-linéarité et la dépendance en fréquences des impédances. En effet, il est établi que la rugosité et la porosité des électrodes peuvent être à l'origine d'une dispersion en fréquence des spectres d'impédance. Plus tard, il a été démontré que les électrodes qui sont le siège ou non d'un transfert de charge à l'interface, possèdent des impédances qui s'expriment sous la forme d'une loi d'échelle;

$$Z_{CPE} = K(\omega)^{-\alpha} \; ; -1 \leq \alpha \leq 1$$

En particulier, Z représente une résistance si $\alpha = 0$, une capacité si $\alpha = 1$, une impédance de Warburg si $\alpha = 0.5$ et une inductance si $\alpha = -1$.

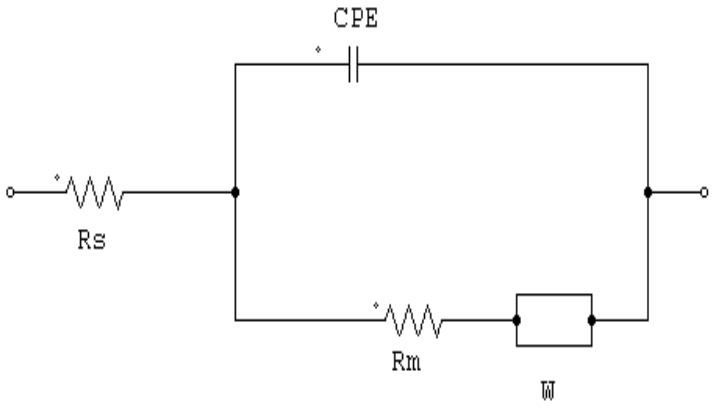


Figure III.7: Circuit équivalent utilisé pour modéliser les données impédimétriques dans le milieu de culture.

III-2-4 Analyse de spectres d'impédance de l'électrode d'or biactivée par le thiol et le polystyrène

Les spectres d'impédance relatifs aux structures suivantes : or nue, Au/thiol, Au/thiol polystyrène, et Au/thiol polystyrène/fibronectine sont analysés en présence d'une concentration constante en entités $Fe(CN)^{4-}_6$ / $^{3-}$. Les diagrammes typiques de Nyquist dans le plan complexe obtenus pour l'électrode d'or fonctionnalisée par les différentes couches déjà mentionnées ci-dessous sont présentés dans les figures III-8 et III-9. Ces spectres sont constitués par deux régions distinctes : (i) un demi-cercle qui apparaît pour les hautes fréquences du au processus de transfert de charges, (ii) un comportement linéaire faisant un angle de 45° traduisant le phénomène de diffusion de Warburg. Le diamètre de ce demi cercle définit la résistance de transfert de charge R_{tc}.

La figure III-8 présente un demi-cercle, caractéristique d'une résistance de transfert de charge Rtc en parallèle avec une capacité (CPE) et une partie linéaire qui apparaît aux basses fréquences et qui est due au phénomène de diffusion de transport d'ions défini comme impédance de Warburg $\mathbf{Z_\omega}$. La résistance de l'électrolyte utilisé est définie par R_s. La capacité est représentée par la CPE (constant phase élément). Ces paramètres seront décrits dans le paragraphe III-2-4. Le diamètre du demi-cercle de Nyquist augmente nettement après la formation de la couche auto assemblée. On présente une simulation théorique des spectres d'impédance en utilisant le circuit dans la figure III-7. Comme on peut le remarquer, la courbe théorique coïncide quasi-totalement avec les points expérimentaux soulignant ainsi la pertinence du modèle proposé.

Dans la figure III-8, nous présentons les diagrammes de Nyquist de l'électrode d'or sans et avec la couche de thiol. Le dépouillement de ces résultats montre que la résistance R_{tc} est

fortement variée dans le sens d'une augmentation d'impédance. La capacitance (CPE constant phase element) a diminué. Cette diminution est probablement due à une augmentation de l'épaisseur. La fonctionnalisation contrôlée des surfaces par les monocouches auto-assemblées (SAMs) se révèle très intéressante pour l'immobilisation de nombreuses macro-molécules biologiques (puces ADN, immunocapteurs). Les chaînes alcanethiols sont les plus fréquemment utilisées sur une surface d'or car elles s'adsorbent spontanément et facilement sur ce matériau [17]. Les valeurs de la résistance de transfert de charge des structures Au/thiol et Au/thiol/polystyrène sont déterminées à partir de la simulation des spectres d'impédance et sont respectivement 2152 $\Omega.cm^2$ et 2800 $\Omega.cm^2$. Les valeurs de la capacité CPE de ces mêmes couches sont respectivement 1,4µFcm-² et 1,27µFcm-². Les valeurs de CPE diminuent lors de l'addition d'une couche de polystyrène, ce qui prouve que l'épaisseur a augmenté et que le polystyrène s'est adsorbé. Le paramètre α présente des valeurs égale à 0,92 pour Au/thiol et égale à 0,95 pour Au/thiol/polystyrène, ce qui illustre que le CPE est essentiellement une capacitance.

III-2-5 Analyse de spectres d'impédance de Au/thiol/polystyrène/protéine

III-2-5-1 Au/thiol/polystyrène/fibronectine

La résistance de transfert de charge R_{tc} diminue dans le cas des structures Au/thiol/polystyrène/fibronectrine et elle vaut 554,6 $\Omega.cm^2$. Tout d'abord, la protéine possède des boucles et des hélices, ce qui lui donne une mobilité caractéristique de leur conformation. On peut aussi attribuer la diminution de l'impédance pour les faibles fréquences à l'adsorption des protéines qui modifient la conductivité de surface. Les protéines adsorbées modifient le point isoélectrique de la surface de l'électrode de telle sorte que la concentration locale des ions augmente au voisinage de la surface. Des concentrations locales élevées en ions ont comme effet de diminuer la valeur de l'impédance diffusive et d'augmenter la capacitance interfaciale. Ceci explique le comportement obtenu dans notre cas de figure III-9.

La fibronectine possède un point isoélectrique acide (pI) de entre 5,5 et 6,0. Ainsi, la charge totale de la molécule entière est négative dans la gamme de pH de cette étude (7,8). L'augmentation de la capacitance met en évidence l'effet de la charge qui peut être positive ou négative selon la valeur du point isoélectrique de chaque protéine. L'impédance à basses fréquences peut dévoiler des informations supplémentaires concernant le métabolisme cellulaire. Ce résultat a été développé par Huang et al. [22].

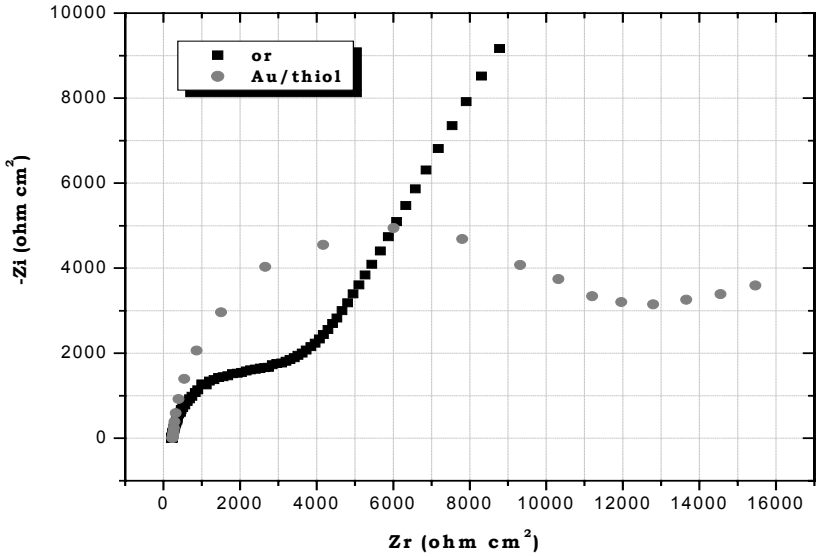


Figure III.8: Diagramme de Nyquist ($Z_r = f(Z_i)$) pour les substrats suivants:électrode d'or nu et électrode d'or+thiol, Toutes ces mesures sont effectuées dans le milieu de culture : pH 7.8, l'amplitude de la tension alternative est 10 mV. Les courbes ne trait plein montrent la simulation numérique des données expérimentaux.

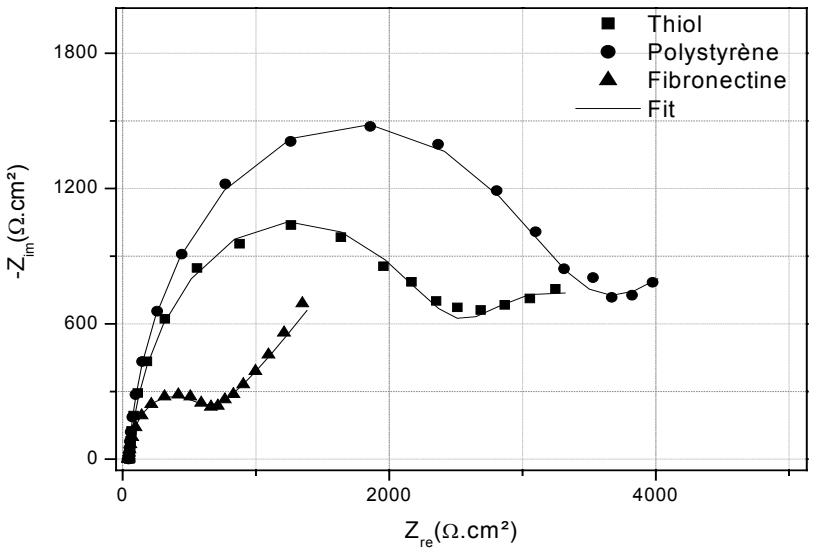


Figure III.9: Diagramme de Nyquist ($Z_r = f(Z_i)$) pour les substrats suivants: électrode d'or+thiol, électrode d'or+polystyrène et électrode d'or fonctionnalisée par la fibronectine. Toutes ces mesures sont effectuées dans le milieu de culture : pH 7.8, l'amplitude de la tension alternative est 10 mV. Les courbes ne trait plein montrent la simulation numérique des données expérimentaux.

III-2-5-2 Etude comparative des spectres d'impédance de Au/thiol/polystyrène/protéines

La résistance de transfert de charges R_{ct} balaye une gamme de valeurs selon le type de protéine étudiée. Les différentes valeurs obtenues pour chacune des protéines sont présentées dans la figure III-10. La hiérarchie croissante des résistances protéiques est la suivante: 379 $\Omega.cm^2$ pour héparine, 546,4 $\Omega.cm^2$ pour l'immunoglobuline G, 554,6 $\Omega.cm^2$ pour la fibronectine, 847,6 $\Omega.cm^2$ pour l'albumine et 861,4 $\Omega.cm^2$ pour le collagène.

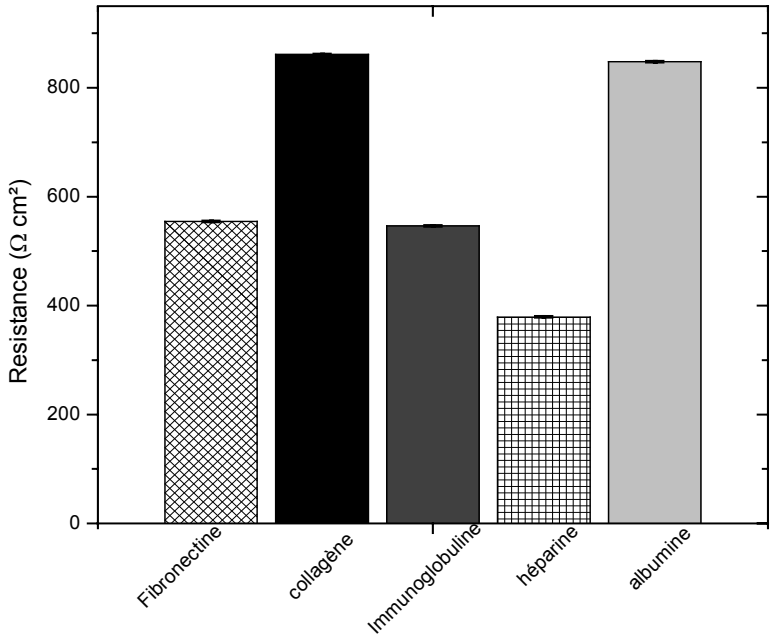


Figure III-10 : Variation de la résistance de transfert de charges R_{ct} en fonction des protéines étudiées. La gamme de fréquence est entre 1 Hz et 100 KHz.

La masse moléculaire de collagène est de 300 000Da, plus grande que celle de l'albumine qui est de 66 200 Da. Le collagène présente une structure rigide et il change difficilement sa conformation en comparaison avec l'albumine qui est une protéine globulaire, flexible et dénaturante. Ayant la même masse moléculaire que le collagène, la fibronectine présente un mode d'ancrage dépendant des propriétés physicochimiques de la surface [23]. L'hétérogénéité de la conformation spatiale et les fluctuations temporelles de la fibronectine peuvent réguler les sites de reconnaissance des cellules à un biomatériau. Ceci peut expliquer comment une cellule hôte interagit avec le substrat bioactivé avec la protéine.

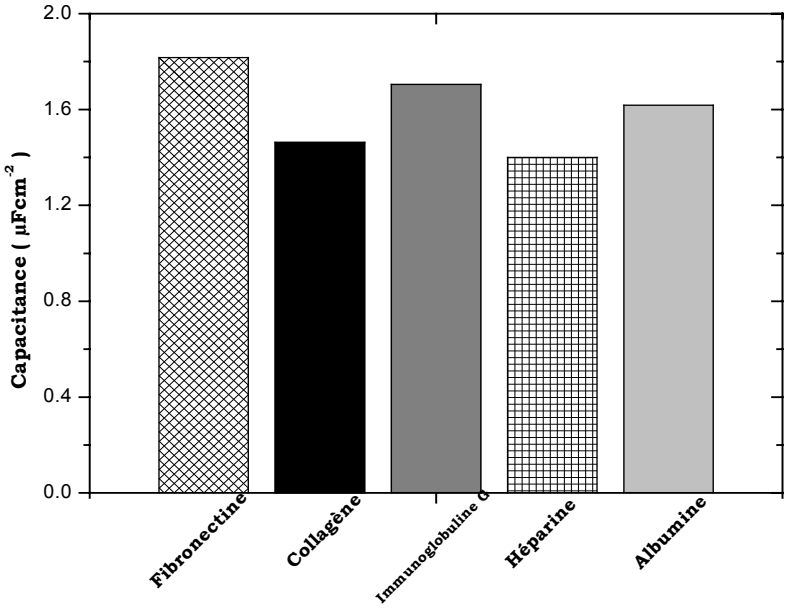
Luong et al. ont montré que l'état d'équilibre d'adsorption de collagène et de fibronectine sur un substrat d'or est atteint au bout d'une demie heure [24].

L'immunoglobuline G (IgG) est une protéine ayant des chaînes et des boucles similaires à celles de la fibronectine. Cette spécificité de conformation rend l'IgG très active [25]. En

revanche, l'héparine est un copolymère hétérogène en terme de masse moléculaire et de composition chimique. L'héparine se comporte comme un polyanion appartenant à la famille de glycosaminoglycanes (GAG) sulphatés.

La capacitance augmente pour toutes les protéines en comparaison avec la couche de polystyrène qui a une capacitance de l'ordre de 1,27 µF.cm-². Les différentes valeurs obtenues pour chacune des protéines sont présentées dans la figure III-11. La hiérarchie croissante des capacitances protéiques est la suivante: 1,40 µF.cm-² pour l'héparine, 1,46 µF.cm-² pour le collagène, 1,61 µF.cm-² pour l'albumine, 1,70 µF.cm-² pour l'immunoglobuline G et 1,81 µF.cm-² pour la fibronectine. L'héparine possède la plus petite capacitance et aussi la plus petite résistance.

La fibronectine, l'albumine et le collagène ont tous un point isoélectrique acide (pI) respectivement égal à (5,5-6,0), 4,9, et 7,5. Elles ont alors une charge globale négative. Tandis que, l'héparine et l'immunoglobuline G qui ont un point isoélectrique respectivement de 8 et 9, sont toutes les deux chargées positivement dans le pH physiologique choisi [26].



FigureIII-11 : Variation de la capacitance en fonction des protéines étudiées. La gamme de fréquence est entre 1 Hz et 100 KHz.

Références bibliographiques

[1] Van Oss C.J. Hydrophobicity and hydrophillicity of biosurfaces, current opinion in colloid and interface science 2 (1997) 503-512

[2] Lander Lorraine M., Siewierski Lisa M., Brittain William J., Vogler Erwin A. A systematic comparison of contact angle methods. Langmuir 9 (1993) 2237-2239

[3] Buijs J, Hlady V, Human growth hormone adsorption kinetics and conformation on self-assembled monolayers, Langumir 14 (1998) 335-341

[4] Sapsford K.E. and Ligler F.S.Real –time analysis of protein adsorption to a variety of thin films.Biosensors and Bioelectronics 19 (2004) 1045-1055

[5] Van Kooten T.G., Spijker T. H., Busscher J. H. Plasma-treated polystyrene surfaces model surfaces for studying cell biomaterial interactions. Biomaterials (2003) 1-13

[6] Andrade J.D., King R.N., Gregonis D.E., Coleman D.L. J. Polym. Sci. Symp. 66 (1979) 313-336

[7] Mozes M., the way we study interfacial phenomenon of living cells, adhesion des microorganismes aux surfaces technique et documentation (1995) 3-13

[8] Groth T. et Altankov G., studies on cell- biomaterial interaction: role of tyrosine phosphorylation during fibroblast spreading on surfaces varying in wettability, biomaterials 17 (1996) 1227 -1234

[9] De Bartolo L., Morelli S., Bader A., Drioli E., Evaluation of cell behaviour related to physico-chemical properties of polymeric membranes to be used in bioartificial organs. Biomaterials 23 (2002) 2485 2497

[10] Durrieu -porté MC, Amédée J, Baquey C, Intérêt de la fonctionnalisation d'un matériau pour l'amélioration de la relation cellule support. Matériaux et biologie, l'actualité chimique (2003) 32 -36

[11] Cai J., Chen Y., Xu Q., Chen Y., Zhao T., Wang X and Xia K. Atomic Force Microscope Imaging of the Aggregation of Mouse Immunoglubin G Molecules. Molecules 8 (2003) 86-91

[12] Schamberger P. C., Gardella F. A., Jr.Surface chemical modifications of materials which influence animal cell adhesion. A Review Colloids and surfaces B: Biointerfaces2 (1994) 209-233

[13] Hladay V., Andrade JD, Ho CH, Feng L., Tingey K, Plasma protein adsorption on model biomaterial surfaces, Clinical Mater. 13 (1993) 35-93

[14]Williams, DF Biodegradation in the human body. Dans: Fundamental Aspects of Biocompatibility. Williams DE. (éditeur), CRC Press Inc., Boca Raton, FI, 1981. pp.129-138.

[15] Cielo, P. Surface Inspection. Dans: OpticPl Techniques for Industrial Inspection. Academic Press (éditeur), San Diego, 1988, Chapter 4, pp. 185-212.

[16] Blouet, J. Microgéométrie et Rugosimétrie. Dans: Méthodes Usuelles de Caractérisation des Surfaces. David a Caplan (éditeurs) Eyrolles, Paris, 1988, pp270-289.

[17] J.L. Tan, J. Tien, C.S. Chen," Microcontact Printing of Proteins on Mixed Self-Assembled Monolayers", Langmuir, vol. 18, pp. 519-523, 2002.

[18] Yamamoto A., Mishima S., Maruyama N., Sumita M. Quantitative evaluation of cell attachment to glass, polystyrene, and fibronectin or collagen coated polystyrene by measurement of cell adhesive shear force and cell detachment energy Biomed. Mater. Res 50 (2000) 114-124

[19] H. Hillebrandt A. Abdelghani, C. Abdelghani, E. Sackmann, Electrical and optical characterization of thrombin-induced permeability of cultured endothelial cell monolayers on semiconductor electrode arrays, Appl. Phys. A 73 (5) (2001) 539.

[20] Wiegand, Ph.D thesis: Fundamental principles of the electric properties of supported lipid membranes investigated by advanced methods of impedance spectroscopy, 1999, Shaker verlag, ISBN 3-8265-7231-9, Technishe Universitat of Muenchen, Germany.
[21] A. Abdelghani, S.Hleli, K. Cherif, Optical and electrochemical characterisation of Self Assembled Octadecyltrichlorosilane on modified silicon electrodes, Materials Letters, 6 (6) (2002) 1064.
[22] X. Huang, D. Greve, D. Nguyen, M.M. Domach, Impedance Based Biosensor Array for Monitoring Mammalian Cell Behavior, Procceding of IEEE Sensors (2003) 304-309 (IEEE, Piscataway, NJ, 2003).
[23] Wiegand, Ph.D thesis: Fundamental principles of the electric properties of supported lipid membranes investigated by advanced methods of impedance spectroscopy, 1999, Shaker verlag, ISBN 3-8265-7231-9, Technishe Universitat of Muenchen, Germany
[24] J. R. MacDonald, Impedance Spectroscopy, Wiley, New York, (1987).
[25] S.Hleli, A. Abdelghani, A. Tlili, Impedance spectroscopy Technique for DNA hybridization, Sensors 3 (2003) 472-479
[26] M.J. Rutten, R.L. Hooer, M.J. Karnovsky, Electrical resistance and macromolecular permeability of brain endothelial monolayer cultures Brain Res. 425 (2) (1987) 301-310.

Chapitre IV

Résultats et discussion : 2ème partie : Interaction cellule Endothéliale - Substrat

I- Viabilité des cellules endothéliales sur les substrats

I-1 La croissance cellulaire

La courbe de croissance cellulaire comporte trois phases. La première correspond à une phase de latence au cours de laquelle les cellules tentent d'adhérer au support et aux cellules voisines en explorant l'espace fourni tout en gardant sa forme polygonale. Elles cherchent à se stabiliser tout en s'adaptant aux caractéristiques de la surface (topographie, rugosité, propriétés physico-chimiques). Cette phase de latence est de 24 heures. Dans un milieu complet convenable et thermostaté, les cellules prolifèrent jusqu'à confluence. C'est la phase de croissance. Elle est sous forme d'une exponentielle. Arrivées à confluence, les cellules s'inhibent par contact tout en constituant une monocouche. Elles atteignent ainsi la phase stationnaire.

Cette courbe de croissance permet de mettre en évidence le temps de dédoublement cellulaire qui varie d'une lignée à une autre. Pour la lignée Eahy 926, il varie de 24 à 48 heures. D'après la courbe, les cellules se dédoublent au bout de 24 heures. Ce résultat est vérifié par calcul en assimilant la croissance cellulaire en fonction du temps à une loi exponentielle [1].

Si on considérait :

N_0 : le nombre de cellules à l'origine de temps,

N_k : le nombre de cellules au temps t après K dédoublement.

K est alors déterminé par la formule suivante

$$K = (\ln N_K - \mathrm{Ln}\, N_0) / \mathrm{Ln}\, 2$$

Le temps de dédoublement est égale au rapport du temps en heures par le nombre de dédoublement K.

Le processus de bioadhésion entre les cellules et le support constitue une étape fondamentale et déterminante pour la prolifération cellulaire sur un matériau. Nos résultats montrent en effet que le support en verre, nécessaire pour le dispositif de la chambre d'écoulement, présente une biocompatibilité correcte. Néanmoins, il semble que le substrat bioactivé par des films protéiques est mieux adapté pour la prolifération cellulaire.

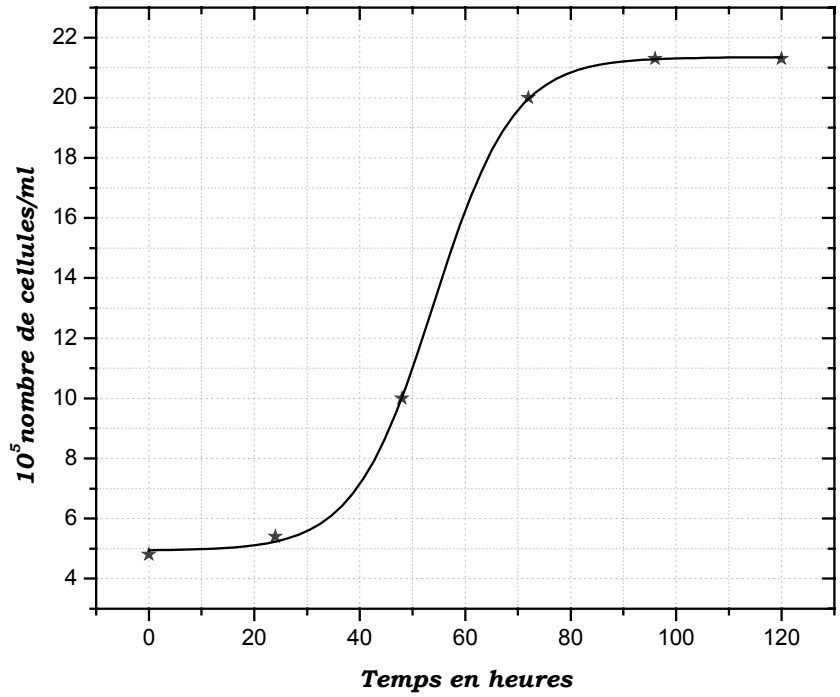


Figure IV.1 : Courbe de croissance des cellules

I-2 Etude colorimétrique : Test MTT

La prolifération cellulaire a été suivie, en fonction de la protéine utilisée, par la mesure de la densité optique à différents jours $J_{0,}$ $J_{3,}$ et J_5 (Faculté d'Odontologie, LEIBO, Laennec, Université Claude Bernard Lyon1). La meilleure prolifération est notée pour les substrats recouverts de collagène. La figure IV.2 montre la hiérarchie de ce test qui présente une prolifération décroissante ; elle est ainsi : collagène > fibronectine > immunoglobuline G > albumine > héparine. Les cellules endothéliales sont viables et prolifèrent sur tous les substrats bioactivés par les différentes protéines testées. Cependant leur densité diffère selon la protéine utilisée.

Ce test a été reproduit en illustrant la cytotoxicité des substrats avec un kit à test MTT ; ce qui conforte les résultats trouvés, qui sont présentés dans la figure IV.3 (INSERM 585, INSA de Lyon, Villeurbanne).

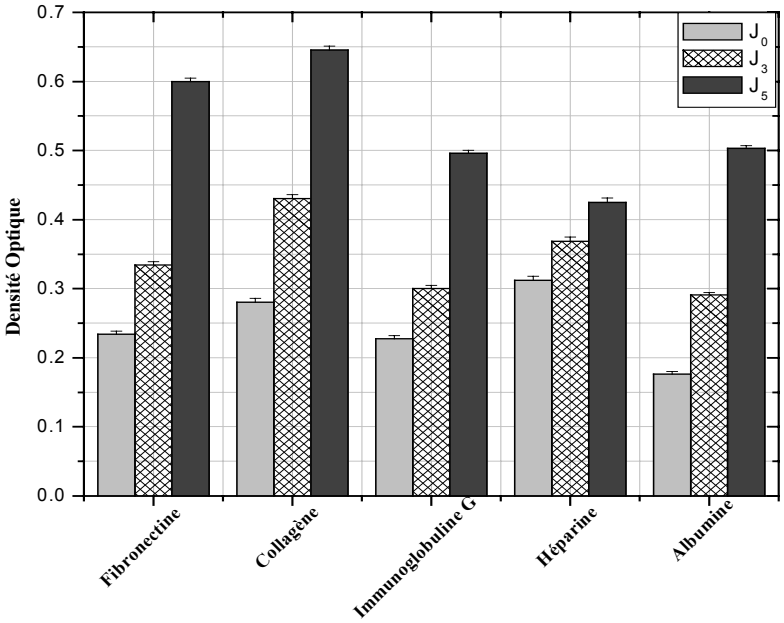


Figure IV.2 : Histogramme de la prolifération cellulaire durant 5 jours de culture sur différentes protéines fibronectine, collagène, héparine, immunoglobuline G, et albumine.

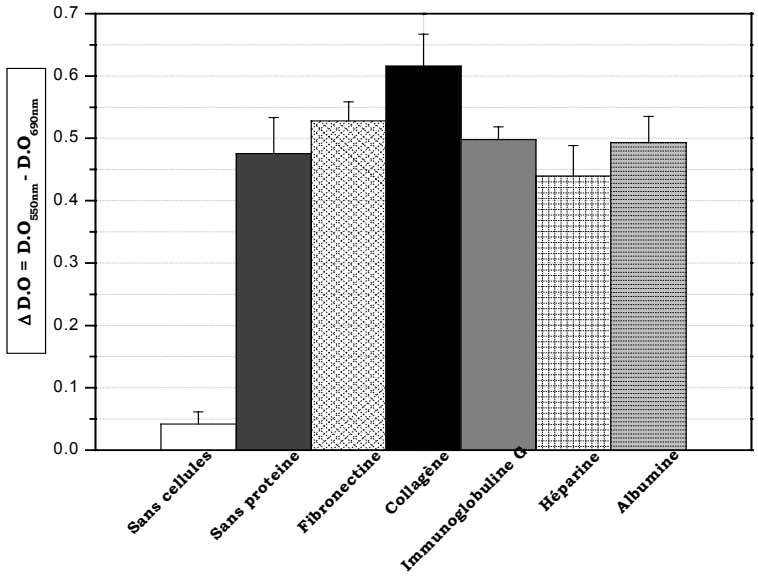


Figure IV.3 : Histogramme de la viabilité cellulaire sur différentes protéines

Le recouvrement d'un matériau par des protéines d'adhésion est une stratégie prometteuse de l'adhésion cellulaire. A l'interface cellule-biomatériau on assiste à un mécanisme de reconnaissance entre les protéines d'adhésion utilisées par la cellule pour effectuer son

premier ancrage au substrat et la nature de la surface. En effet, plusieurs études ont montré que durant 2h de culture, l'adhésion cellulaire se fait grâce aux protéines d'adhésion présentes dans la solution de sérum de bœuf fœtal, ces protéines assurant le premier ancrage des cellules à leur nouvel environnement par le biais des sites focaux d'adhésion. Dans notre travail, nos résultats montrent une bonne prolifération cellulaire sur les différents substrats recouverts par le collagène et la fibronectine.

I-3 Observation par microscopie inversée

La figure IV.4 représente une culture de cellules endothéliales à confluence dans un falcon. Elle est prise grâce à un microscope à phase inverse équipé d'un appareil photographique numérique. Aucune coloration n'est effectuée. Nous pouvons observer la forme polygonale et allongée des cellules endothéliales.

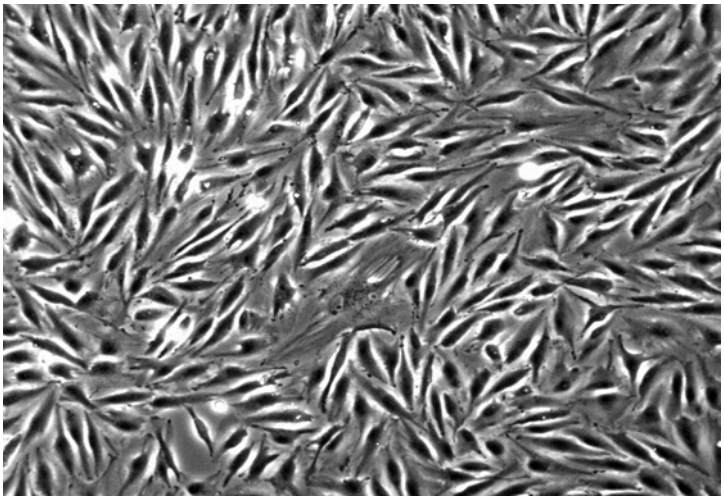


Figure IV.4 : Couche confluente de cellules endothéliales (lignée Eahy 926) prise par un microscope à phase inverse

II- Evaluation de l'adhésion des cellules endothéliales au substrat

II-1 la chambre à flux

II-1-1 Etude comparative entre la réponse cellulaire sur la fibronectine et celle sur le collagène

Les cellules endothéliales sont ensemencées sur des substrats de verre fonctionnalisé par des multicouches. Des groupements silanes sont greffés sur le verre et forment une couche dense et stable. Le polystyrène physiosorbé sur le silane, constitue une bonne matrice pour les protéines. La bioactivation du substrat par des protéines prometteuses de l'adhésion cellulaire

et reconnues par la matrice extracellulaire de la cellule endothéliale comme la fibronectine ou le collagène assure une bonne prolifération cellulaire sur ces substrats.

Les cellules endothéliales sont soumises à des contraintes de cisaillement dans l'intervalle (0-50 dynes/cm²) et pendant des temps d'exposition variables (0-3 heures). Une étude cinétique du détachement cellulaire des deux substrats est présentée dans la figure IV.5. La cellule endothéliale adhère plus au collagène qu'à la fibronectine.

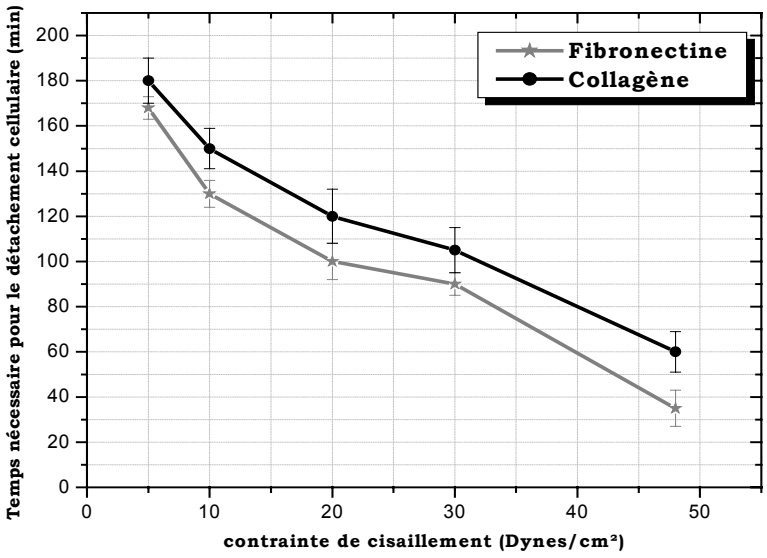


Figure IV.5 ; Variation de temps nécessaire pour le détachement cellulaire en fonction de contrainte de cisaillement pour deux différents substrats bioactivés par la fibronectine ou par le collagène.

Le taux de détachement cellulaire peut être défini comme l'inverse du temps de détachement cellulaire pour une valeur de contrainte de cisaillement donnée.

La variation du taux de détachement qui peut être caractérisé par K (τ) en fonction de la contrainte de cisaillement est présentée dans la figure IV.6.

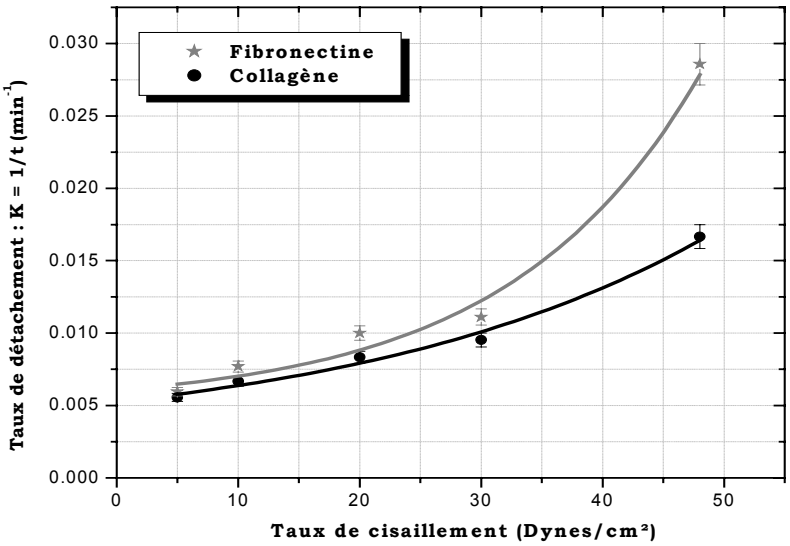


Figure IV.6:Variation de taux de détachement des cellules endothéliales K(τ) en fonction de contrainte de cisaillement.

Ces courbes ont été simulées avec l'équation suivante: $K(\tau) = K_0 + A \exp(X/t)$ avec K_0= 0,0059, A=0,0006, t =13,41 pour la fibronectine et K_0= 0,0055, A=0,002, t=25.04 pour le collagène où X est une constante.

Pour les valeurs élevées de la contrainte de cisaillement, K(τ) suit un comportement exponentiel avec le taux de cisaillement. Ceci a été vérifié aussi bien avec la fibronectine qu'avec le collagène. Cependant, pour les faibles valeurs de contrainte, la loi de variation de K en fonction de τ est linéaire. Chaque protéine peut être caractérisé par un taux de détachement qui a une valeur de $K_0 = 0{,}0059\ min^{-1}$ pour la fibronectine et $K_0 = 0{,}0055\ min^{-1}$ pour collagène avec $K_{0fibronectine} > K_{0collagène}$. L'indice d'élongation cellulaire ε correspond aux pentes des courbes présentées dans figure IV.6. Il est égal à 0,0147 et à 0,0105, respectivement pour les substrats fonctionnalisés par la fibronectine et par le collagène. Nous présentons dans la figure IV.7, la variation de la force de déadhésion en fonction de temps. Cette figure montre que la force de détachement cellulaire diminue lorsque le temps d'exposition dépasse 60 min, pour les substrats fonctionnalisés par la fibronectine ou par le collagène. Nous avons mis en évidence que les cellules endothéliales adhèrent plus sur les substrats bioactivés par le collagène que par la fibronectine.

La relation entre $\tau_{collagène}$ et $\tau_{fibronectine}$ où τ décrit la force de détachement cellulaire, est définit par Δτ, qui est le rapport entre $\tau_{collagen}$ et $\tau_{fibronectin}$: $\Delta\tau = \tau_{collagen} / \tau_{fibronectin}$,

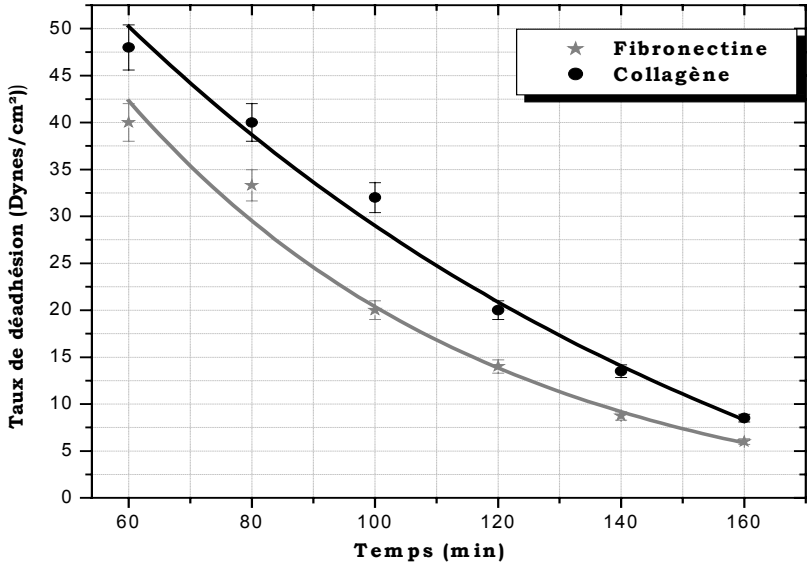


Figure IV.7 : Variation de la force de déadhésion en fonction de temps pour les deux protéines fibronectine et collagène

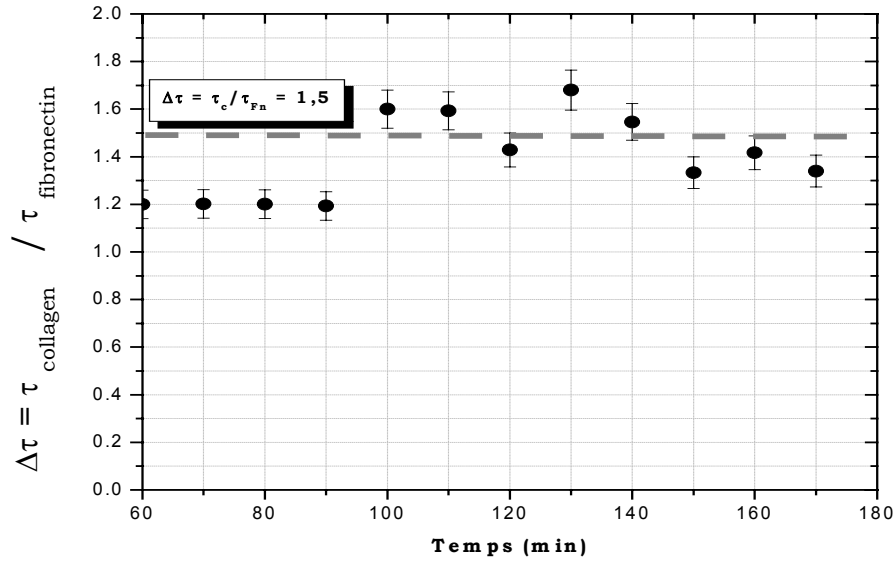


Figure IV.8: Relation entre le taux de détachement cellulaire du collagène et celui de la fibronectine en fonction du temps

La figure IV.8 montre que le rapport $\Delta\tau$ décrit un comportement oscillatoire en fonction du temps d'exposition. La valeur de ce rapport est toujours supérieure à 1. Sa moyenne est environ de l'ordre de 1,5. Ceci montre que le substrat traité par le collagène présente une force de détachement cellulaire plus élevée que pour la fibronectine.

II-1-2 Effet du flux sur la morphologie cellulaire et sur la force d'adhérence

La réponse qualitative des cellules indique que les modifications morphologiques dépendent du flux et du temps d'exposition à la contrainte mécanique. Pour quantifier la réponse morphologique, on a recours au facteur de forme S_F. Il s'est avéré que ce facteur dépend du temps et du taux de cisaillement. La courbe de variation de ce facteur en fonction de ces deux paramètres comporte trois phases (figure IV.9). Le facteur de forme atteint pendant la première heure son optimum. Ceci est illustré dans la première phase. Ce facteur décroît au cours du temps et présente un déclin. Ce n'est que pendant la dernière demi-heure que la cellule perd sa forme polygonale et devient arrondie.

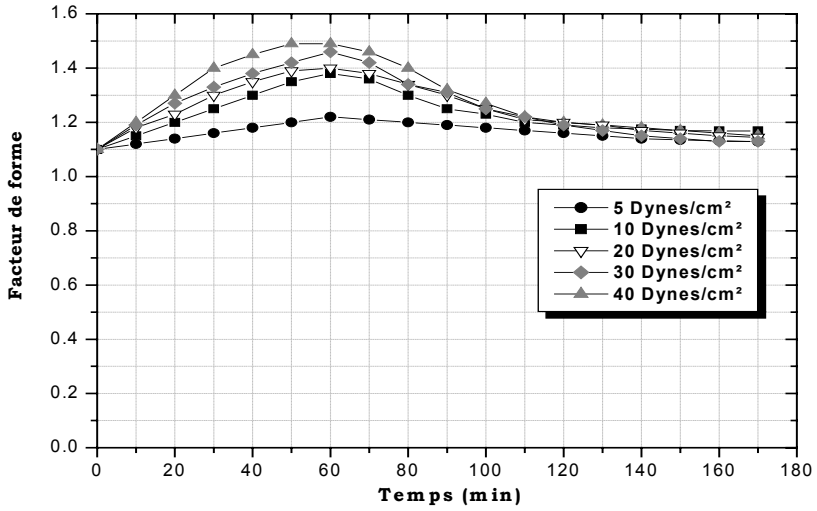


Figure IV.9: Variation du facteur de forme en fonction de temps et de la contrainte,

La variation du taux de cisaillement en fonction de l'indice d'élongation cellulaire est représenté sur la figure IV.10. Pour un temps d'exposition donnée, l'indice d'élongation augmente avec les différents taux de cisaillement appliqué aux cellules. Pour une contrainte mécanique donnée, l'indice d'élongation augmente lorsque le temps d'exposition décroît jusqu'à 60 min. La figure IV.11 décrit la variation de module d'élasticité qui correspond aux pentes des courbes présentées dans la figure IV.10, en fonction de temps. Il présente un comportement croissant en fonction de temps.

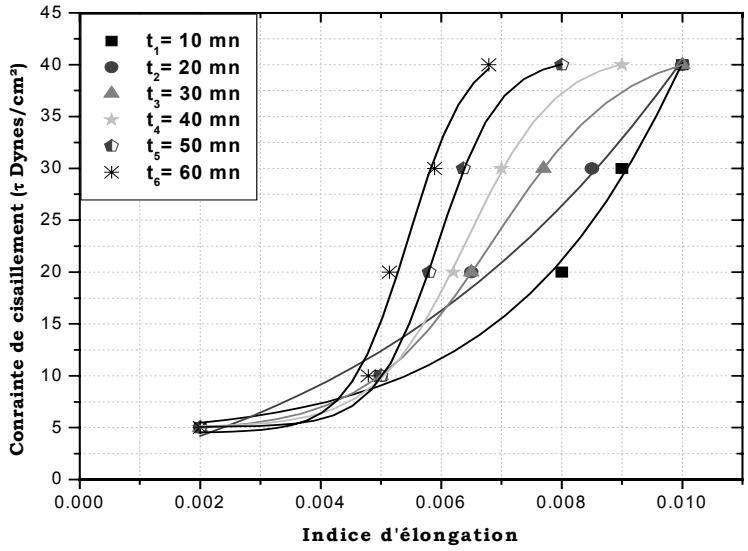


Figure IV.10: Variation de la contrainte mécanique en fonction de l'indice d'élongation

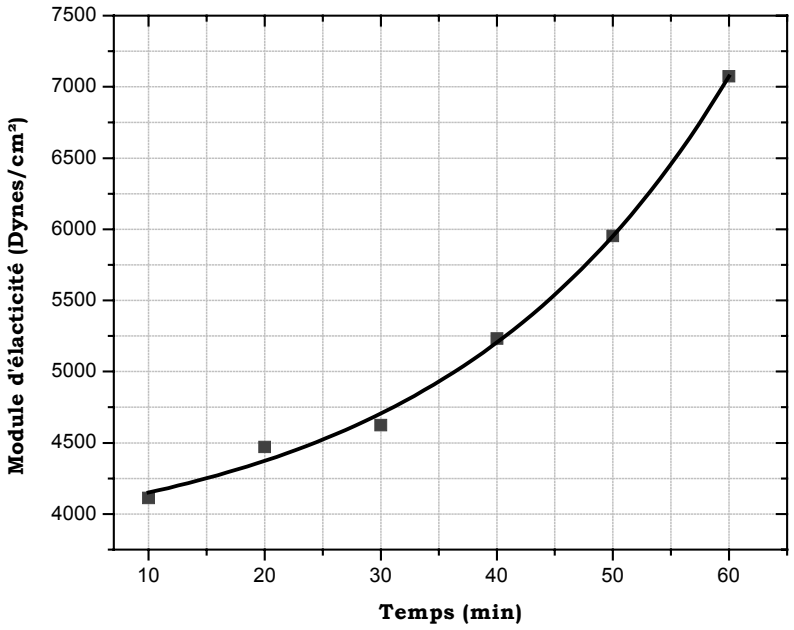


Figure IV.11: Variation du module d'élasticité en fonction de temps d'exposition.

Plusieurs auteurs ont étudié la réponse de la cellule comme la réponse élastique d'un gel renforcé par une infinité de fibres rigides [2]. L'élasticité du gel dans cette approche correspond à celle de la membrane plasmique et du cytosquelette cellulaire, tandis que les fibres rigides représentent les filaments d'actine et les microtubules. Dans ce cas d'étude, la réponse d'un tel système hétérogène et dynamique n'est pas évidente.

Le tableau IV.1 présente les valeurs de module élastique cellulaire disponibles dans la littérature, ils varient de plusieurs ordres de grandeur suivant le mode de mesure de ce module et suivant le type cellulaire concerné.

Type cellulaire	*Module Elastique (kPa ou 10^4 dynes/cm²)*	*Référence*
Fibroblastes	3-5	[3]
Ostéoblastes	2 à 9 prés du noyau	[4]
Plaquettes	1,5 – 4 pour le noyau	[5]
HUVEC	7 pour le noyau 1- 3 pour le reste de la cellule	[6]
Cellules endothéliales de rat	2	[7]

Tableau IV.1: Modules élastiques des cellules

Pour ce qui concerne le facteur de forme S, nous constatons qu'il dépend à la fois du périmètre et de la zone de contact de la cellule endothéliale. Ce dernier paramètre est illustré en fonction du temps dans la figure IV.12. Une fois soumises à la contrainte de cisaillement, les cellules endothéliales créent des microvitelli ou des pseudopodes afin de résister à cette contrainte. Les cellules qui résistent le plus à cette contrainte sont celles qui ont une surface d'étalement la plus large. La figure IV.13 montre la variation de la surface d'étalement en fonction du taux de cisaillement appliqué aux cellules. L'analyse de ces courbes montre que cette surface diminue nettement en fonction de deux paramètres qui sont le temps d'exposition et le taux de cisaillement.

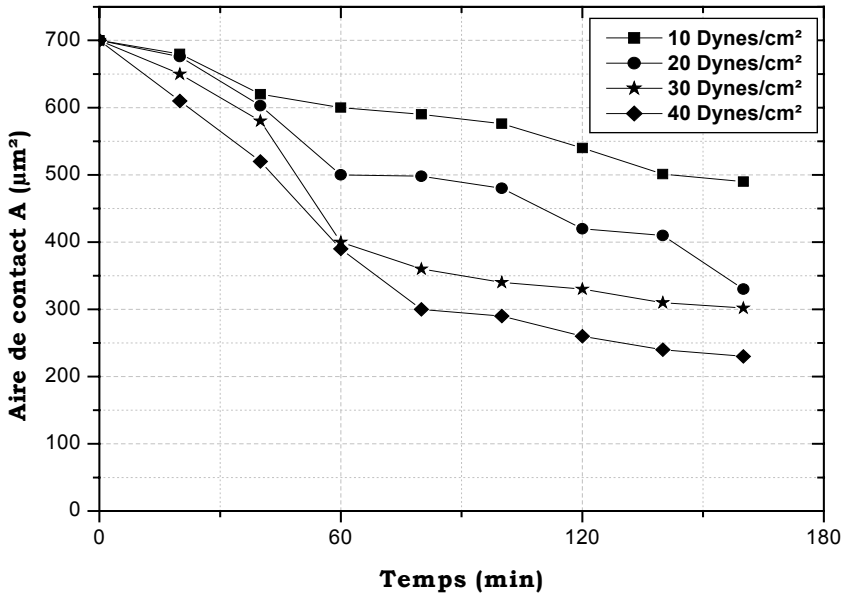


Figure IV. 12: Variation de l'aire de contact en fonction de temps d'exposition et des différentes contraintes de cisaillement

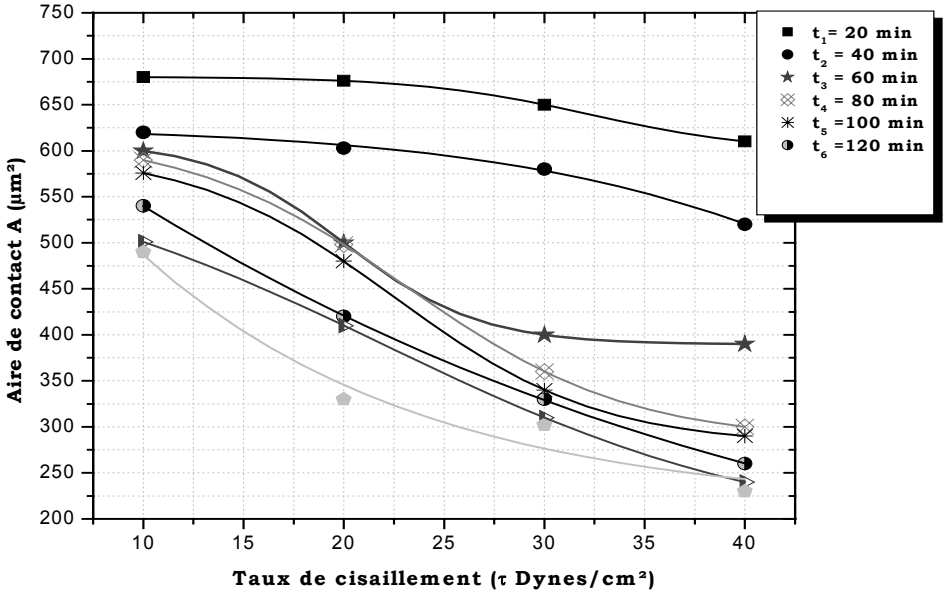


Figure IV.13: Variation de l'aire de contact en fonction de taux de flux à différent temps d'exposition

L'efficacité du détachement qui correspond aux pentes initiales des courbes de la figure IV.13, est présentée en fonction du temps dans la figure IV.14. On peut distinguer trois comportements différents du détachement cellulaire en fonction du temps d'exposition : pour un temps inférieure à 40 min, un léger écaillement est noté; l'efficacité de détachement est de l'ordre de 35 %. Au-delà de 40 min d'exposition, l'efficacité de détachement augmente d'une façon significative pour atteindre 97 % pour un temps d'exposition supérieur à 60 min.

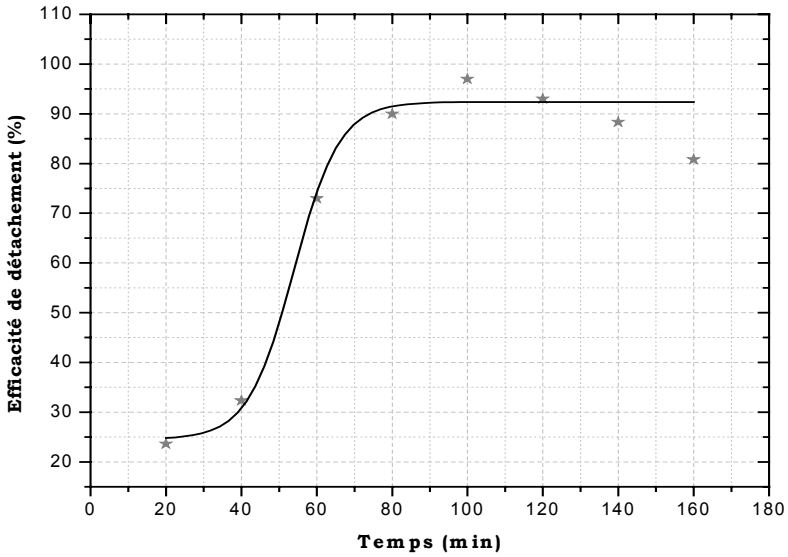


Figure IV.14: Efficacité de détachement en fonction du temps d'exposition

II-1-3 Discussions

II-1-3-1 Réponse cellulaire

En régime dynamique, nous avons étudié l'effet du taux de cisaillement sur la force de détachement des cellules. Les matériaux hydrophiles promettent une endothélialisation meilleure que les matériaux hydrophobes [8]. L'orientation et l'élongation cellulaire sont des processus adaptatifs et protecteurs de la cellule envers les flux hydrodynamiques. L'apparition des pseudopodes illustre le processus d'étalement cellulaire imagé dans la figure IV.15.

Les images enregistrées, dans la figure IV.16, illustrent que la morphologie de la cellule endothéliale, soumise à un écoulement laminaire, change en fonction de la contrainte pariétale et de sa durée d'application. Cette modification morphologique, décrite aussi par Charara et al. [9], traduit l'adaptation cellulaire aux conditions d'écoulement pour minimiser son détachement du support. Cette capacité d'adaptation se révèle par une orientation et une élongation de la cellule.

A faible contrainte de cisaillement, la cellule s'oriente dans la même direction que celle de l'écoulement ; alors qu'elle dévie légèrement quand cette contrainte augmente. Ces observations confirment les travaux de Wang et al. [10]. Ces auteurs indiquent que la répartition des angles formés par les fibres d'actine du cytosquelette et la direction du flux montre une homogénéité croissante de l'orientation des fibres de stress en fonction de la valeur du flux stationnaire. En revanche, selon les mêmes auteurs, les angles de répartition des fibres de stress retrouvent une orientation aléatoire dans le cas d'un flux perturbé. Aussi bien la longueur que l'épaisseur de ces fibres augmentent avec l'intensité de la contrainte.

Nos résultats montrent une variation croissante de l'élongation avec la contrainte de cisaillement. Le degré de cette variation augmente avec le temps d'exposition des cellules à l'écoulement. Ceci explique le rôle que peut jouer le cytosquelette dans l'élongation.

L'allongement de la cellule sous l'effet d'une contrainte de cisaillement s'accompagne par une réduction de la surface cellulaire totale (A). Ce processus détermine les propriétés élastiques de la membrane.

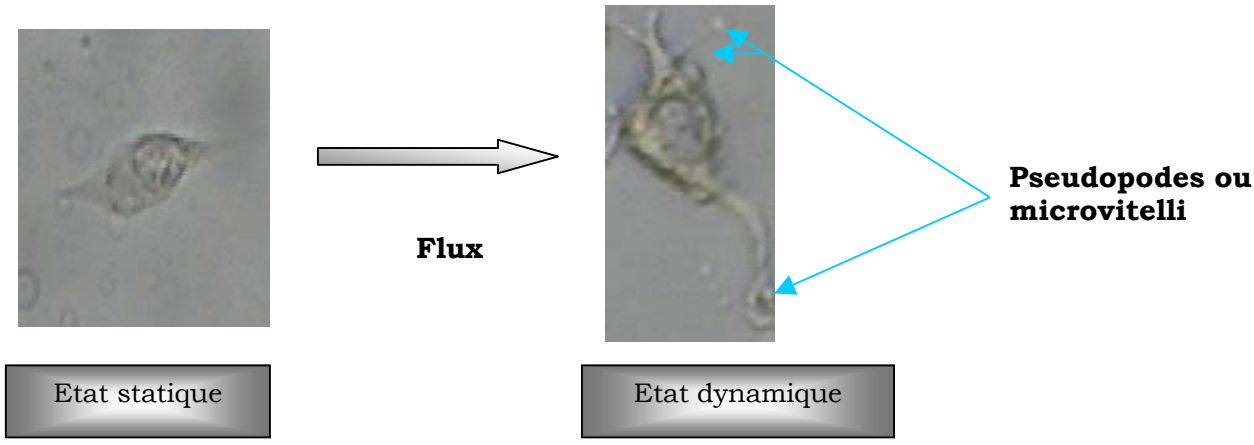


Figure IV.15 : Image de la formation des pseudopodes par des cellules endothéliales soumisest à un flux

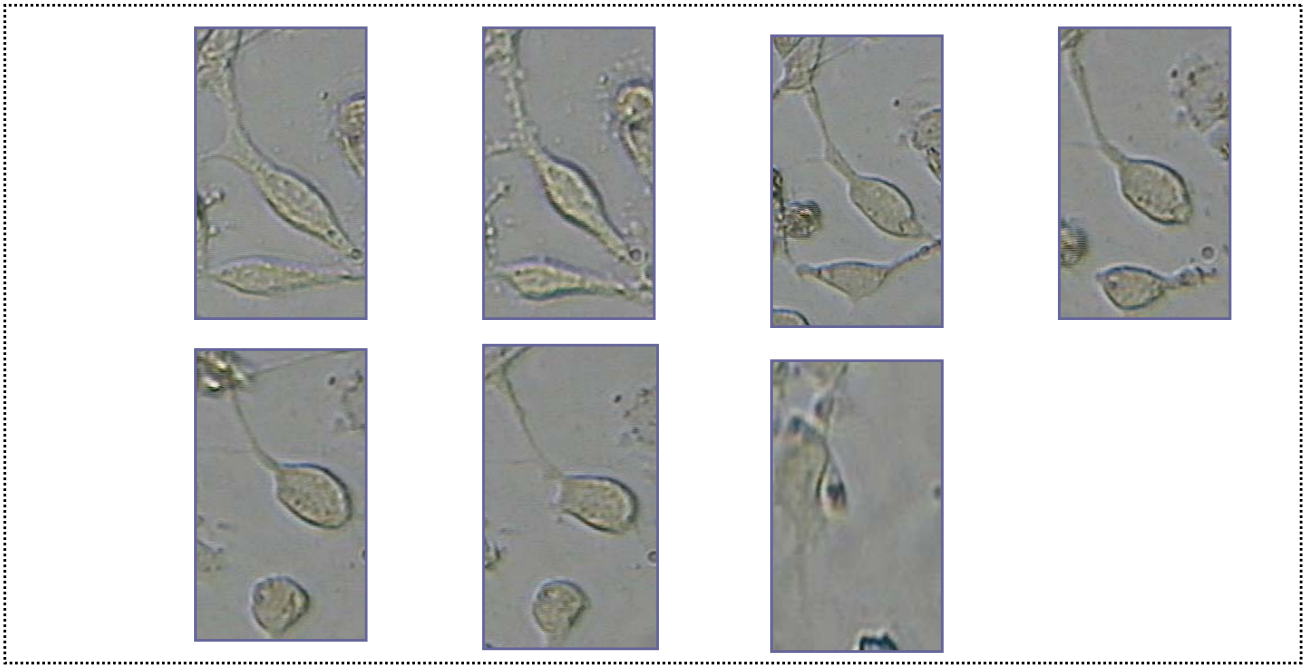


Figure IV.16 : Séquence chronologique des images obtenues par microscopie montrant le processus de détachement cellulaire sous l'effet d'un stress mécanique

Par ailleurs, à faible contrainte, les modifications morphologiques ne sont pas uniformes sur toute la cellule. Nos observations suggèrent, en effet, une distribution de la contrainte non homogène sur les différentes parties de la cellule aussi bien selon la direction horizontale (sens de l'écoulement) que la direction verticale. Ceci confirme les travaux effectués dans notre laboratoire (non publiés) ainsi que ceux de Wang et al. [11]. Ils indiquent que les parties supérieures de la cellule (correspondantes au relief du noyau) sont soumises à des contraintes plus élevées.

De nombreux auteurs ont montré qu'une variation morphologique de la cellule endothéliale, induite par un stress mécanique, engendre plusieurs modifications métaboliques. Ces réponses, appelées mécanotransduction, concernent pratiquement tous les mécanismes.

Dans la figure IV.9, nous avons tracé la variation de facteur de forme en fonction du temps d'exposition. La morphologie des cellules est contrôlée par les intégrines de la matrice extracellulaire qui dicte l'intégrité cellulaire. Dès que les cellules sont soumises aux contraintes mécaniques, les intégrines agissent comme des mécanotransmetteurs ou des mécanotransducteurs [12]. De plus, la morphologie cellulaire est un indicateur de l'indice de l'élongation présentée dans la figure IV.10. L'élongation cellulaire dépend du temps et du

débit du flux. Dans cette figure, nous constatons que la cellule s'allonge plus au début de l'exposition au flux et que a longs temps d'exposition, elle ne s'allonge plus trop.
L'allongement de la cellule sous l'effet d'une contrainte de cisaillement s'accompagne par une réduction de la surface cellulaire totale. Ce processus détermine les propriétés élastiques de la membrane (figure IV.11). Dans la figure IV-11, nous constatons que plus le temps d'exposition s'écoule, plus la cellule résiste a l'étalement sous l'effet du stress c'est en accord avec la figure IV-10. En conclusion, la cellule s'adapte et sa résistance augmente avec l'étalement au cours du temps sous l'effet du stress, tout du moins dans la première heure. Ensuite elle se retrace puis décroche.

II-1-3-2 Analyse comparative de l'adhésion cellulaire à la fibronectine ou au collagène

Dans la figure IV.5, nous avons présenté les courbes décrivant le temps nécessaire de détachement cellulaire pour deux substrats fonctionnalisés soit par la fibronectine soit par le collagène. Le temps nécessaire pour le détachement cellulaire diminue lorsque la contrainte de cisaillement appliquée augmente. La cellule se détache plus facilement sur la fibronectine que sur le collagène. Pour une contrainte de cissaillement de l'ordre de 48 dynes/cm², les cellules endothéliales ensemencées sur des substrats bioactivés par la fibronectine, se détachent après un temps d'exposition de 30 min. Reutelingsprger et al. ont rapporté que pour un stress mécanique de l'ordre de 70 dynes/cm², les cellules endothéliales ensemencées sur les mêmes type de substrats sont détachées après le même temps d'exposition qui est de l'ordre de 30 min [13].
Nos résultats montrent que la force d'adhésion de la cellule endothéliale au collagène est supérieure à celle mesurée avec la fibronectine. Nos résultats sont conformes à ceux trouvés par Yamamoto et al. [14].

Le taux de détachement K présenté dans la figure IV.6, défini par Décavé et al. [15], indique la cinétique de détachement cellulaire pour une contrainte mécanique donnée. Ce taux de détachement est proportionnel au taux de stress mécanique appliqué, il dépend aussi du traitement de surface des substrats. En effet, deux valeurs de K ont été déduite à partir de l'équation exponentielle : $K_0 = 0{,}0059\ min^{-1}$ pour la fibronectine et $K_0 = 0{,}0055\ min^{-1}$ pour le collagène: $K_{0\ fibronectine}$ est légèrement supérieur à $K_{0\ collagène.}$ Ainsi les cellules endothéliales se détachent plus facilement de la fibronectine que du collagène. Par contre, l'indice d'élongation est plus élevé pour la fibronectine que pour le collagène : $\varepsilon = 0{,}01474$ pour la fibonectine et $\varepsilon = 0{,}01055$ pour le collagène.

La Figure IV.7, montre que la force de détachement décroît en fonction du temps pour les deux substrats. Le rapport de la contrainte mécanique entre le collagène et la fibronectine illustré dans la figure IV.8; est de l'ordre de 1,5.

II-2 Jet vertical : résultats et discussion

Ces dernières années de nombreux travaux théoriques et expérimentaux ont été dédiés à l'adhésion cellulaire [16]. Plusieurs tentatives d'évaluation de la force d'adhésion cellulaire par la technique de la chambre à flux nécessitent des conditions hydrodynamiques bien précises. Ces conditions nécessitent donc un échantillon dont les dimensions sont importantes. Le jet, par contre est tout à fait adapté aux échantillons de faibles dimensions.

Pour étudier le détachement cellulaire, des auteurs [15] ont soumis à un cisaillement, un ensemble des cellules de Dictyostelium discoideum adhérant à une plaque en verre, en utilisant un disque d'acier inoxydable percé en son centre et placé sur la plaque de verre, de sorte que la distance e séparant le disque et la plaque soit de l'ordre de e = 0,21±0,01 mm ou e = 0,56±0,02 mm, selon les conditions utilisées.

Dans notre étude, un jet vertical laminaire a ciblé une plaque de verre bioactivée par les multicouches déjà mentionnées précédemment, et sur laquelle a été ensemencée une couche confluente de cellules endothéliales.

La figure IV.17 représente la contrainte de cisaillement calculée par la technique du jet pour deux valeurs différentes de nombre de Reynolds (Re= 1 et Re = 1500). Cette contrainte est déterminée selon que le substrat est traité par de la fibronectine ou par du collagène.

Dans le cas du flux laminaire, la figure IV-19 indique que pour Re=1500, la force attractive de la cellule au substrat bioactivé au collagène (τ = 600 dynes/cm²) plus grande que celle à la fibronectine (400 dynes/cm²). Le rapport entre $\tau_{\text{collagène}}$ et $\tau_{\text{fibronectine}}$ qu'on désigne par $\Delta\tau$ oscille d'une valeur de 1,5. Cet ordre de grandeur est déduit aussi pour le jet vertical pour un nombre de Reynolds égale à 1.

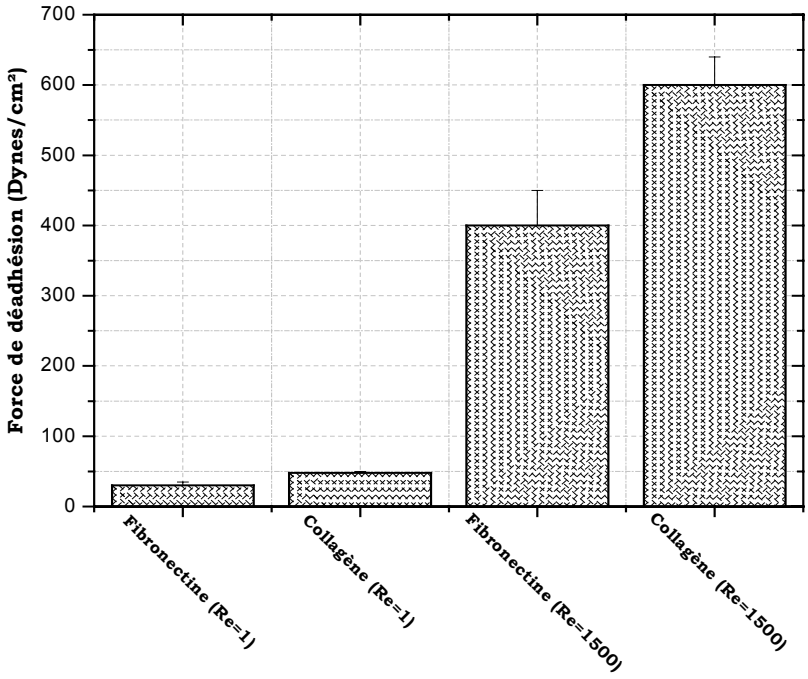


Figure IV.17: Variation de la force de détachement en fonction du nombre de Reynolds utilisé et pour deux protéines greffées sur le substrat

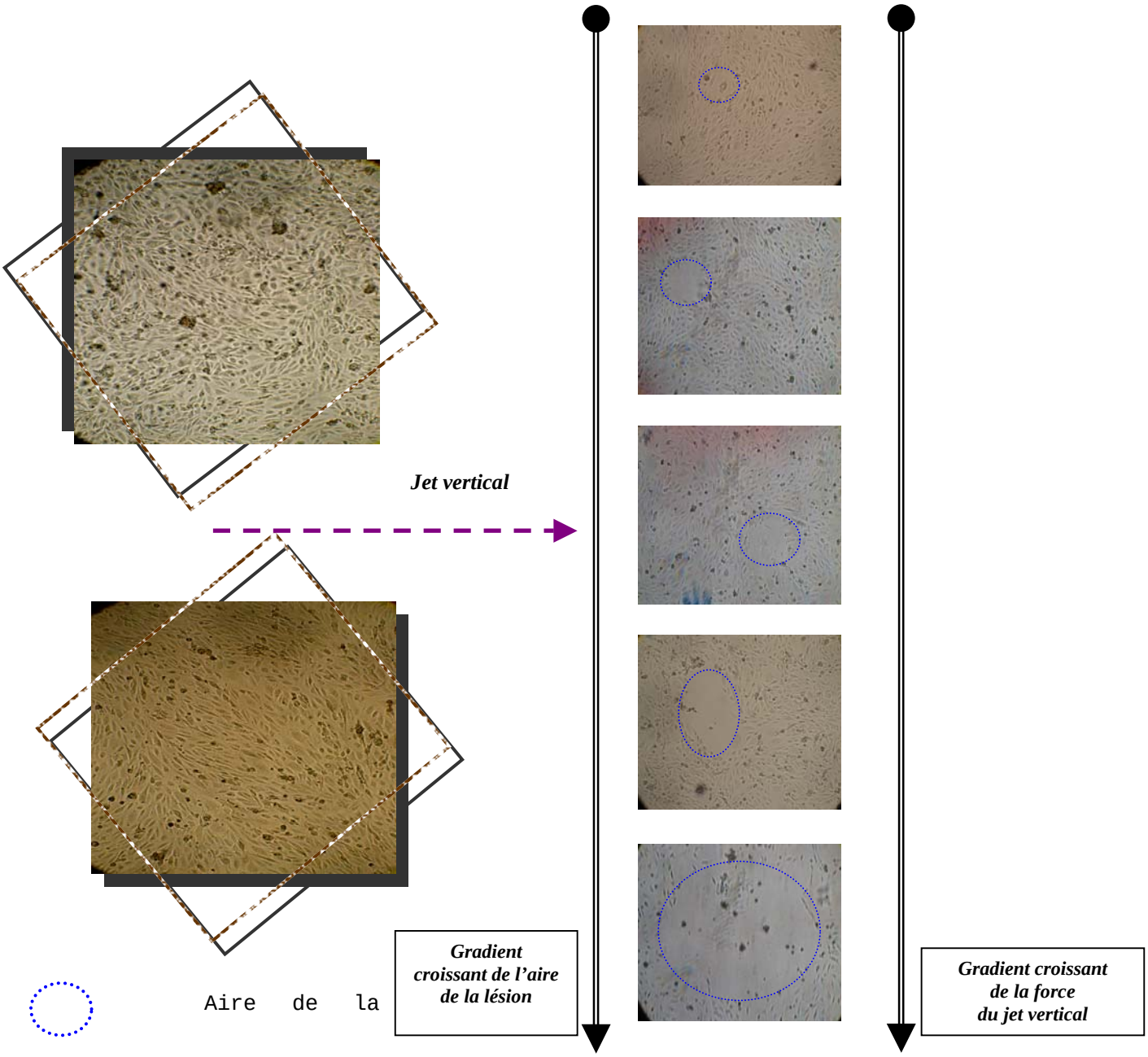


Figure IV.18: Images obtenues par microscopie montrant la morphologie cellulaire modulée par gradients croissants de stress.

La technique du jet vertical détermine la force d'adhésion d'un ensemble des cellules endothéliales adhérées à un substrat. La proportionnalité entre la force de détachement cellulaire et les contraintes de cisaillement appliquées, qui est vérifiée pour des nombres faibles de Reynolds, ne peut pas être interprétée en terme d'effets physiques. Les gradients du stress peuvent moduler la morphologie cellulaire et influencer la force de détachement cellulaire. Ceci est illustré dans la figure IV.18.

II-3 Etude comparative entre les deux techniques d'évaluation de la force d'adhésion de la cellule au collagène et à la fibronectine : chambre à flux laminaire et jet vertical

La chambre à flux horizontal et le jet vertical sont deux techniques utilisées dans cette étude. Elles ont pour but la détermination de la force d'adhésion de la cellule endothéliale au substrat.

La chambre à flux horizontal s'est avérée un outil efficace pour l'étude qualitative de la réponse cellulaire au flux. La déformabilité cellulaire est décrite par l'élongation, la surexpression des microvitelli, l'étalement et le détachement. Elle permet à l'opérateur d'être témoin du changement morphologique d'une cellule individuelle et de quantifier la force d'attachement de la cellule au substrat.

La méthode du jet vertical ne nécessite qu'un court laps de temps. La durée d'application du jet est modélisée dans la littérature à 30 s. Elle est capable de qualifier une réponse cellulaire collective par la lésion qui traduit la force qui la appliquée. La quantification de la force d'adhésion est possible et converge vers les valeurs obtenues avec à la technique de la chambre à flux.

En comparant les deux techniques, on peut déduire que le flux horizontal nécessite un substrat de grandes dimensions pour respecter les conditions hydrodynamiques. Cette technique n'est donc pas adaptée à des substrats de faible taille. Par contre, ce dispositif permet, en plus de la quantification de la force d'adhésion d'une cellule à un substrat, d'étudier les modifications morphologiques de la cellule. Avec plus de moyen, on pourrait encore mieux quantifier les différentes grandeurs qui caractérisent la déformation cellulaire et voir même le comportement en détail du cytosquelette quand la cellule est adhérée à un substrat. Le jet vertical, par contre, est bien adapté au substrat de faible dimension, mais la force d'adhésion par cette technique est une grandeur globale. De plus, il ne semble pas possible d'étudier les modifications morphologiques relatives à une cellule unique.

II-4 Adhésion cellulaire sur différentes protéines

II-4-1 Comptage des noyaux

Le comptage des noyaux fluorescents permet d'évaluer le taux d'adhésion cellulaire. Ce pourcentage dépend de la bioactivation du substrat. Chaque protéine greffée peut être caractérisée par un nombre de cellules endothéliales adhérentes. Ce test d'adhésion, illustré par la figure IV.19 permet d'aboutir à une classification des protéines : collagène> fibronectine> héparine > immunoglobulineG > albumine.

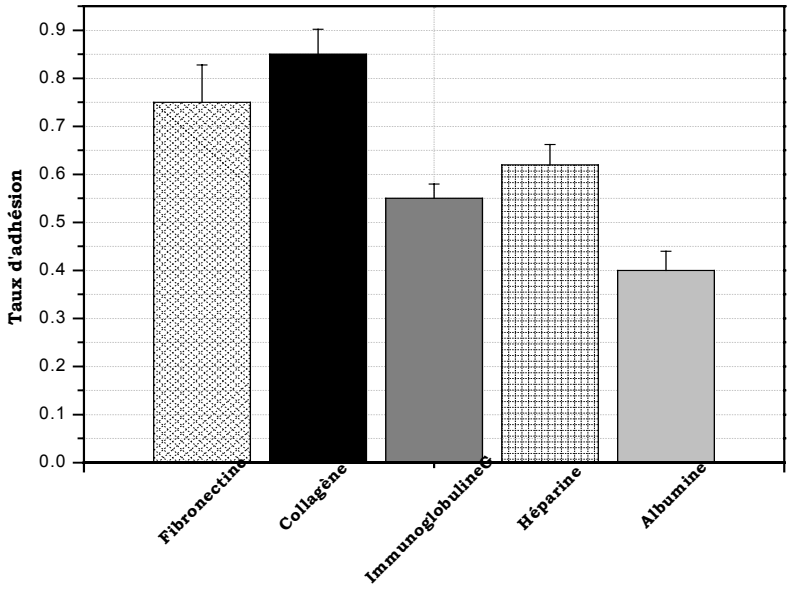


Figure IV.19 : Variation du taux d'adhésion cellulaire au substrat selon la protéine utilisée

II-4-2 Caractérisation par microscopie à immunofluorescence

Ces caractérisations morphologiques et cyctosquelettiques sont l'établissement direct d'une adhésion des cellules endothéliales sur une surface de protéines adhésives adsorbées.

Les images présentées dans le tableau IV.2, montrent que les cellules endothéliales changent de conformation avec le type de protéine sur laquelle elles ont adhérées. On constate que tout d'abord qu'il y a un état d'adhérence majoritaire pour toutes les protéines. Toutefois, la forme polygonale des cellules observée surtout sur la fibronectine et le collagène montre un étalement adéquat à leur prolifération. Dans le cas des cellules adhérées sur l'héparine, les images illustrent un aplatissement des cellules. Dans le cas de l'immunoglobuline par contre, les noyaux cellulaires se superposent. Par conséquent, la forme arrondie apparaît d'une façon prononcée. Avec l'albumine, les cellules endothéliales présentent une couche poreuse et un ensemble de fibres de stress se forme.

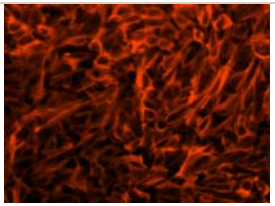
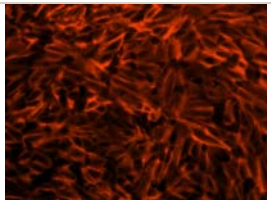
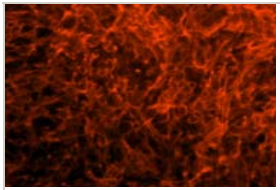
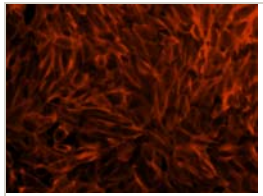
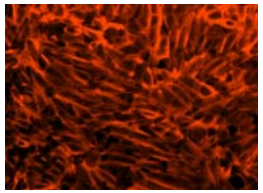
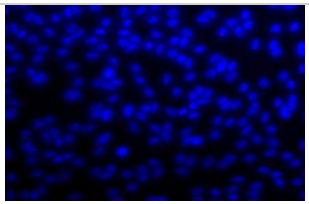
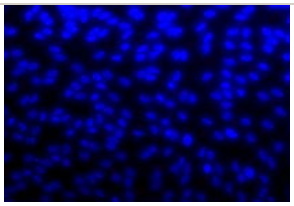
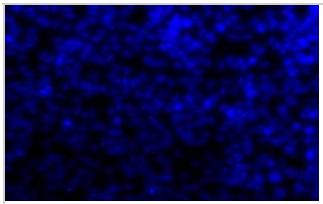
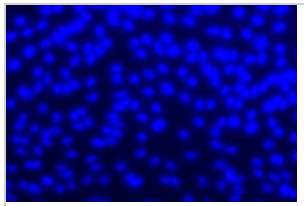
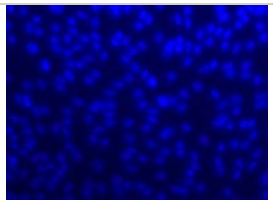
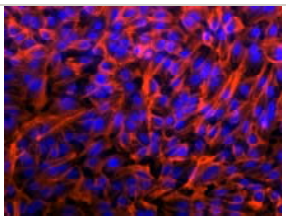
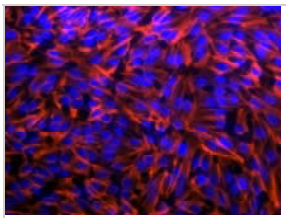
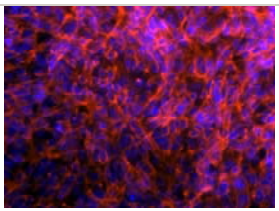
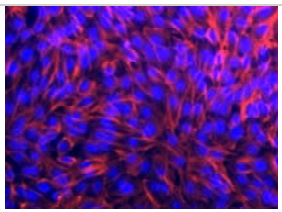
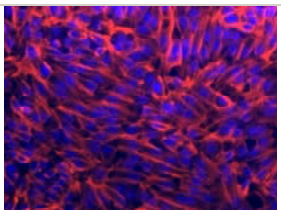
	Fibronectine	***Collagène***	***Immunoglobuline***	***Héparine***	***Albumine***
Cytosquelette					
Noyau					
Double marquage					

Tableau IV.2: Images obtenues par microscopie à immunofluorescence des cellules endothéliales ensemencées sur substrats fonctionnalisées par différentes protéines

L'importance cruciale de la forme et de la structure de la cellule adhérente en interaction avec son microenvironnement immédiat plaide en faveur du rôle du cytosquelette qui confère à la cellule son aspect structural. Le cytosquelette cellulaire est formé par des fibres d'actine, des microtubules et des filaments intermédiaires. Les filaments d'actine sont attachés aux intégrines par le biais d'autres protéines comme le taline, la vinculine ou l'α actinine. Le marquage de l'actine éclaircit l'état de la cellule qui peut présenter des fibres de stress en réponse à des contraintes. L'interaction du cytosquelette cellulaire avec la fibronectine est illustrée par un modèle schématique présenté dans la figure IV.20.

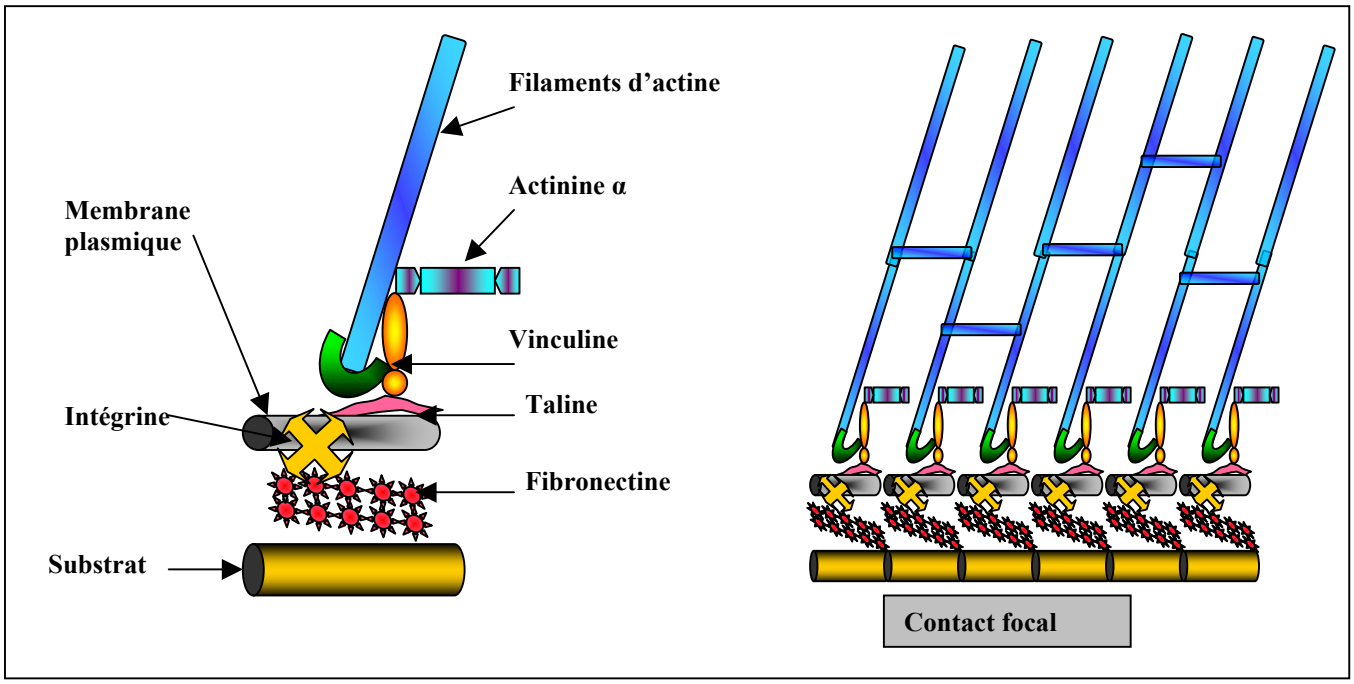


Figure IV.20 : Schéma d'un contact focal ou plaque d'adhésion

III- Etude électrochimique de l'adhésion

III-1 Analyse des spectres d'impédance des cellules en confluence sur la fibronectine

Les cellules eucaryotes ont une conductivité électrique faible pour les basses fréquences (< à 10 KHz). Au fur et à mesure que les cellules prolifèrent sur l'électrode d'or, la surface libre de l'électrode diminue, ce qui entraîne une augmentation de l'impédance d'interface. Cette augmentation est due au fait que l'impédance est inversement proportionnelle à la surface totale de l'électrode traversée par le courant électrique [17]. L'influence de ces cellules sur les spectres d'impédance est illustrée dans la figure IV.21, qui représente le diagramme de Nyquist de la structure Au/thiol/polystyrène/ fibronectine recouverte par une monocouhe des

cellules endothéliales. L'allure de ces spectres d'impédance est interprétée en terme d'un circuit équivalent où la résistance de transfert des charges de ces cellules est égale à 2.106 ± 0.04 K Ω cm². Cette valeur de la résistance est conforme aux données de la littérature. Crone et al. [18] ont trouvé que la résistance R_{tc} est de l'ordre de 2000 Ω cm² pour les cellules endothéliales de capillaire nerveux.

Ce paramètre électrique varie avec le type de cellule considéré et le milieu de culture utilisé. Rutten et al. ont travaillé avec des cellules endothéliales initialement isolées à partir des vaisseaux nerveux bovin. La valeur de la résistance de transfert de charges de ce type cellulaire cultivé sur un gel de collagène traité avec du glutaraldhyde est comprise dans un intervalle de 160 à 800 Ω cm² [19]. Wegner et al. ont rapporté une valeur de la résistance transendothéliale beaucoup plus faible. Ils ont obtenus des valeurs entre 30 et 80 Ω cm², pour des cellules endothéliales des capillaires nerveux de porc [20] et une valeur de 4 Ω cm² pour des cellules endothéliales bovines [21].

En général, la résistance dépend de la perméabilité ionique des canaux intercellulaires. Turner a montré qu'il existe une variation linéaire entre la résistance des cellules et celle du milieu utilisé [22]. Ainsi, une faible valeur de la résistance cellulaire est justifiée par l'existence de défauts au niveau de la couche confluente indépendamment des propriétés intrinsèques des cellules. La valeur de la résistance que nous avons obtenue montre que dans notre cas, la couche cellulaire est confluente.

La capacitance spécifique de la membrane cellulaire est généralement de l'ordre de 1 μF/cm² [23]. Steinem et al. ont montré que la capacitance des cellules endothéliales est entre 0,5-0,8 μFcm-². Cependant les cellules épithéliales présentent une capacitance plus élevée qui atteint 1-3 μ F cm-² [24]. Dans notre étude, nous avons trouvé une valeur de la capacitance de l'ordre de 1,32 μ F cm-², avec un facteur d'idéalité de 0,92, ce qui justifie le choix adéquat du modèle électrique. Une capacitance élevée peut être attribuée à l'existence des pseudopodes. Une autre explication possible pour les valeurs élevées de la capacitance des cellules endothéliales est le fait du recouvrement partiel de la surface de l'électrode [25]. En effet, il s'avère intéressant de simuler la membrane cellulaire à une couche lipidique. Gritsch et al. ont montré qu'une telle membrane peut avoir une capacitance de 0,25 μFcm-² [26] qui est beaucoup plus faible que la valeur obtenue. Cette différence des valeurs est due à l'effet de la fibronectine et du type cellulaire.

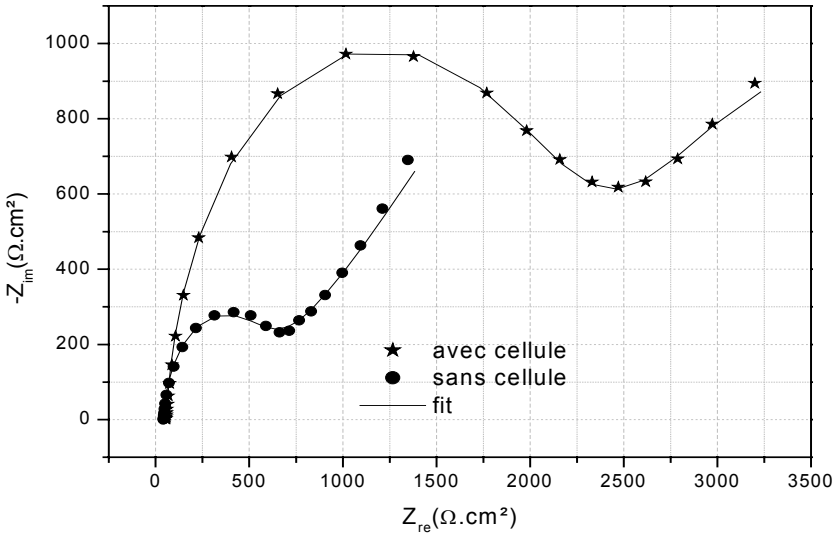


Figure IV.21: Diagramme de Nyquist des structures Au/thiol/polystyrène/fibronectine et Au/thiol/polystyrène/fibronectine/cellule.

III-2 Impédance des cellules endothéliales en confluence sur le substrat bioactivé par différentes protéines

L'impédance électrochimique met en évidence l'effet de la protéine déposée sur les différents substrats sur l'adhésion des cellules endothéliales. L'influence des cellules sur les spectres d'impédance est illustrée dans la figure IV.22.

Aux basses fréquences, la résistance de transfert de charge augmente avec l'ajout de la monocouche cellulaire ensemencée sur les différentes protéines (figure IV.22). Les valeurs de l'impédance des cellules sur les protéines suivent un ordre croissant qui est le suivant : 1,496 kΩ.cm^2 pour collagène; 1,718 kΩ.cm^2 pour l'immunoglobuline G ; 2,106 kΩ.cm^2 pour la fibronectine; 2,421 kΩ.cm^2 pour l'héparine, et 4,108 kΩ.cm^2 pour l'albumine. Pehig a montré que les membranes biologiques ont des résistances de l'ordre de 10^2- 10^5 Ω.cm^2 [27]. Les cellules présentent la résistance la plus élevée quand elles sont cultivées sur de l'albumine. En fait, elles forment une couche isolante qui est due au dépôt passif de l'albumine sur le substrat. Wegner et al. a interprété l'impédance en terme de deux contributions différentes de la résistance électrique (i) la perméabilité ionique de l'espace intercellulaire entre les cellules adjacentes (ii) la conductivité de l'espace entre la cellule et le substrat [23]. Minnear et al. ont indiqué qu'une diminution de la perméabilité peut être due à une augmentation de l'impédance des cellules endothéliales [28]. Le degré de confluence est plus élevé si la

résistance cellulaire est importante. En fait, le degré pourrait être modulé par les protéines utilisés. L'adhérence des cellules endothéliales au collagène, par exemple, est importante alors que leur prolifération est faible. La confluence des cellules est tardive et leur résisitance est faible.

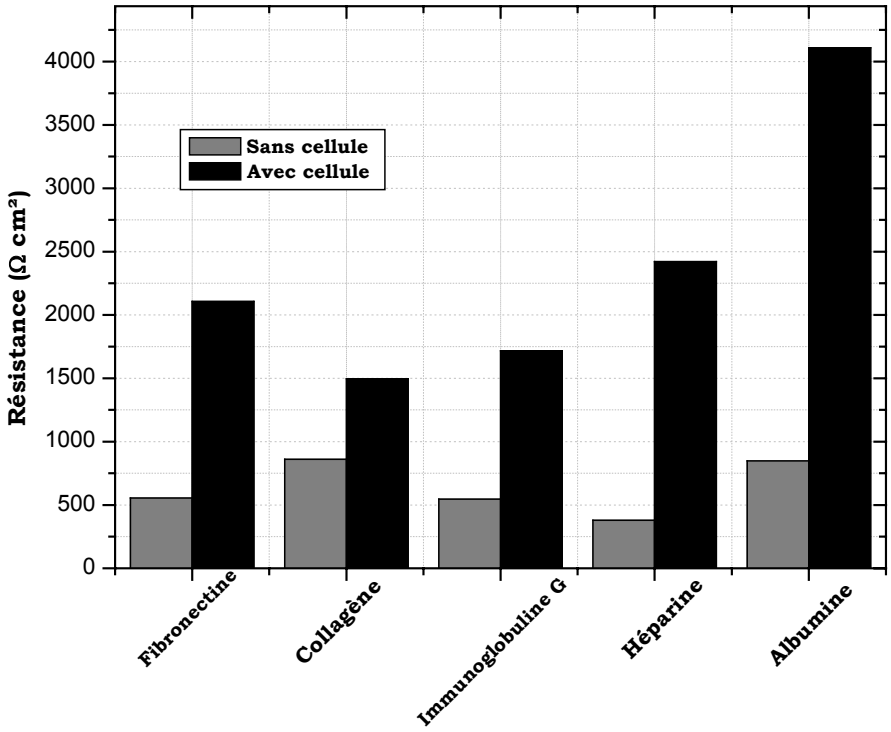


Figure IV.22 : Variation de la résistance en fonction des protéines utilisées

Selon la figure IV.23, on peut diviser les protéines en deux groupes:

(i) Avec l'héparine et l'immunoglobuline G, qui sont chargées positivement, les cellules entraînent une augmentation de la capacitance par rapport à la couche protéique seule;

(ii) Les cellules endothéliales cultivées sur de la fibronectine, du collagène ou de l'albumine, qui sont chargées négativement, conduisent par contre à une diminution de la capacitance.

Cette variation de capacitance en fonction de la protéine utilisée pourrait être expliquée par la quantité ainsi que par la distribution des charges introduite par la protéine sur la surface. Il semble que l'épaisseur de la monocouche cellulaire joue aussi un rôle dans la variation de la capacitance électrique. Giaever et al. ont montré, en effet, que cette décroissance de la capacitance est due à la formation des plaques d'adhésion et surtout aux contacts focaux avec

l'électrode [29]. Wegener et al. ont indiqué que la capacitance peut être affectée par la formation des jonctions intercellulaires [30].

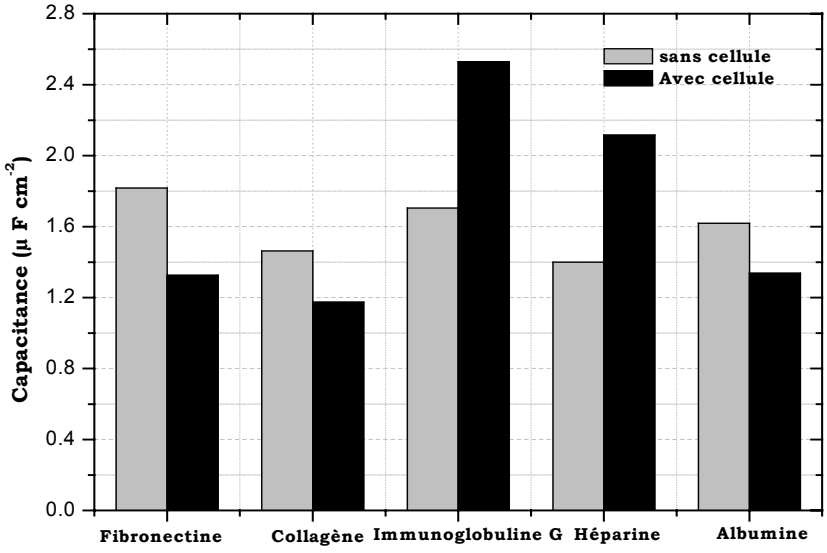


Figure IV.23 : Histogrammes de la variation de la capacitance en fonction des protéines utilisées

III- 3 Effet de la toxine sur le processus d'adhésion cellulaire

III-3-1 Le lipopolysaccharide LPS

Structure

Les lipopolysaccharides sont des complexes macromoléculaires toxiques présents de manière constitutive dans la membrane externe de toutes les bactéries à Gram négatif. Sur le plan structural, les lipopolysaccharides (LPS) sont constitués d'un lipide A et d'une partie polysaccharidique extramembranaire. Le lipide A, doué de propriétés toxiques, correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif qui n'est libérée, de manière massive, qu'après lyse de la bactérie. Le rôle des endotoxines est très important car elles sont très ubiquistes et aucun organisme n'est à l'abri de leurs effets. La fraction polysaccharidique constitue l'antigène O.

Mode d'action

Plusieurs cellules sont aptes à répondre aux endotoxines et c'est tout particulièrement le cas des monocytes/macrophages et des cellules endothéliales. En réponse aux endotoxines, les cellules endothéliales produisent des cytokines dont l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8. De plus, ces

cellules produisent des dérivés oxygénés ainsi que des métabolites de l'acide arachidonique (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes) et du PAF (Platelet Activating Factor).

Les cellules endothéliales sont dépourvues de CD14 et leur activation par le lipopolysaccharide, fait intervenir une molécule sérique qui est la forme soluble du récepteur CD14. Le CD14 soluble est soit relargué par les cellules activées soit il provient d'un clivage enzymatique du CD14 membranaire. Le LPS présent dans le sang forme un complexe LPS-LBP-CD14 (LBP est une protéine liant le lipopolysaccharide soluble) qui se fixe sur un récepteur porté par les cellules endothéliales. Ce récepteur semble être une molécule de 80 kDa dont on a montré qu'elle est capable de fixer le lipide A en présence de LBP et de CD14 soluble. Le lipopolysaccharide à dose excessive induit une augmentation de la vasoperméabilité [31, 32].

III-3-2 Effet de la toxine sur l'impédance de la cellule endothéliale

Les spectres d'impédance sont représentés pour différentes concentrations de lipopolysaccharide sur la figure IV.24. On retrouve toujours la forme approximative d'un demi-cercle, caractéristique d'une résistance en parallèle avec une capacité. Par ailleurs, on remarque que le diamètre du demi-cercle varie dans le même sens que l'ajout de la toxine, la résistance du transfert de charge diminue ce qui prouve le pelage de la couche des cellules endothéliales.

- ✓ Diagramme de Nyquist

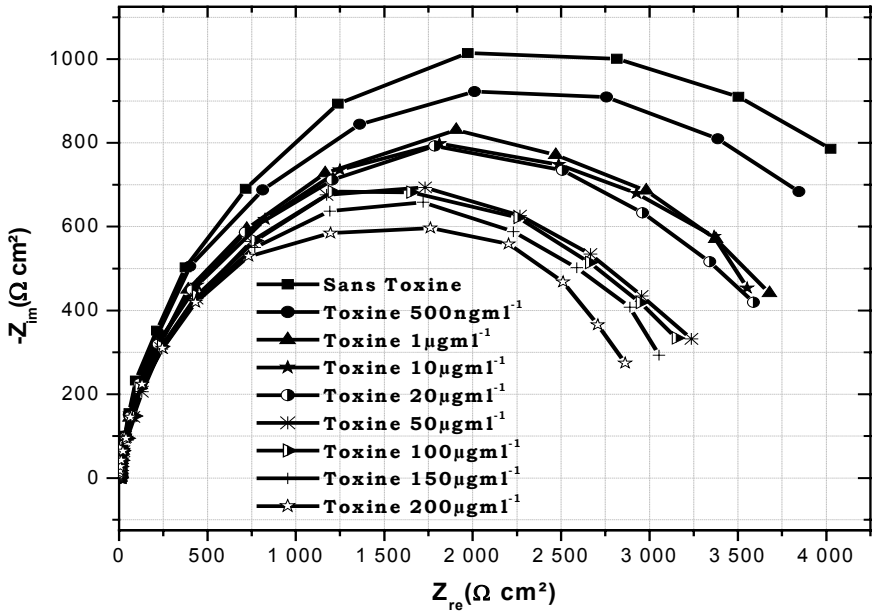


Figure IV.24: Variation de l'impédance représentée dans le diagramme de Nyquist dans le cas d'une couche de cellules endothéliales suite à l'injection de toxine

✓ Diagramme de Bode

La figure IV.25 présente la variation de l'impédance en fonction de la fréquence pour différentes concentrations en toxine.

Ce que l'on peut dégager à partir des spectres d'impédance dans la représentation de Bode, est que les variations occasionnées par les ajouts de toxine sont plus marquées à haute fréquence.

Ces spectres d'impédances sont modélisés, en utilisant un circuit électrique équivalent identique à celui utilisé pour déterminer les valeurs de la résistance de transfert de charge.

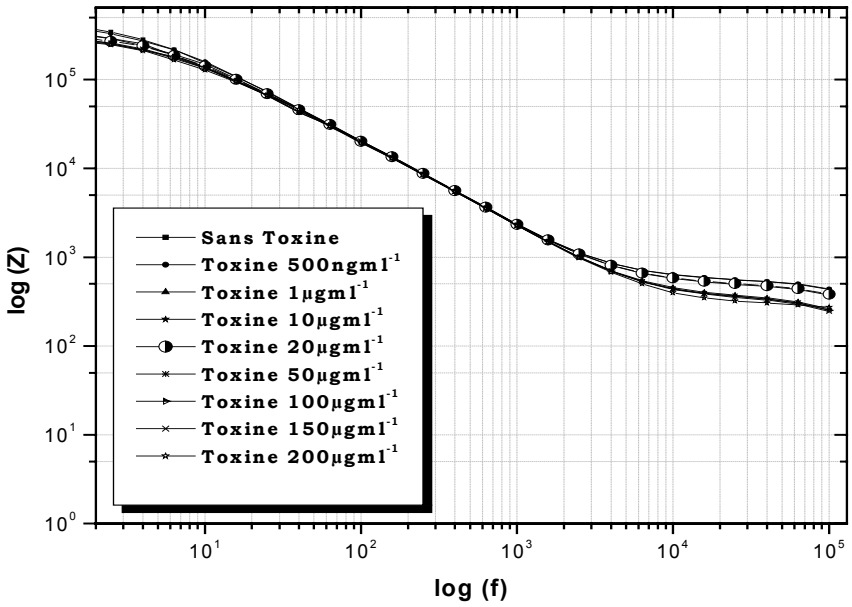


Figure IV.25 : Variation de l'impédance représentée dans le diagramme de Bode suite à l'injection de toxine à différentes concentrations

✓ Courbe de calibration

La figure IV.26 représente la courbe de calibration montrant la variation de la résistance de transfert de charge $\Delta R = R_{\text{sans toxine}} - R_{\text{avec toxine}}$ [33] en fonction des valeurs de la concentration en toxine ajoutée, où R présente la résistance de transfert de charge que peut avoir une électrode d'or fonctionnalisée par une couche de thiol, puis imprégnée par du polystyrène, ensuite bioactivée par une protéine qui est la fibronectine et enfin recouverte par une couche confluente de cellules endothéliales. $R_{\text{sans toxine}}$ et $R_{\text{avec toxine}}$ représentent la résistance de transfert de charge de l'électrode respectivement avant et après l'injection de toxine.

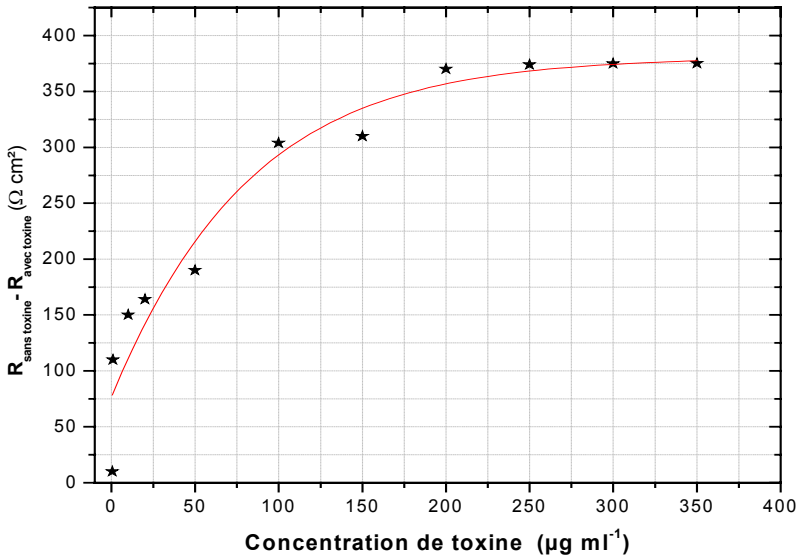


Figure IV. 26 : Variation de la résistance de transfert de charge suite à l'injection de différentes concentrations de toxine dans la cellule électrochimique.

Cette courbe présente un comportement linéaire sur une gamme de concentration entre 0,5 µg/ml et 200µg/ml puis s'aplatit graduellement à plus haute concentration. Par conséquent, l'interface cellule endothéliale – toxine a une gamme dynamique entre 0,5 µg/ml et 200 µg/ml. Cette gamme est proche de la saturation quand la concentration de toxine atteint 200µg/ml.

IV- Corrélation Energie de surface - Adhésion

Réponse cellulaire

Lorsque les cellules endothéliales adhèrent sur des biomatériaux, la morphologie polygonale de la cellule endothéliale est indicatrice de la bonne prolifération, de l'étalement et de l'adhésion. Afin d'estimer l'énergie d'adhésion de la cellule à un substrat, nous avons essayé de quantifier la force de détachement. Nous avons étudié l'adhésion cellulaire en régime statique et dynamique. D'après la littérature et en régime statique, une relation sigmoïdale a été mise en évidence entre la surface d'étalement et l'énergie de surface des substrats. L'étalement dépend fortement de l'énergie de surface ayant une valeur comprise 30 % et 80 % (C'est la partie linéaire de la courbe). Alors qu'à faible ou à fortes valeurs de l'énergie de surface, l'index de l'étalement est constant : il est faible (début de la courbe) ou élevé (au niveau du plateau).

L’énergie libre de surface est le facteur dominant dans l’initiation de l’attachement cellulaire [34]. Horbett et Schway (1988) [35] ont mis en évidence une corrélation linéaire approximative entre l’étalement cellulaire et l’adsorption de la fibronectine sur une série des substrats ayant des mouillabilités croissantes [7,34,36].

L'énergie libre de surface est une grandeur thermodynamique qui contribue à l’interprétation des phénomènes interfaciaux. Elle se définie comme l’énergie qu’il faut fournir contre les forces de liaison pour créer une surface unité en éloignant les atomes de part et d’autre d’un plan imaginaire depuis leur distance d’équilibre jusqu’à l’infini. Le phénomène de mouillabilité de surface est un des principaux mécanismes de l'interaction cellule -substrat responsable de l'adsorption de protéines [37]. La mouillabilité d'une surface est largement dépendante de l'énergie de surface et influence le degré de contact avec l'environnement physiologique [38, 39]. Ces propriétés de surface sont donc capables d’influencer le degré d’adhésion des cellules [40, 41, 42, 43]. Par exemple, l’'étude de Grinne1 (1973) démontre une adsorption plus élevée de fibroblastes sur des surface*s* hydrophiles. L’adsorption des protéines adhésives telles que la fibronectine et la vitronectine est influencée par la nature des surfaces des matériaux et peut contribuer à augmenter l'adsorption de cellules sur ces mêmes surfaces [44].

L'étalement des cellules sur des biomatériaux dépend également de l'énergie libre de surface du substrat. Cet étalement est généralement supérieur sur des surfaces à haute énergie libre de surface [45]. Ce phénomène peut s'expliquer par le changement de conformation des protéines adsorbées, par adsorption sélective de protéines spécifiques du liquide biologique, par agglutination des protéines ou par tous ces facteurs réunis [46, 47]). Par exemple, l'albumine adsorbé sur le teflon, le polystyrène et le polycarbonate, démontre une structure de surface en réseau tandis qu'un film continu apparaît sur du carbone ou du mica [45].

Ce sont les forces de van der Waals qui déterminent le caractère hydrophobe-hydrophile de la surface. La croissance et l'ancrage des cellules sont inhibés sur des matériaux non-mouillables [38, 39]. Ce fait est attribue aux changements de conformations possibles des protéines adsorbées [47]. Les cellules interagissent dans leur milieu naturel avec les protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine et vitronectine). Ces dernières sont adsorbées à partir du plasma ou du sérum sur le substrat comme prérequis à une adhésion cellulaire et étalement réussi [38, 44]. La fibronectine semble être, en particulier, sensible aux changements conformationnels lors de l'adsorption sur des substrats hydrophobes, comme

cela a été démontré par spectroscopie infra-rouge ou par microscopie à fluorescence en utilisant des marquages avec anticorps monoclonaux et ou polyclonaux [48].

Une surface hydrophobe est une surface de faible énergie ayant donc une composante polaire faible, voire nulle : cela est du à l'absence de groupements polaires. La surface est constituée de sites chimiques apolaires (--C-H, C--C, --C-F). Il n'y a pas de possibilité d'établir des interactions physicochimiques avec des molécules du milieu environnant. Dans le cas d'une surface hydrophile ayant des groupes polaires --OH, $--NH_2$,--COOH, des liaisons acido-basiques, ioniques et polaires peuvent être établies.

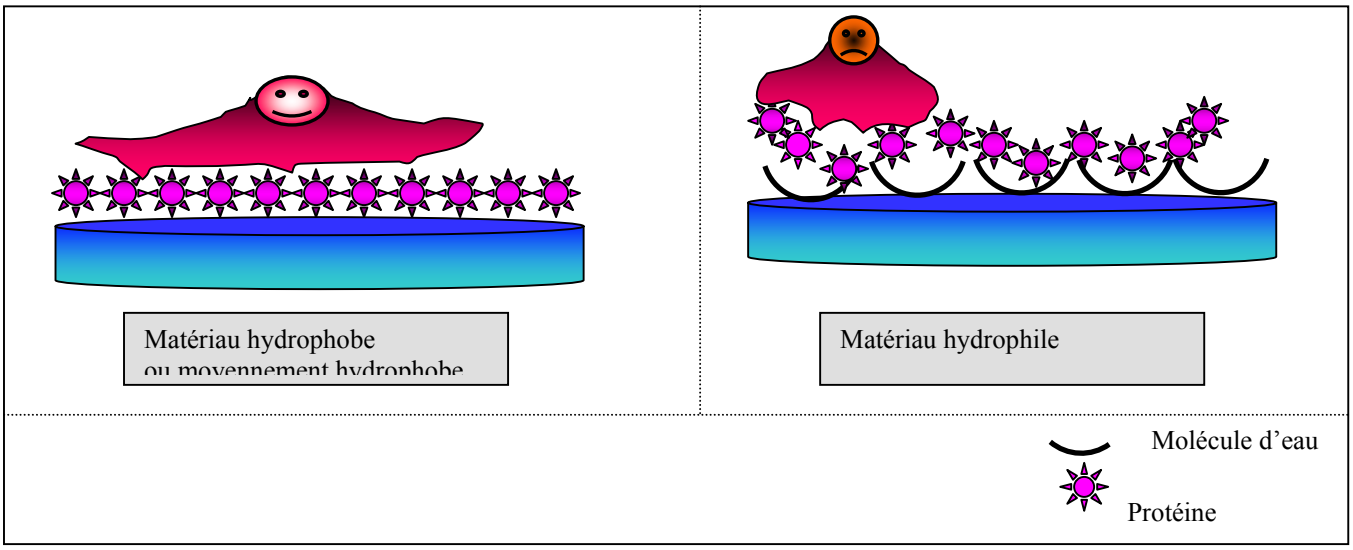


Figure IV-27: Schéma de l'étalement d'une cellule sur deux matériaux de mouillabilité différente

Sur une telle surface, il est connu qu'un film d'eau s'y forme immédiatement et qu'il se constitue une couche de faible cohésion limitant le dépôt d'une couche protéique et ensuite des cellules. Dans la figure IV-27, nous présentons schématiquement la corrélation entre l'état de surface de divers substrats protéiques et l'adhésion de cellules endothéliales. Plus le substrat est hydrophobe plus l'adhésion cellulaire est favorisée.

La variation du taux d'adhésion des cellules endothéliales en fonction de l'énergie de surface du substrat est présentée sur la figure IV-28. Dans la gamme de l'énergie de surface entre 29 et 55 mJ/m², le degré d'attachement diminue linéairement en fonction de l'énergie de surface du substrat (Héparine exclue). Le collagène dont le caractère est hydrophobe, présente le meilleur taux d'adhésion en comparaison avec les autres protéines. Il a une énergie de surface de 29 mJ/m². L'albumine possède une énergie de surface de 55 mJ/m². Cette courbe montre

ainsi que les cellules déposées sur cette protéine adhèrent faiblement. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés par C.M. Cunanan et al. [49]. Ils ont montré que les substrats ayant une énergie de surface inférieure à 5 mJ/m² ou supérieure à 40 mJ/m² limitent l'adhérence des cellules épithéliales. Cependant, la corrélation présentée dans le présent travail n'a pu être établie qu'en excluant l'Héparine. D'autres paramètres pour l'Héparine, tels que la résistance électrique (la plus faible) et la composante basique (très élevée 20 mJ/m^2 comparativement aux autres protéines dont la composantes est le l'ordre de 3 a 7 mJ/m^2), peuvent expliquer que cette protéines n'obéisse pas à la corrélation trouvée entre le taux d'adhésion et l'énergie de surface.

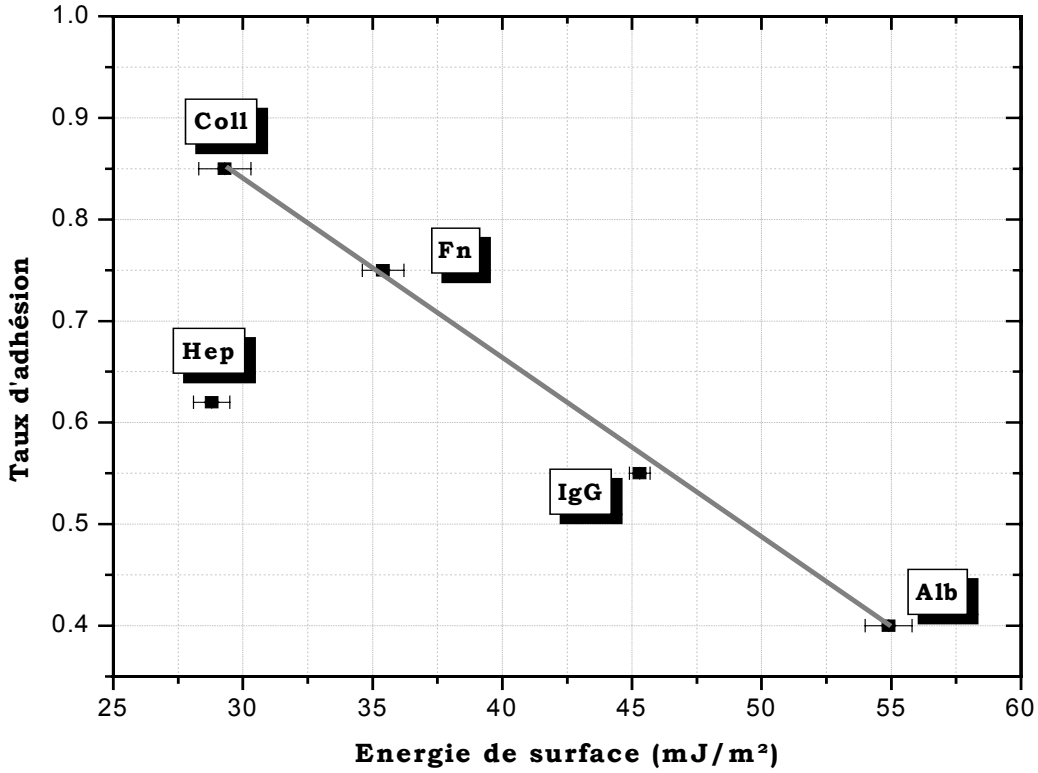


Figure IV-28 : Variation de taux d'adhésion des cellules endothéliales en fonction de l'énergie de surface

V- Corrélation rugosité - Adhésion

La topographie de surface influence différents aspects de l'interaction implant- tissu [50]. Au niveau macroscopique (échelle supérieure à 10 μm), la rugosité et la porosité influencent les propriétés mécaniques, la transmission et la distribution du stress à l'interface [51]. Tandis que sur une échelle allant de de 10 nm à 10 μm, la topographie est essentiellement impliquée dans les interactions primaires chimiques entre la surface et la cellule hôte [52, 53]. La plupart des métaux sont caractérisés par une mosaïque formée de microcristaux orientés aléatoirement.

Ces défauts sont très réactifs et représentent des sites susceptibles d'altérer les protéines ainsi que les réactions cellulaires. Plusieurs études démontrent que les cellules sont capables de réagir à la topographie du substrat. Ces propriétés géométriques de surface imposent des restrictions mécaniques sur les composantes du cytosquelette impliquées dans l'étalement de la cellule et dans sa locomotion [54, 55, 56, 57].

Dans la littérature, on parle de procédé connu sous le nom de contact guidé des cellules qui utilisent la morphologie du substrat pour s'orienter ou migrer. Les cellules épithéliales et fibroblastiques s'alignent d'elles-mêmes le long de lignes incrustées sur des surfaces. Il a été démontré que l'alignement cellulaire est influencé directement par la profondeur des sillons et inversement par l'espacement entre les sillons [58,59]. Ces études donnent un aperçu des mécanismes auxquelles les cellules ont recours pour s'adapter aux surfaces. Elles confirment l'hypothèse selon laquelle les propriétés mécaniques du cytosquelette influencent l'alignement cellulaire. L'étude de Meyle et Coll, [58] démontre un alignement par contact cellulaire sur une surface composée de creux de 2 et 5 µm. Ce phénomène d'orientation se décrit par les mouvements des cellules pour atteindre un équilibre biomécanique [60].

Les études in vivo sur l'apposition de l'os aux implants ont démontré que les surfaces rugueuses induisent la formation de l'os, tandis que les surfaces lisses tendent à promouvoir une interface fibreuse [61, 62]. La création d'une surface rugueuse offre la possibilité d'augmenter la croissance osseuse afin d'assurer une meilleure adaptation et une meilleure fonction de l'implant. Ces modifications structurales des surfaces font en sorte qu'une certaine porosité est créée et qui, par la suite, mène vers une stimulation de la migration des ostéoblastes ainsi que leur différenciation.

Ponsonnet et al. [63] ont étudié le comportement de cellules fibroblastiques sur des surfaces de titane de différentes rugosités. Les auteurs ont trouvé qu'après deux heures de culture, les fibroblastes ont adhéré à la surface par le biais de structures cytoplasmiques fines. Sur des biomatériaux à surfaces polies, les cellules présentent une forme aplatie qui s'étale sur presque toute la surface. Avec des surfaces rugueuses, la morphologie cellulaire est affectée par les rayures : la rugosité de surface oriente les cellules. Les surfaces lisses du titane favorisent l'adhésion et la prolifération des fibroblastes plus que les surfaces rugueuses. L'inverse peut être trouvé pour un autre type cellulaire tel que les ostéoblastes [64]

La figure IV-29 montre la variation du taux d'adhérence des cellules endothéliales en fonction de la rugosité RMS du substrat. Nous constatons qu'il y a une valeur seuil de la rugosité, de l'ordre de 12,47 nm, au delà de laquelle le taux d'attachement des cellules augmente et en

dessous de laquelle, au contraire, la rugosité est défavorable à l'adhésion cellulaire. La meilleure adhésion de cellules endothéliales est obtenue pour le collagène, qui présente la plus faible valeur de rugosité de surface, de l'ordre de 1,8 nm. Ce résultat confirme celui obtenu dans le paragraphe précédent. Nous noterons ici que l'IgG et la fibronectine ont la même résistance électrique (550 Ohm cm^2), la même capacité (1,8 mF/cm^2) et la même morphologie (chaînes et boucles) mais des charges opposées.

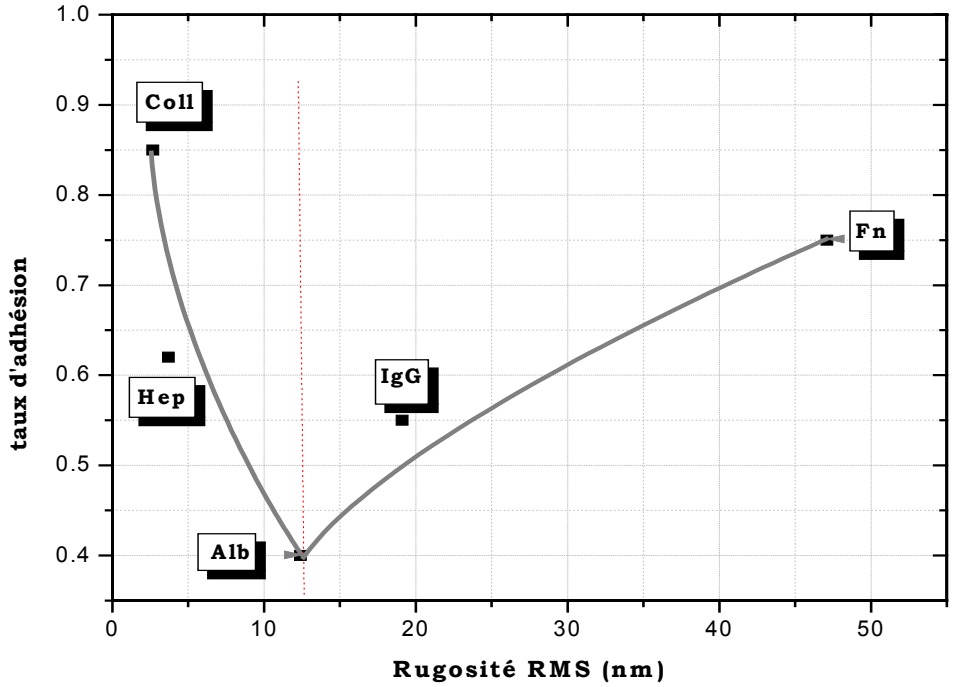


Figure IV-29 : Variation de taux d'adhésion des cellules endothéliales en fonction de la rugosité RMS du substrat

VI- Corrélation Charge- Adhésion

La surface des cellules animales possède généralement une charge négative ainsi que la plupart des substrats (le verre et le plastique) [65]. Dans ce cas nous sommes en présence de forces électrostatiques dites répulsives [66]. Ces forces de répulsions seront diminuées, en présence d'ions positifs, et l'adhésion sera favorisée. Certains auteurs [67-69] pensent qu'au niveau de la membrane biologique, les charges ne sont pas uniformément distribuées. On omet souvent le fait que la plupart des études d'adhésion cellule/substrat sont réalisées en présence de protéines provenant du sérum.

Ces protéines sont rapidement adsorbées à la surface du substrat, formant une couche de 2 à 5 nm d'épaisseur [66]. Le substrat épouse alors la plupart des propriétés de la couche protéique adsorbée. Pour Andrade, la nature de la charge de la surface influence l'adhésion. Il a montré que des biomatériaux chargés négativement induisent une meilleure adhésion que les biomatériaux chargés positivement. [47]. Dans notre étude, le collagène, la fibronectine et l'albumine sont chargées négativement alors que IgG et héparine sont chargées positivement. Ainsi, aucune corrélation directe ne se dégage ici entre le taux d'adhésion et la charge des protéines.

La variation de taux d'adhésion des cellules endothéliales sur différentes protéines en fonction de la résistance spécifique de ces cellules, est montrée dans la figure IV-30. Dans la gamme de résistance spécifique entre 1498 et 4095 Ω cm², cette variation suit une loi linéaire décroissante pour les trois protéines chargées négativement (collagène, fibronectine et albumine). Les deux autres protéines chargées positivement (IgG et héparine) sont plus éloignées de la régression linéaire.

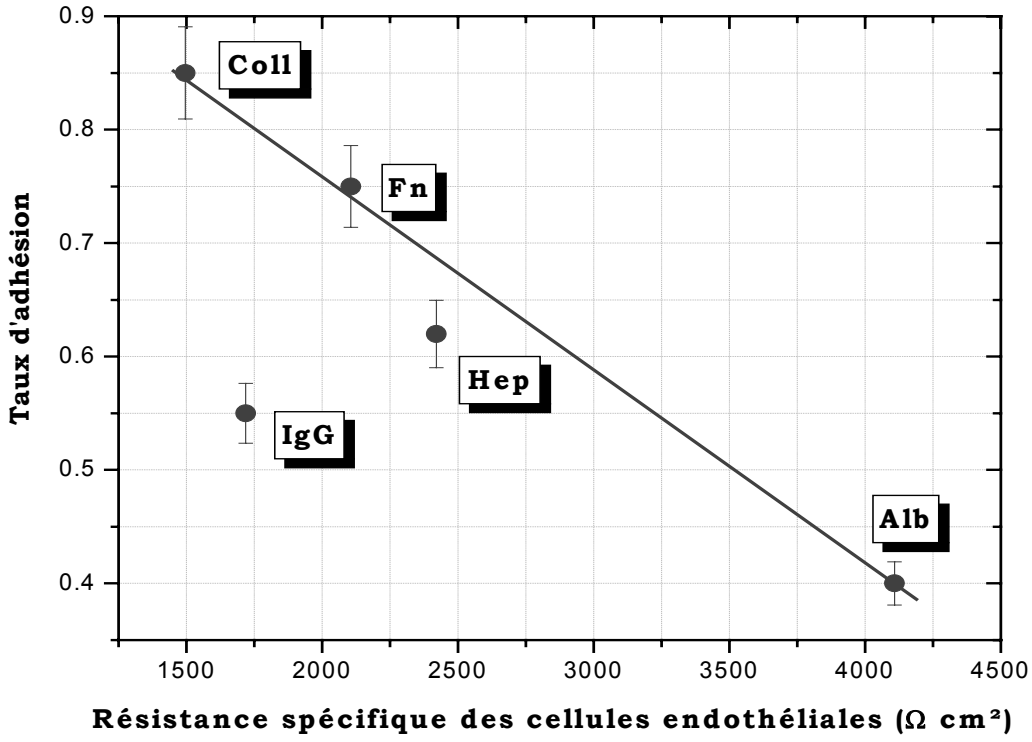


Figure IV-30 : Variation de taux d'adhésion des cellules endothéliales en fonction de la résistance spécifique des cellules endothéliales

Références Bibliographiques

[1] Alaoui MLA., Recherche sur la cytotoxicité du méthyl-2 hydroxy-9-ellipticinuim.Association à d'autres agents anticancéreux., Doctorat d'état des sciences pharmaceutiques. Université Paul Sabatier, Toulouse.

[2] : Anne Simon, Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux I, 5 Novembre 2002

[3] Rotsch C., Jacobson K., Radmacher M. (1999). Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 96: 921-926.

[4] Domke J., Dannöhl S., Parak W. J., Müller O., Aicher W. K., Radmacher M. (2000). Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 19: 367-379.

[5] Radmacher M., Fritz M., Kacher M., Cleveland J. P., Hansma P. K. (1996). Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscopy. *Biophys. J.,* 70: 55-567.

[6] Mathur A. B., Truskey G. A., Reichert W. M. (2000). Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells. Biophys. *J.,* 78: 1725-1735.

[7] Braet F., Rotsch C., Wisse E., Radmacher M. (1998). Comparaison of fixed and living liver endothelial cells by atomic force microscopy. *Appl. Phys. A,* 66: S575-578.

[8] Van Kooten T.G., Schakenraad J.M., Vander Mei H.C., Dekker A., Kirkpatrick C.J., Walter M., Korzec D., Engemann J., Busscher J. H., Fluid shear induced endothelial cell detachment from modified polystyrene substrata, Colloids and surfaces B: Biointerfaces 3 (1994) 147-158.

[9] Charara J., Doillon C., Lemay J., Ruel J., Dumas G., Effet de l'écoulement sur le devenir des cellules endothéliales : dispositifs d'études revue et commentaires. RBM. 8 (15) (1993) 435-445.

[10] Wang X., Zhao H., Zhuang F.Y., Stoltz J.F.**,** Hemorheol. Microciccul.2000 (www.ensen.u-nancy.fr/LEMTA/Os2/adhes_agreg-cell.html)

[11]: Wang JH, Goldschmidt-Clermont P, Wille J, Yin FC., Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching., J Biomech 2001 34 (12) 1563-72

[12] Braddock M., Schwachtgen J. L., Houston P., Dickson C. M., Lee M. J.,and Campbell .J., Fluid shear stress modulation of gene expression in endothelial cells, News Physiol. Sciences 13 (1998) 241-246

[13] Reutelingsprger CPM, Van Cool RGJ, Heignen V, Frederick P, Lindhout T, The rotating disc as a device to study the adhesive properties of endothelial cells under differential shear stresses, J Mater Sci: Mater Med. 5 (1994) 361-7

[14] Yamamoto A., Mishima S., Maruyama N., Sumita M., Quantitative evaluation of cell attachment to glass, polystyrene, and fibronectin or collagen coated polystyrene by measurement of cell adhesive shear force and cell detachment energy Biomed. Mater. Res 50 (2000) 114-124

[15] Décavé E., Garrivier D., Bréchet Y., Fourcade B., and Bruckert F., Shear flow-induced detachment kinetics of Dictyostelium discoideum cells from solid substrate, Biophysical journal 82 (2002) 2383-2395

[16] Bongrand P., Ligand-receptor Interactions. Rep. Prog. Phys., 62 (1999), pp 921-968.

[17] H. P. Schwan, In determination of biological impedance in physical techniques in research, Electrophysiological methods, Part B, Nesluk, W.L., Ed., Academic Press: New York 6 (1963) 323.
[18] Crone C., Oeson S.P., Electrical resistance of brain microvascular endotheliumBrain Res. 241 (1982).
[19] M.J. Rutten, R.L. Hooer, M.J. Karnovsky, Electrical resistance and macromolecular permeability of brain endothelial monolayer cultures Brain Res. 49 (1987) 425.
[20] J. Wegener, M. Sieber, H. Galla, Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces. J. Biochem. Biophys. Methods 32 (1996) 151.
[21] J. Wegener, S. Zink, P. RÖen, H. J. Galla, Use of electrical impedance measurements to monitor β-adrenergic stimulation of bovine aortic endothelial cells, Eur. J. Physiol. 437 (1999) 925-934.
[22] Turner M.R. Electrical resistances of cultured bovine arterial endothelium in solutions of various resistivities Exp.Physiol. 741 (1992).
[23] Cole K.S. Membranes, ions and impulses. University of California Press, Berkeley (1972).
[24] C. Steinem, A. Janshoff, J. Wegener, W.P. Ulrich, W. Willenbrink, M. Sieber, H.J. Galla, Impedance and shear wave resonance analysis of ligand-recepto interactions at functionalized surfaces and of cell monolayers, Biosensors and bioelectronics 8 (12) (1997) 787-808
[25] T.G. Van Kooten, T. H. Spijker, J. H. Busscher, Plasma-treated polystyrene surfaces model surfaces for studying cell biomaterial interactions, Biomaterials (2003) 1-13.
[26] S. Gritsch, P. Nollert, F. Jahnig, and E. Sackman. 1998. Impedance spectroscopy of porin and gramicidin pores reconstituted into supported lipid bilayers on indium-tin-oxide electrodes. Langmuir. 14:3118–3125.
[27] Pethig R. Dielectric and electronic properties of biological materials. J.Wiley, New york (1979).
[28] Minnear F, Patil S., Bell D., Gainor J., Morton C, Platelet lipids bound to albumin increases endothelial electrical resistance: mimicked by LPA, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 281 (2001) 1337-1344.
[29] Giaever I. and Keese C.R., Micromotion of mammalian cells measured electrically, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88(1991) 7896-7900
[30] Wegner J., Keese C., Giaever I. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. Experimental cell research 259 (2000) 158-166
[31] Takashiba S, van Dyke TE, Shapira L and Amar S: Lipopolysaccharide-inducible and salicylate-sensitive nuclear factor(s) on human tumor necrosis factor · promoter. Infect Immun 63:1529-1534, 1995.
[32] Lush CW, Cepinskas G and Kvietys PR: LPS tolerance in human endothelial cells: reduced PMN adhesion, E-selectin expression, and NF-κB mobilization. Am J Physiol Heart Circ Physiol 278: H853-H861, 2000.
[33] Hleli S., Martelet C., Abdelghani A. , Burais N., Jaffrezic-Renault N., Atrazine analysis using an impedimetric immunosensor based on mixed Biotinylated self-assembled monolayer, Sensors and Actuators B 113 (2006), pp. 711-717
[34] Scharkenraad J.M., Bussher H.J., Wildevuur Ch. R.H., and Arends J. Thermodynamic aspects of cell spreading on solid substrata Cell Biophys 13 (1988) 75-91
[35] Horbett T.A., and Schaway M.B. Correlations between mouse 3T3 cell spreading and serum fibronectin adsorption on glass and hydroxy-ethylmethacrylate-ethylmethacrylate copolymers J. Biomed. Mater. Res. 22 (1988) 763-793

[36] Van Kooten T.G., Schakenraad J.M., Vander Mei H.C., Busscher J. H. Development and use of a parallel-plate flow chamber for studying cellular adhesion to solid surfaces, Biomedical materials Research 26 (1992) 725-738
[37]Yamgisawa I., Sukuma H., Shimura M., Wakamatsu S., Yanggisawa, S. et Sairingi E. The effects of wettability of biomaterials on culture cells. J.Oral Implantol., 15 (1989) 168-177
[38]Van Kooten T.G., Schakenraad J.M., van der Mei H.C. et Busscher, HJ. Influence of substratum wettability on the *strength* of adhesion of human fibroblasts. Biomat., l3(1992) 897-904
[39]Van Wachem PB., Hogt AH, Beugeling T,Feijen, J., Bantjes A., Detmers, J.P. et van Aken, W.G. Adhesion of cultural human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettabiiity and charge. Biomat. 8 (1987) 323-328
[40]Dexter, SC. Influence of substratum critical tension on bacterial adhesion in *situ* studies. J. Colloid. Interface Sci., 70 (1979) 346-354
[41]Baier RE., Shafrin E.G. et ZismanW.A. Adhesion: mechanisms that assist or impede it. Science 162 (1968) 1360-1368
[42]Schrader ME. On adhesion of biological substances to low *energy* solid surface J. Colloid. Interface Sci., 88 (1982) 296497
[43]Baier RE., Meyer AE., Natiella JR, Natiella RR *et* Carter, JM. Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results. J. Biomed. Mater.Res,18(1984)337-355
[44]Pettit DK, Hoffman, AS. et Horbett TA Correlation between corneal epithelial outgrowth and monoclonal antibodyto the cell binding domain of fibronectin, J. Biomed. Mater. Res., 28(1994) 685-691
[45]Uyen, H.M.W., Schakenraad, JM., Sjollana, Je, Noordmans, J., Jongebloed, W.L.,Stokross I, et Busicher, H.J. Amount and surface *structure* of albumin adsorbed to solid substrate with different wettabilities in a parallel plate flow cell chamber J. Biomed. Mater. Res. 24 (1990) 1599-1614
[46]Healy, kE., Thomas, CH, Rezenia, A, Kim, J.E., McKeown, PJ, Lom, B. et Hockberger, PE. Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry. Biomat. 17(1996) 195-208
[47]Andrade, J.D. et Hlady, V. Protein adsorption and materials Biocompatibility; a tutorial review and suggested hypothesis. Adv. Polym. Sc., 79(1986) l-63
[48]Groth, T. *et* Altankov, *G.* Studies on cell-biomaterial interaction: role of tyrosine phosphorylation during fibroblast spreading on surfaces varying in wattability. Biomat, 17 1227-1234,1996.
[49] Cunanan C.M., Tarbaux N.M. and Knight P.M. (1991), Journal of Cataract and Refractive Surgey, 17 (6), 767-773.
[50]Brunette, DM. The effect of surface topography on cell migration and adhesion. Dans: Surface Characterization of Biomaterials. Ratner, B.D. (éditeur.). Elsevier, New York, 1988, pp. 203-217.
[51]Albrelasson T, Branemsrk PI, Hansson HA, Kasemo B, Larson K, Luudstorm I,, McQueen DH, Kalak RS. The interface zone of inorganic implants in vivo: Titanium implants in bone. Ann Biomed. Eng., 11(1983) 1-27
[52]Kasemo, B. Biocompatibility of titanium implants surface science aspects. J. Prosth. Dent 49 (1983) 832-837
[53]Ratner B.D., Johnson A.B. et Lenk TJ. Biomaterial Surfaces. J. Biomed Mater Res. Appl. Biomater. 21(1987) 59-90

[54]Dunn, G.A. et Brown AF, Alignment of fibroblasts on grooved surfaces described by a simple geometric transformation J. Cell. Sci., 83(1986) 313-340
[55]Keller, J.C. Dougherty, WJ. Grotendorst, GR. et Wightman , J.P. In vitro ce11 attachment to characterized titanium surfaces. J. Adhesion 28 (1989) 115-l33
[56]Campbell, C.E. et von Recum, A.F. Microtopography and soft tissue response. J. Invest.Surg., 2(1989) 51-74
[57]Martin, J.Y., Schwartz, Z., Hummert, T.WD, Schraub, DM., Simpson, J., Lankford, Jr. J., Dean, DD. Cochran, D.I. *et* Boyan, B.D. Effect of titanium surface on proliferation, differentiation and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). J.Biomed Mater. Res., 29 (1995) 389-401
[58]Meyle, J., Gultig, K. et Nisch, W. Variation in contact guidance by human cells on a microstructured surface. J. Biomed. Mater. Res., 29 (1995) 81-88
[59]Meyle, J., Gultig, K, Wolburg, H, et von Recum, A.F. Fibroblast anchorage to microtextured surfaces. J. Biomed. Mater. Res., 27(1993)1553-1557
[60]Boyan, B.D., Hummert, T.W., Dean, DD. Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. Biomat., 17 (1996) 137-146
[61]Thomas, K. et Cook, S. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. J. Biomed. Mater. Res., 19(1985) 875-890
[62]Buser, D., Schenk, RK, Steinemann, S., Fiorellini, J.P., Fox, CH. et Stich, H. Influence of surface characteristics on bone reactions to titanium implants . A histomophometric study in miniature pigs J. Biomed Mater.Res., 25 (1991)889-902
[63] Ponsonnet L., Reybier K., Jaffrezic N., Comte V., Lagneau C., Lissac M., Martelet C., Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium aloys and cell behaviour, Materials science and engineering C 23(2003)551-560
[64]: C. Wirth, V. Comte, C. Lagneau, P. Exbrayat, M. Lissac, N. Jaffrezic and L. Ponsonnet, "Nitinol surface roughness modulates *in vitro* cell response: a comparison between fibroblasts and osteoblasts", MSEC 25 (2005) 51-60
[65]Sherbett GV, Lackshmi, M.S. Rao, KV. Characterization of inorganic groups and estimation of the net negative charge on the surface of cells using natural using pH gradients Exp. Cell. Res, 70 (1972) 1 l3-123,.
[66] Barnogrover, D. Substrata for anchorage-dependent cells. Dans Mammalian Cell Technology, W.G. Thilly (éditeur), Butterworths, Boston, 1986, ppl3 1-149.
[67] Oseas, RS., Allen, J., Yang, H.H., Gachner, R.L. et Boxer, LA. Rabbit cationic protein enhaces leucocyte adhesiveness. Infect. Immun., 33: 523426,1981.
[68] Mozes N.,Marshal F., Hermess M.F., Van Haecht J.L. et Reuliaux L. Inmobilisation of microrganisms by adhesion: interplay of electrostatic and non electrostatic interactions. Biotechnol. Bioeng ., 30(1987) 439-450
[69]Borysenko, J. et Woods, W. Density distribution and mobility of surface anions on a normal cell Exp. Cell. Res.118(1979) 215-227

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le processus d'adhésion cellulaire à une surface comporte plusieurs phases successives: une étape d'approche, susceptible d'être influencée par les forces engendrées par la région la plus externe de la membrane, riche en macromolécules glycosylées. La phase critique est sans doute constituée par la formation de la première liaison. Sa compréhension nécessite une connaissance précise de la cinétique d'attachement et de détachement de molécules d'adhésion liées à des surfaces. Cette connaissance a progressé de manière spectaculaire au cours des dernières années, grâce au développement de méthodes physiques permettant d'étudier le comportement des molécules individuelles. La consolidation de l'adhésion est un processus complexe comportant une participation active de la cellule, et conduisant à une adaptation de la forme de la membrane, à une concentration des récepteurs dans la région de contact avec l'élimination d'éventuels éléments répulsifs, enfin, à un renforcement mécanique de la région adhésive résultant d'une réorganisation du cytosquelette sous-membranaire. Ces remaniements influencent de manière importante l'activité, la survie, la prolifération et la différenciation cellulaires.

Ce travail porte sur l'étude de la biocompatibilité de différents implants. Celle ci est conditionnée par les processus bioadhésifs mis en jeu. Les paramètres qui déterminent les interactions cellule – matériaux dépendent des propriétés de la surface du biomatériau et des propriétés intrinsèques des cellules. L'objectif est de caractériser les propriétés physicochimiques de la surface abiotique avant et après fonctionnalisation et de corréler ces propriétés avec l'énergie d'adhésion des cellules sur ces matériaux. Pour ce faire, une adaptation de certaines techniques de mesure est nécessaire. En particulier, la mesure de la force d'adhésion cellule-substrat à l'aide de techniques biorhéologiques (telles que la chambre à flux et le jet vertical) sera mise en œuvre pour des surfaces fonctionnalisées par différentes protéines d'adhésion. La chambre à flux horizontal s'est avérée un outil efficace pour l'étude qualitative de la réponse cellulaire au flux. La déformabilité cellulaire est décrite par l'élongation, la surexpression des microvitelli, l'étalement et le détachement cellulaire. Elle permet à l'opérateur d'être témoin du changement morphologique d'une cellule individuelle et de quantifier la force d'attachement de la cellule au substrat.

La mise en œuvre de la méthode du jet vertical ne nécessite qu'un court laps de temps. La durée d'exposition du jet est modélisée dans la littérature à 30 s. Elle est capable dévaluer qualitativement une réponse cellulaire collective par la lésion qui décrit la force qui la crée.

La quantification de la force d'adhésion est également possible et a convergé vers des informations similaires à celles obtenues par la technique de la chambre à flux.

En comparant les deux techniques on peut déduire que le flux horizontal nécessite un substrat de grandes dimensions pour respecter les conditions hydrodynamiques. Cette technique n'est donc pas adaptée pour des substrats de faible taille. De plus, ce dispositif permet, en plus de la quantification de la force d'adhésion d'une cellule à un substrat, d'étudier les modifications morphologiques de la cellule. Avec plus de moyen, on pourrait quantifier les différentes grandeurs qui caractérisent la déformation cellulaire et voir même le comportement en détail du cytosquelette quand la cellule est adhérée à un substrat. Le jet vertical, par contre, est bien adapté au substrat de faible dimension. Mais la force d'adhésion par cette technique est une grandeur globale. Il ne semble pas possible d'étudier les modifications morphologiques relatives à une cellule.

La chambre à flux laminaire horizontal a permis d'imposer une contrainte de cisaillement variable. L'analyse d'images de la déformation cellulaire en fonction de cette contrainte a conduit à la détermination de l'énergie d'adhésion entre la cellule et le substrat. L'évaluation de la réponse des cellules endothéliales a été qualitative par des variations morphologiques : élongation, alignement, réorientation selon la direction du flux et formation de pseudopodes. Elle a été également quantitative par la détermination de la force d'adhésion cellulaire, du taux de détachement, de l'indice d'élongation ou du facteur de forme, du module d'élasticité et du coefficient de l'efficacité de détachement cellulaire. Le jet vertical a crée une lésion dans la couche confluente des cellules endothéliales. La surface de la lésion dépend de la contrainte de cisaillement appliquée et du temps d'exposition des cellules au jet. Ainsi, à partir de la surface de la lésion, il a été possible d'évaluer la force d'adhésion cellule-substrat. La caractérisation physicochimique décrite peut prédire l'adhésion des cellules endothéliales à des substrats différents.

Les substrats utilisés sont composés de matériaux polymériques (polystyrène, PS) fonctionnalisés par des protéines d'adhésion afin de modifier l'énergie de surface.

Le polystyrène est adsorbé sur du verre fonctionnalisé par des greffages spécifiques (fonctions silanes). Cette surface modèle a été caractérisée par la mesure de l'angle de contact par les trois techniques : la goutte posée, la bulle captive et le tensiomètre. Les méthodes de la goutte posée (ou sessile) et de la bulle captive (méthodes goniométriques) fournissent une image nette de la goutte traduisant l'interaction entre le liquide sonde et la couche moléculaire la plus superficielle de la surface. Elles permettent de connaître l'affinité d'une surface vis à vis

du liquide sonde, de calculer l'énergie libre de surface du matériau et éventuellement, d'estimer la dynamique moléculaire du solide en surface. Tout d'abord, la goutte posée est extrêmement simple. La versatilité et la facilité avec laquelle elle permet de déterminer l'énergie libre d'adhésion entre liquides et solides à leur interface d'interactions, ont été, jusqu'à ce jour, difficiles à reproduire par une autre méthode. Quant à la technique de la bulle captive, elle est moins souvent employée mais elle a l'avantage, dans le cas de certains matériaux, de mieux reproduire l'environnement dans lequel ils sont utilisés. La mesure dynamique d'angle de contact permet de d'évaluer le caractère cinétique de l'hystérèse de mouillage (différence entre l'angle au retrait et l'angle à l'avancée). Les informations qui en découlent portent sur la rugosité, l'hétérogénéité chimique, la déformation, le gonflement, la réorientation et la mobilité de la surface. Toutes ces informations sont obtenues en utilisant un tensiomètre de type Wilhelmy et en faisant varier les conditions opératoires telles que la vitesse de plongée de la surface dans divers liquides sondes, la profondeur de plongée, le nombre de cycles successifs, la préparation de l'échantillon avant la plongée (séchage et taux d'hydratation). L'énergie de surface ainsi que ses composantes polaires et dispersives pourront également, au même titre que pour les mesures goniométriques, être calculées sur la base de modèles théoriques (Van Oss, Owens -Wendt) à partir des angles de contacts mesurés. Cependant les mesures sont dynamiques et si elles apportent des informations très riches sur la dynamique moléculaire des chaînes polymériques, la goutte posée et la bulle captive restent des mesures à l'équilibre intéressantes au sens ou elles permettent de vérifier l'hétérogénéité d'une surface avec une meilleur résolution spatiale que le tensiomètre qui fait une mesure globale. En revanche la goutte posée reste sensible à la contamination par l'environnement extérieur (forme de goutte perturbée au point triple par la diffusion d'espèces adsorbées sur la surface) alors que la bulle captive et la tensiomètre y sont moins sensibles. Cependant, la bulle captive ne permet pas d'obtenir une mesure fiable avec un substrat trop hydrophile car un film d'eau se forme à la surface et les bulles d'air ont du mal à se fixer pour une bonne mesure de l'angle. Ainsi, dans notre étude, notre choix s'est porté sur le tensiomètre essentiellement en vertu de ses capacités à apporter des informations sur la mobilité des chaînes de protéines (via l'hystérèse) car la conformation des protéines, leur mobilité potentielle en milieu aqueux et leur capacité à se réorienter lors des processus bioadhésifs sont des paramètres qui peuvent moduler l'adhésion des cellules eucaryotes sur ces protéines.

Afin de favoriser l'adhésion des cellules endothéliales, différentes protéines ont été déposées sur la surface du biomatériau avant la culture cellulaire : la fibronectine, le collagène, l'héparine, l'albumine, et l'immunoglobuline G.

La microscopie à force atomique (AFM), la mesure d'angle de contact (mouillabilité, en mode statique (CA) et dynamique (DCA)) et la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) ont été utilisées pour caractériser les différentes structures élaborées.

La réponse des cellules endothéliales adhérées sur les substrats étudiés a été évaluée par diverses méthodes complémantaires :

- une étude qualitative des variations morphologiques de la cellule endothéliale : alignement, orientation selon la direction du flux et formation de pseudopodes.
- une quantification de la force d'adhésion cellulaire, du taux de détachement, de l'indice d'élongation ou du facteur de forme, du module d'élasticité et du coefficient de l'efficacité de détachement cellulaire. Ceci a été réalisé par des techniques hydrodynamiques.
- un test d'adhésion réalisé par le marquage et le comptage des noyaux fluorescents des cellules endothéliales ensemencées sur les différents substrats fonctionnalisés par différentes protéines d'adhésion. Le marquage des fibres d'actine du cytosquelette a montré l'apparition des fibres de stress sur certaines protéines. Il indique ainsi que le cytosquelette de la cellule endothéliale est sensible à l'activation du substrat.
- un test de cytotoxicité pour quantifier la viabilité des cellules endothéliales sur ces différents substrats.
- la spectroscopie d'impédance électrique pour déterminer les propriétés électriques de l'interface entre les cellules endothéliales et le matériau abiotique fonctionalisé. En effet, grâce à l'utilisation de circuits électriques équivalents, il est possible de modéliser les propriétés diélectriques (résistance et capacité en parallèle) de chacune des composantes du système, à savoir : le substrat avec ses connexions électriques dans le milieu de mesure; l'interface représentée par la couche de fonctionnalisation recouverte de composants du milieu de culture adsorbées et de la matrice extracellulaire ; les cellules. Ces différentes propriétés diélectriques sont liées au processus d'adhésion des cellules sur le substrat.

Finalement, l'effet d'une toxine sur l'adhésion des cellules endothéliales a été analysé par spectroscopie d'impédance éléctrochimique (EIS).

ANNEXES

Annexe 1 : Culture cellulaire

La mise en culture de ces cellules endothéliales, provenant d'une lignée Eahy926, s'effectue dans 5 ml de milieu frais complet composé de : M199 (Sigma, M2154), Pénicilline-streptomycine (Péni. = 10000 U/ml, Strepto. =10 mg/ml, Sigma, P0781), AmphothéricineB (250 µg/100 ml, Sigma, A2942), glutamine (2 mM, Sigma, G7513), et une solution tampon Hepes (15 mM, Sigma, H0887). Du sérum de veau fœtal décomplémenté (Sigma, F7524) y est ajouté à 10 % [1].

I- Trypsination

Arrivées à confluence, le passage en subcultures des cellules endothéliales est indispensable. Pour cette étape, on utilise la trypsine-EDTA (trypsine 1/250 + EDTA 0.02%, Gibco-BRL®). Tout d'abord, on aspire le milieu de culture. Puis, on rince la boite avec du M199 préchauffé à 37°C. Ensuite, on met un volume de 2ml (selon la dimension de la boite) de trypsine préchauffée à 37°C. On laisse agir 3 min dans l'étuve. On surveille au microscope à phase inverse le décrochage des cellules. Quand les cellules s'arrondissent, les interactions, entre les molécules d'adhésion cellulaire et le matériau constituant la boite, sont rompues. On rajoute immédiatement le même volume de milieu de culture, autrement dit, on dilue la trypsine pour inhiber son effet. La suspension cellulaire est transférée dans un tube conique de 15 ml pour une centrifugation à 1400 tours/min pendant 5 min. Après remise en suspension, la concentration cellulaire est déterminée à l'aide d'une cellule de comptage (Malassez, lame de Thomas).

II- Conservation des cellules

La culture de cellules génétiquement instables, à durée de vie limitée, sont difficiles à entretenir. L'établissement d'une lignée cellulaire et la sélection d'une classe ou l'isolement d'une souche cellulaire avec des caractéristiques déterminées, nécessite la préservation rapide de ce matériel cellulaire. La conservation des cellules protège celles-ci contre des modifications de leur patrimoine génétique, le vieillissement in vitro et les risques de contamination (microbienne, fongique ou virale) ou des problèmes techniques de culture. Le procédé de conservation cellulaire le plus utilisé est la congélation. La cryopréservation nécessite non seulement un matériel de conditionnement (cryotubes en polypropylène, un système de congélation), mais également des conditions rigoureuses de préparation des cellules (stade de culture, milieu de congélation, densité cellulaire). L'addition d'un agent cryoprotecteur, tel que le diméthyl sulfoxyde (DMSO) ou le glycérol réduit considérablement les dommages comme la formation de cristaux de glace intracellulaire provoquée par la congélation et la décongélation. La procédure consiste à préparer la suspension cellulaire à congeler à une concentration de 10^6-10^7 cellules/ml dans du sérum de veau fœtal contenant du DMSO (Gibco BRL, 11101-011) à 10 % de concentration finale. Les cryotubes sont mis à 4°C pendant une heure puis deux heures à –20°C et une nuit à –80°C. Les cryotubes sont ensuite transférés dans des containers d'azote liquide.

III- Décongélation des cellules

Si la congélation doit être progressive, l'étape de décongélation doit, en revanche, être rapide pour obtenir un rendement optimal. Le principe consiste à placer le tube dans un bain d'eau à 37°C jusqu'à décongélation complète de la suspension cellulaire. Après centrifugation destinée à éliminer les traces d'agent cryoprotecteur, le culot est remis en suspension dans le milieu de culture. Les cellules sont mises en culture dans l'étuve à 37°C et 5 % de CO_2. A ce stade, il est important de changer le milieu toutes les 24 heures. Les cellules sont utilisées à partir du troisième passage.

[1] Bouaziz A., Richert A. Caprani A. Vascular endothelial cell responses to different electrically charged poly(vinylidene fluoride) supports under static and oscillating flow conditions. Biomaterials 18 (1997) 107-112.

Annexe 2 : Spectroscopie d'impédance

Théorie

En électrochimie, on s'intéresse souvent aux processus et aux facteurs qui influencent le transport des charges à travers l'interface entre phases distinctes chimiquement (électrode et électrolyte). Le plus souvent l'une des deux phases, de part et d'autre de l'interface étudiée est un électrolyte dans lequel les charges sont transportées par le mouvement des ions. La deuxième phase est une électrode, c'est à dire une phase dans laquelle le transport de charges a lieu par mouvement d'électrons. Un tel transfert de charges, qu correspond au passage d'un courant électrique à travers l'interface électrochimique, a pour principale effet de produire une transformation chimique appelée réaction d'oxydoréduction.

Réaction d'oxydoréduction à l'interface métal/solution

Expérimentalement le contrôle du potentiel de l'électrode indicatrice est équivalent au contrôle de l'énergie des électrons dans l'électrode. En portant cette électrode à des potentiels plus négatifs, l'énergie des électrons est accrue. Ces électrons peuvent, éventuellement, atteindre un niveau d'énergie suffisant pour occuper des positons vacantes qui existe sur certaines espèces dans l'électrolyte. Un flux d'électrons (courant de réduction) circule de l'électrode vers la solution.

$$A^+ + e^- \rightarrow A$$

Inversement, on peut diminuer l'énergie des électrons en imposant un potentiel plus positif, il en résulte que des électrons du soluté trouvent des conditions d'énergie plus favorables dans l'électrode et y soit transférés. Leur flux, de la solution vers l'électrode, constitue un courant d'oxydation

$$A \rightarrow A^+ + e^-$$

Interface métal/solution [1,2]

Lorsqu'un métal est placé en contact d'un électrolyte, une interface électrique est immédiatement développée. La zone de l'interface métal/solution où existent les espèces chargées est appelée couche double électrique. A un potentiel donné, l'interface électrode/solution est caractérisée par une capacité de double couche (Cd).

Le coté de la double couche situé dans la solution est constitué de plusieurs couches. Celle qui est le plus proche de l'électrode est appelée couche d'Helmholtz. Elle contient les molécules de solvant et parfois certaines espèces (ions ou molécules) qui sont spécifiquement adsorbées. Le lieu des centres électriques des ions spécifiquement adsorbés est appelé plan interne d'Helmholtz (PIH), situé à une distance x_1 de l'électrode. Les ions solvatés ne peuvent s'approcher du métal qu'à une distance au plus égale à x_2; le lieu des centres des ions solvatés est appelé plan externe d'Helmholtz (PEH). L'interaction des ions solvatés avec le métal chargé met en jeu uniquement des forces électrostatiques à grande distance. Ces ions sont dits non spécifiquement adsorbés. En raison de l'agitation thermique dans la solution, les ions non spécifiquement adsorbés sont situés dans une région appelée couche diffuse, qui s'étend du PEH au sein de la solution.

Double couche : Modèles d'Helmholtz, Gouy-Chapmann et Stern

Le contact métal/électrolyte crée à l'intérieur de l'électrolyte une zone de charge d'espace au voisinage de l'interface. Cependant la structure exacte de cette zone reste très difficile à déterminer, c'est ce qui a donné naissance à plusieurs modèles :

En 1879, Helmholtz a introduit la notion de la double couche. D'après Helmholtz, l'interface électrode/solution se comporte comme un condensateur plan; une chute linéaire de potentiel entre le métal et la solution. L'électrode métallique porte une charge, q^M, et la solution porte une charge, q^S (la signe du métal par rapport à la solution dépend du potentiel). Dans tous les cas, $q^M = -q^S$. La charge sur le métal q^M est localisée dans une couche extrêmement mince (~100pm) à la surface du métal. La charge en solution q^S est constituée d'un excès soit de cations, soit d'anions au voisinage de la surface de l'électrode.

$$C_H = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{d_{PEH}} \qquad \text{Eq.1}$$

Où ε_0 est la permittivité du vide et ε_r est la permittivité relative de l'électrolyte.

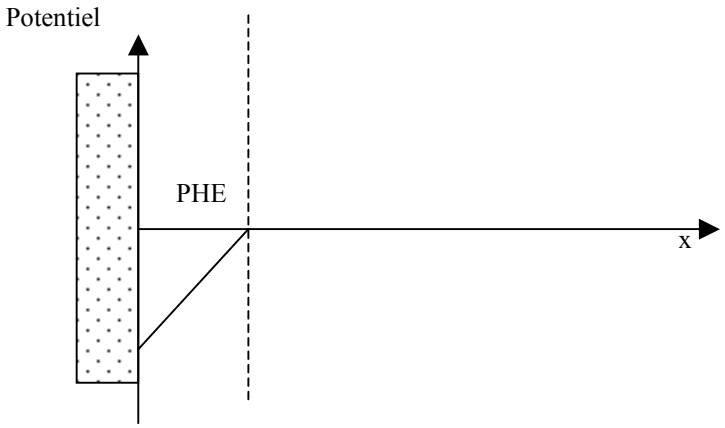


Figure 1 : La variation du potentiel à l'interface conformément au modèle de Helmholtz

Le modèle de la double couche est simple mais il ne suffit pas à expliquer les résultats expérimentaux. Gouy et Chapmann ont amélioré le modèle d'Helmholtz en proposant un modèle où les ions qui forment la charge électrique de l'interface du coté solution ne sont plus localisés en totalité dans le plan d'Helmholtz mais ont une distribution décroissante avec la distance de l'électrode. Cette distribution résulte de l'équilibre entre les forces de nature électrique et celles de nature thermique. La double couche devient couche diffuse. La chute de potentiel va avoir, elle aussi, une décroissance en fonction de la distance de l'électrode en tendant asymptotiquement vers zéro au sein de la solution. L'approximation faite par Gouy et Chapmann est de considérer les ions comme des charges électriques ponctuelles.

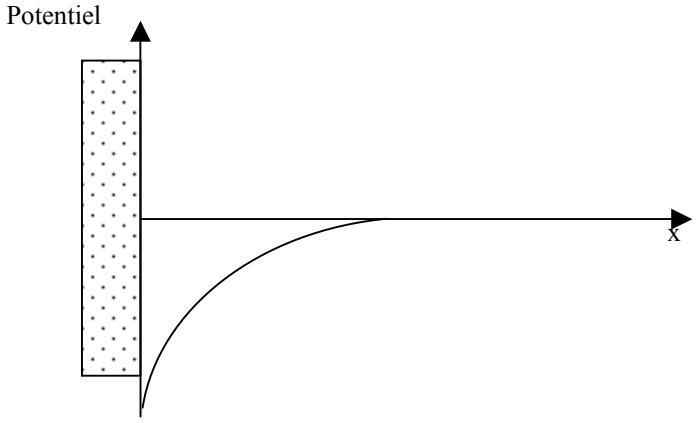


Figure 2: Variation du potentiel avec la distance dans la couche diffuse.

La chute de tension à travers la zone de charge d'espace est donnée par

$$V(x) = V_0 e^{\left[\frac{x}{L_D}\right]} \qquad \text{Eq. 2}$$

Où V_0 est le potentiel sur la surface de l'électrode (x=0), et L_D est la longueur de Debye qui représente l'épaisseur de la couche diffuse.

$$L_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r V_t}{2 n_0 z^2 q}} \qquad \text{Eq. 3}$$

Où V_t représente la tension thermique, $V_t = \frac{kT}{q}$, n_0 est le nombre d'ions par unité de volume (ions/l), z est la valence des ions et q est la charge d'un électron.
La capacité par unité de surface (F/m^2) est donnée par :

$$C_G = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{L_D} \cosh\left(\frac{z V_0}{2 V_t}\right) \qquad \text{Eq. 4}$$

Où le terme ($\varepsilon_0 \varepsilon_r / L_D$) représente la capacité par unité de surface d'un condensateur plan dont les armatures sont séparées d'une distance L_D, l'effet des charges mobiles est compensé par le terme en cosinus hyperbolique.
Bien que le modèle de Gouy-Chapmann constitue une amélioration de celui d'Helmholtz, la valeur théorique de la capacité varie avec la tension appliquée beaucoup plus que la valeur observée expérimentalement et aussi elle est trop dépendante de la concentration ionique. Stern a rectifié cette divergence en combinant le modèle de Helmholtz avec celui de Gouy-Chapmann. Stern n'a pas fait l'approximation des charges ponctuelles du modèle de couche diffuse et il a considéré que les ions ne peuvent pas s'approcher de l'électrode au delà d'une certaine distance critique. Les porteurs de charge en solution, selon la théorie de Stern, ont la même distribution que dans le cas de la couche diffuse avec la différence que la distribution ne commence pas à la surface de l'électrode (x=0) mais a partir du plan d'Helmholtz. Ce qui implique deux chutes de potentiel :

$V_M - V_S = (V_M - V_H) + (V_H - V_S)$

Où V_M est le potentiel de l'électrode, V_S le potentiel au sien de la solution et V_H le potentiel en solution au plan externe de Helmholtz.

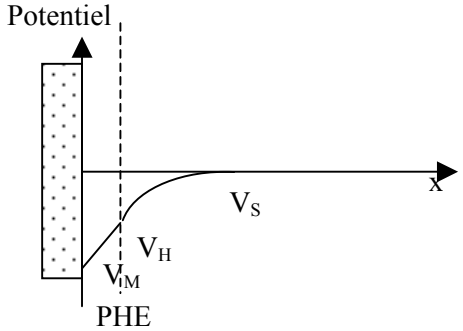


Figure 3: La distribution du potentiel selon Stern.

Ainsi la capacité interfaciale totale est la combinaison de deux capacités en série :

$$\frac{1}{C_I} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_G}$$

Où C_I est la capacité interfaciale totale de Stern, C_H est la capacité d'Helmholtz et C_G celle de Gouy-Chapmann.

Processus faradique et non faradique:

Les électrodes sont le siège de deux types de processus. Le premier concerne les transferts d'électrons à travers l'interface métal/solution. Ce transfert électronique provoque une oxydation ou une réduction : on dit qu'il s'agit d'un processus faradique.

Dans certaines conditions à une interface électrode/solution donnée, il existe un domaine de potentiel où aucune réaction de transfert de charge n'a lieu parce que de telles réactions sont thermodynamiquement ou cinétiquement défavorisées (une électrode métallique plongée dans une solution de PBS (Phosphate Buffer Salin) ne comportant pas de couple redox). Cependant, d'autre processus tels qu'une adsorption ou une désorption peuvent se produire, et la structure de l'interface électrode/solution varie avec le potentiel et la composition de la solution. Ces processus sont appelés non faradiques.

Mesure d'impédance électrochimique

Principe

La mesure d'impédance ou de l'admittance d'un système électrochimique s'effectue en appliquant au système une contrainte sous la forme d'une variation sinusoïdale de différence de potentiel électrique, de fréquence $f=\omega/2\pi$. Pour l'étude du comportement d'un système électrochimique à une électrode indicatrice donnée, cette différence de potentiel étant imposée entre l'électrode de travail et une électrode de référence (de potentiel suppose fixe), la contrainte revient a surimposer une variation sinusoïdale $\Delta E(t)$ du potentiel de l'électrode de travail à une valeur fixe E_0 (généralement E_0 est choisie de façon à avoir un courant nul dans la cellule électrochimique : le potentiel d'abandon) ; soit la loi de contrainte :

$$E(t)=E_0+\Delta E(t)= \Delta E_0 \sin(\omega t) \qquad \text{Eq. 5}$$

La réponse du système est un courant d'intensité I(t), formé d'une composante continue I_0 (le courant correspondant au potentiel E_0, courant évidement nul dans le cas ou E_0 est le potentiel d'abandon) et d'une composante alternative $\Delta I(t)$. Si I_0 n'est pas nul, on opère dans les condition ou ce courant est stationnaire (I_0=constante).

$$I(t)=I_0 + \Delta I(t) = \Delta I_0 \sin(\omega t + \varphi) \qquad \text{Eq. 6}$$

Transfert de charge [3]

Par définition, la fonction de transfert d'un système linéaire est définie comme le rapport des transformées de Laplace des variations des fonctions de sortie et d'entrée.

Pour un système linéaire, la réponse du système à une perturbation est déterminée par une équation différentielle du n^e ordre ou par un ensemble de n équations différentielles du premier ordre:

$$\sum_{i=1}^{n} a_i \frac{d^i y(t)}{dt^i} = \sum_{i=1}^{n} b_i \frac{d^i x(t)}{dt^i} \qquad \text{Eq. 7}$$

La fonction de transfert s'écrit :

$$H(s) = \frac{\Delta\bar{y}(s)}{\Delta\bar{x}(s)} \qquad \text{Eq. 8}$$

Quand une interface est éloignée de son équilibre au moyen d'une source d'énergie externe, un flux de charge et de matière s'établit. Cela est dû à l'existence de réactions électrochimiques qui permettent le transfert des charges électriques entre le métal et l'électrolyte. Les lois élémentaires qui gouvernent la cinétique du transport de matière et les diverses réactions électrochimiques, ainsi que les couplages complexes entre ces processus élémentaires, imposent aux systèmes électrochimiques un comportement non linéaire.
Toutefois, on peut montrer que le comportement d'un système non linéaire peut être entièrement défini en termes linéaires si les équations linéaires équivalentes sont connues en chaque point de la caractéristique stationnaire. Par conséquent, l'analyse locale de ce système non linéaire peut alors se limiter à la théorie des systèmes linéaires.

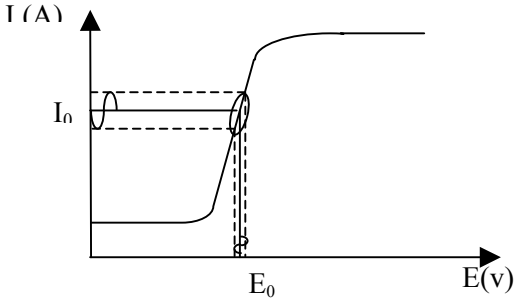


Figure 4: Exemple du courbe courant –tension

Dans le cas d'une excitation sinusoïdale, nous avons :

$$\Delta x(t) = \Delta x \sin \omega t \qquad \text{Eq. 9}$$

Dont la transformé de Laplace est

$$\Delta\bar{x}(s) = \Delta x \frac{\omega}{s^2 + \omega^2} \qquad \text{Eq. 10}$$

La fonction de sortie s'écrit ainsi

$$\Delta\bar{y} = H(s).\Delta\bar{x}(s) = \Delta x \frac{H(s).\omega}{s^2 + \omega^2} \qquad \text{Eq. 11}$$

La transformée inverse de l'équation 11 dans le domaine de fréquence, s=jω, donne la partie sinusoïdale de la fonction de sortie et s'écrit

$$\Delta y(t) = \Delta x \left|H(\omega)\right| \sin(\omega t + \phi) \qquad \text{Eq. 12}$$

Où $\left|H(\omega)\right|$ est le module de H(ω) défini en fonction des parties réelles ReH(ω) et imaginaires ImH(ω)

$$\left|H(\omega)\right| = \sqrt{\left[\mathrm{Re}\,H(\omega)\right]^2 + \left[\mathrm{Im}\,H(\omega)\right]^2} \qquad \text{Eq. 13}$$

Et φ l'argument défini par

$$\varphi = Arg\left[H(\omega)\right] = Arc\tan\left[\frac{\mathrm{Im}\,H(\omega)}{\mathrm{Re}\,H(\omega)}\right] \qquad \text{Eq. 14}$$

Dans le cas d'un circuit électrique ou d'un système électrochimique, la fonction de transfert entre le potentiel (fonction d'entrée) et le courant (fonction de sortie) s'appelle l'admittance Y du système. Dans le domaine de fréquence, elle est définie par

$$\Delta \overline{I}(\omega) = Y(\omega)\Delta \overline{E}(\omega) \qquad \text{Eq. 15}$$

De la même manière, la fonction de transfert entre le courant (fonction d'entrée) et le potentiel (fonction de sortie) s'appelle l'impédance Z du système. Dans le domaine de fréquence, elle est définie par

$$\Delta \overline{E} = Z(\omega)\Delta \overline{I}(\omega) \qquad \text{Eq. 16}$$

Il est clair que l'admittance est l'inverse de l'impédance.

La fonction de transfert dans le domaine de fréquence étant un nombre complexe, il est utile de la présenter en traçant la partie imaginaire en fonction de la partie réelle

$$Z(\omega = \mathrm{Re}\,Z(\omega) + j\,\mathrm{Im}\,Z(\omega) \qquad \text{Eq. 17}$$

En fait en électrochimie, il est d'usage de tracer plutôt –ImZ(ω) en fonction de Re Z(ω). Le graphe ainsi obtenu s'appelle diagramme de Nyquist.

Une autre manière de représenter un nombre complexe est de tracer le module en fonction de la vitesse angulaire. En électrochimie, il est aussi usuel de tracer $\log|Z(\omega)|$ en fonction de logω et le graphe ainsi obtenu s'appelle diagramme de Bode.

De façon générale, vis-à-vis d'une faible excitation sinusoïdale, une cellule électrochimique équivaut simplement à une impédance. On peut alors en donner les caractéristiques sous forme d'un circuit électrique équivalent, formé de résistance et de capacité, et traversé, pour une excitation donnée, par un courant de même amplitude et de même déphasage que la cellule réelle.

A l'interface électrode/solution le passage de courant peut s'effectuer suivant deux voies parallèles :

* La production d'une réaction électrochimique par transfert d'électron à travers l'interface, donnant naissance au courant faradique I_F

* La variation de charge interfaciale, donnant naissance au courant capacitif I_C.

$I=I_F + I_c$

Résistance de la solution R_s

Cette résistance, modélise le phénomène de passage du courant entre l'électrode indicatrice (l'électrode de travail) et la contre électrode. Cette résistance dépend, principalement, de la résistivité de la solution, de l'aire et de la géométrie de l'électrode de travail.

$$R_s(\Omega) = \frac{\rho\sqrt{\pi}}{4\sqrt{A}} \qquad \text{Eq. 18}$$

Où A est la surface en cm^2 et ρ est la résistivité de la solution.

Résistance de transfert de charge R_{tc}

La résistance de transfert de charge est définie par :

$$\frac{1}{R_{tc}} = \left(\frac{\delta I_F}{\delta E}\right) \qquad \text{Eq. 19}$$

Au potentiel d'équilibre la résistance de transfert de charge s'écrit

$$R_{tc} = \frac{RT}{nFI_0} \qquad \text{Eq. 20}$$

Phénomène de diffusion et impédance de Warburg W

Nous allons centrer notre étude sur des tensions sinusoïdales, les ions restant confinés aux voisinages de PEH. Si la fréquence d'excitation est élevée ces ions ne peuvent pas suivre l'oscillation du champ et l'impédance de diffusion tend vers zéro.

En 1899, Warburg propose un modèle qui décrit la dépendance en fréquence de l'impédance de diffusion [4]

$$|Z_W| = \frac{k}{\sqrt{f}} \qquad \text{Eq. 21}$$

Où k représente une constante déterminée par l'électrochimie et par la mobilité des ions impliqués dans la réaction de transfert de charge. L'impédance de Warburg est placée en série avec la résistance de transfert de charge puisque la diffusion et le transfert de charge sont deux phénomènes qui se produisent successivement. En effet, les charges doivent diffuser du volume de la solution vers l'interface pour contribuer à la réaction d'oxydoréduction.

Cette impédance de Warburg a pour expression

$$Z_W = (1 - j)\frac{\sigma}{(\omega)^{\frac{1}{2}}} \qquad \text{Eq. 22}$$

Avec

$$\sigma = \frac{RT}{n^2 F^2 A\sqrt{2}}\left(\frac{1}{D_O^{1/2} C_O^*} + \frac{1}{D_R^{1/2} C_R^*}\right) \qquad \text{Eq. 23}$$

Où A est l'aire de l'électrode, D_O et D_R représentent respectivement le coefficient de diffusion de l'oxydant et du réducteur, C_O^* et C_R^* sont les concentration en oxydant et en réducteur dans la solution, T la température absolue, F est la constante de faraday et n le nombre d'électrons échangés.

Si les réactions électrochimiques sont lentes, la résistance de transfert de charge est donc élevée et domine la partie résistive. Par contre, si la cinétique de transfert de charge est rapide, l'impédance de diffusion l'emporte par rapport à la résistance de transfert de charge, et l'impédance varie en $\omega^{-1/2}$. Il est important de noter que la présence d'une protéine va transformer le comportement de l'interface d'un phénomène limité par la diffusion vers un phénomène limité par la vitesse de la réaction de transfert de charge, vraisemblablement dû à l'adsorption des protéines à la surface du métal. Si des protéines sont adsorbées à la surface, la valeur de la surface effectivement disponible pour l'échange des électrons est réduite. En conséquence, pour les applications biologiques où des protéines sont présentes, un changement dans les caractéristiques de l'électrode devrait se produire.

Circuit électrique équivalent

- **Résistance - condensateur en série**

L'impédance de deux circuits en série est égale à la somme des impédances des éléments du circuit. En effet, la tension aux bornes du circuit est égale à la somme des tensions aux bornes de chaque élément, et le courant est identique à travers les éléments d'un circuit en série.

$$Z = \frac{\Delta\overline{E}}{\Delta\overline{I}} = \frac{\Delta\overline{E}_1 + \Delta\overline{E}_2}{\Delta\overline{I}} = Z_1 + Z_2 \qquad \text{Eq. 24}$$

Dans le cas présent d'une résistance et d'un condensateur en série, on a ainsi

$$Z(\omega) = Z_R(\omega) + Z_C(\omega) = R + \frac{j}{C\omega} \qquad \text{Eq. 25}$$

La représentation de Nyquist de l'impédance donne une droite verticale qui à haute fréquence tend vers le point $Z_R = R$ (figure 5).

Le diagramme de Bode peut être schématisé par deux droites qui se coupent à la vitesse angulaire 1/RC. A haute fréquence, l'impédance du circuit tend vers celle d'une résistance pure comme l'illustre la figure 6.

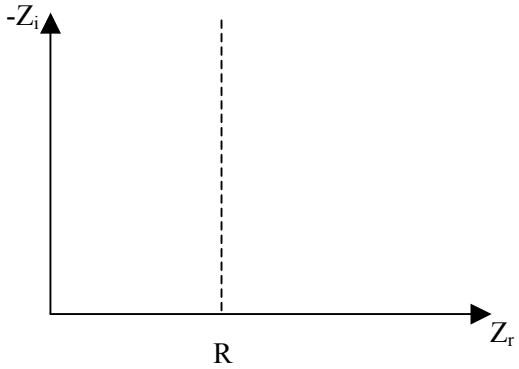


Figure 5 : Diagramme de Nyquist de l'impédance

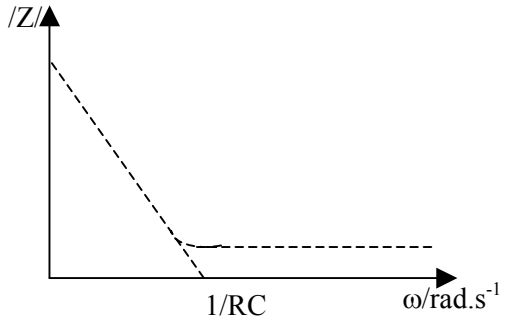


Figure 6 : Diagramme de Bode

- **Résistance - condensateur en parallèle**

L'admittance d'un circuit d'éléments en parallèle est égale à la somme des admittances des éléments respectifs. En effet, le courant à travers le circuit est égal à la somme des courants à travers chaque élément, et la tension est la même aux bornes de tous les éléments.

$$Y = \frac{\Delta \bar{I}}{\Delta \bar{E}} = \frac{\Delta \bar{I}_1 + \Delta \bar{I}_2}{\Delta \bar{E}} = Y_1 + Y_2 \qquad \text{Eq. 26}$$

Dans le cas présent d'une résistance et d'un condensateur en parallèle, on a ainsi

$$Y(\omega) = Y_R(\omega) + Y_C(\omega) = \frac{1}{R} + jC\omega \qquad \text{Eq. 27}$$

L'impédance est l'inverse de cette expression

$$Z(\omega) = \frac{R}{1 + jRC\omega} \qquad \text{Eq.28}$$

Le diagramme de Nyquist de l'impédance est donc un demi cercle dont la vitesse angulaire au sommet correspond à l'inverse de RC. A basse fréquence, l'impédance tend vers le point Z_R= R, et à haute fréquence l'impédance tend vers l'origine (figure 7).

Le diagramme de Bode peut être schématisé par deux droites qui se coupent à la valeur angulaire 1/RC comme illustre la figure 8.

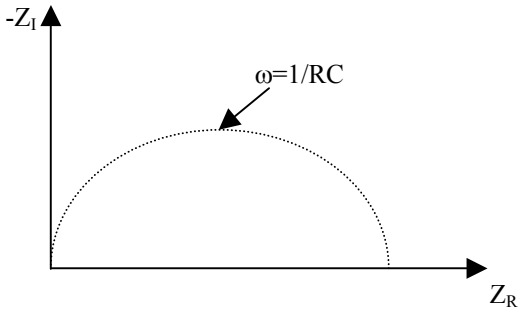


Figure 7 : Diagramme de Nyquist de l'impédance pour résistance - condensateur en parallèle.

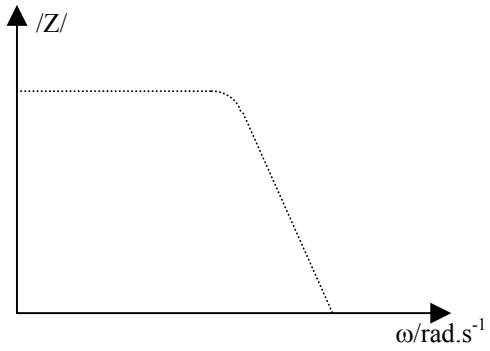


Figure 8 : Diagramme de Bode d'un circuit résistance - condensateur en parallèle.

- **Circuit de Randels**

Le circuit électrique équivalent le plus souvent utilisé est celui de Randels [5,6]. Il comporte une résistance R_s de l'électrolyte, une impédance de Warburg, Z_W, résultant de la diffusion des ions du volume de la solution à l'interface, la capacité de la double couche C_{dl} et la résistance de transfert de charge R_{tc} qui existe s'il y a un couple redox dans la solution. Les éléments agissant en parallèle (C_{dl} et R_{tc}, Z_W) du circuit équivalent sont introduits car le courant total qui traverse l'électrode est la somme du courant faradique, I_F, et du courant capacitif, I_C.

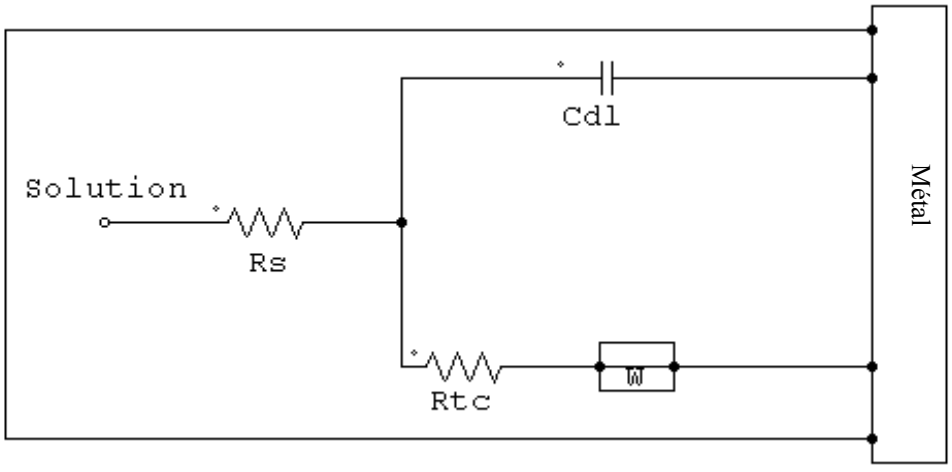


Figure 9 : Modèle électrique de l'interface métal/solution.

Ce circuit équivalent formé d'éléments idéaux, capacités et résistances, ne peut pas tenir compte des imperfections de l'interface notamment de la rugosité et de l'inhomogénéité de la couche organique. Pour remédier à ce problème, une alternative intéressante consiste à substituer ces éléments idéaux par des impédances généralisées dites aussi des CPEs (constant phase élément) [7-9] qui traduisent la non-linéarité et la dépendance en fréquences des impédances.
En effet, il est établi que la rugosité et la porosité des électrodes peuvent être à l'origine d'une dispersion en fréquence des spectres d'impédance. Plus tard, il a été démontré que les électrodes qui sont le siége ou non d'un transfert de charge à l'interface, possèdent des impédances qui s'expriment sous la forme d'une loi d'échelle;

$$Z = K(\omega)^{-\alpha} \; ; -1 \le \alpha \le 1$$

En particulier, Z représente une résistance si $\alpha = 0$, une capacité si $\alpha = 1$, une impédance de Warburg si $\alpha = 0.5$ et une inductance si $\alpha = -1$.

Diagramme d'impédance totale [10]
Compte tenu de l'intervention, à l'interface électrode/électrolyte, d'un courant capacitif et d'une résistance R_S, la grandeur mesurable est l'impédance totale exprimée par la relation :

$$Z = R_s + \frac{Z_F}{1 + j\omega C_{dl} Z_F} = R_S + Z_F \frac{1 - j\omega C_{dl} Z_F}{1 + (\omega C_{dl} Z_F)^2} \qquad \text{Eq. 29}$$

Or Z_F tend vers R_{tc} lorsque la fréquence est élevée. Alors l'équation 24 devient :

$$Z = R_S + R_{tc} \frac{1 - j\omega C_{dl} R_{tc}}{1 + (\omega C_{dl} R_{tc})^2} \qquad \text{Eq.30}$$

Où les composantes réelle, Z_{re}, et imaginaire, Z_{Im}, de l'impédance peuvent s'exprimer par:

$$Z_{re} = R_s + \frac{R_{tc}}{1 + (\omega C_{dl} R_{tc})^2} \qquad \text{Eq. 31}$$

$$Z_{\text{Im}} = \frac{\omega C_{dl} R_{tc}^2}{1 + (\omega C_{dl} R_{tc})^2} \qquad \text{Eq. 32}$$

L'équation de l'impédance, équation 25, est l'équation d'un demi cercle de diamètre R_{tc} dont les extrémités, sur l'axe des réels, sont les points d'abscisse R_s et R_s+R_{tc}. La fréquence à laquelle correspond le sommet du demi cercle a pour valeur $f_c = \frac{1}{2\pi R_{tc} C_{dl}}$.

Comme illustre la figure 10, le diagramme de Nyquist du circuit de Randles comprend un demi cercle dû à la résistance de transfert de charge R_{tc} et à la capacité de la double couche C_{dl}. Aux bases fréquences, l'impédance de Warburg est prédominante et le diagramme devient linéaire avec une pente égale à l'unité.

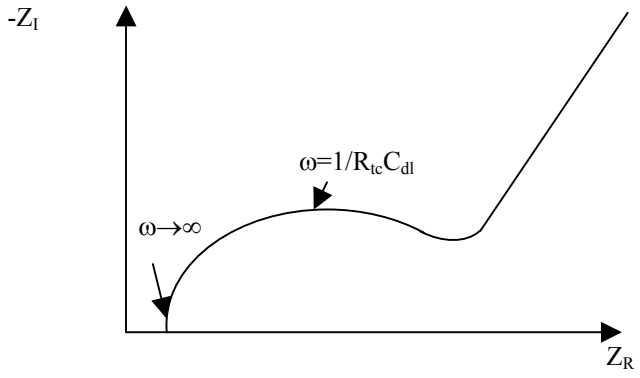


Figure 10: Diagramme de Nyquist de l'impédance pour un circuit de Randels.

Références

[1] A. J. Bard, L. R. Faulkner, Electrochimie, Principes, méthodes et applications, Masson, 1983.
[2] Jean Besson, Précis de thermodynamique & cinétique électrochimiques, Ellipses,1984.
[3] Hubert H. Girault, Electrochimie : physique et analytique, Presses polytechnique et universitaires romandes.
[4] E. Warburg, Ann. Pys. Chem., 76, 1899, 493-499.
[5] J. Randles, Discuss. Faraday Soc. 1 (1947) 11.
[6] B.V. Ershler, Discuss. Faraday Soc. 1 (1947) 269.
[7] H. Hillebrandt A. Abdelghani, C. Abdelghani, E. Sackmann, Electrical and optical characterization of thrombin-induced permeability of cultured endothelial cell monolayers on semiconductor electrode arrays, Appl. Phys. A 73 (5) (2001) 539.
[8] Wiegand, Ph.D thesis: Fundamental principles of the electric properties of supported lipid membranes investigated by advanced methods of impedance spectroscopy, 1999, Shaker verlag, ISBN 3-8265-7231-9, Technishe Universitat of Muenchen, Germany.
[9] A. Abdelghani, S.Hleli, K. Cherif, Optical and electrochemical characterisation of Self Assembled Octadecyltrichlorosilane on modified silicon electrodes, Materials Letters, 6 (6) (2002) 1064.
[10] Thèse de Hleli Salwa, Université de Lyon, Ecole Centrale de Lyon, 15 Décembre 2005