



HAL
open science

Revêtements à base de collagène pour la fonctionnalisation de biomatériaux

Christophe Chaubaroux

► **To cite this version:**

Christophe Chaubaroux. Revêtements à base de collagène pour la fonctionnalisation de biomatériaux. Biommatériaux. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT: 2013STRAE004 . tel-01062185

HAL Id: tel-01062185

<https://theses.hal.science/tel-01062185v1>

Submitted on 9 Sep 2014

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

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



THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Chimie Physique

Soutenue par **Christophe CHAUBAROUX**

Le 17 Septembre 2013

Revêtements à base de collagène pour la fonctionnalisation de biomatériaux

JURY

Co-Directeurs de thèse : Joseph HEMMERLE, Ingénieur de Recherche, INSERM
Youssef HAIKEL, Professeur, INSERM

Rapporteurs : Pierre WEISS, Professeur, INSERM
Vincent ROUCOULES, Maître de conférences, Université de Haute-Alsace

Examineurs : Saïd AHZI, Professeur, CNRS
Marc BOLLA, Professeur, Université de Nice Sophia - Antipolis

Ecole Doctorale de Physique et Chimie Physique

« Fais de ta vie un rêve, et d'un rêve, une réalité »

Antoine de Saint-Exupéry

A ma famille et mes amis,

A ma compagne Julie,

A notre fille Elyne.

Remerciements

Je remercie particulièrement mes co-directeurs de thèse, Joseph Hemmerlé, Ingénieur de Recherche à l'INSERM (U 1121, Strasbourg) et Youssef Haïkel, Professeur à la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg, pour m'avoir encadré dans d'excellentes conditions tout au long de mon travail. Je les remercie pour la formation scientifique et technique qu'ils m'ont apportée, pour leur soutien, leur disponibilité et leurs qualités humaines. Je suis très fier d'avoir été encadré par eux.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Jean-Claude Voegel, Directeur de Recherche à l'INSERM (U 1121, Strasbourg), et à Pierre Schaaf, Professeur à l'INSERM (U 1121, Strasbourg), pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire sous leur direction. Je les remercie pour leur soutien durant ces trois années. Je les remercie pour toutes les discussions riches et productives que nous avons eues.

Je suis très sensible à l'honneur que me font les membres du jury en acceptant de juger ce travail. Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à M. Pierre Weiss, Professeur à l'Université de Nantes, M. Marc Bolla, Professeur à l'Université de Nice, M. Saïd Ahzi, Professeur à l'Université de Strasbourg et M. Vincent Roucoules, Maître de conférences à l'université de Haute Alsace. Je leur adresse mes sincères remerciements.

Je remercie Fabienne Perrin-Schmitt, Roxane Fabre et Dominique Vautier pour leur grande disponibilité, leur collaboration et leurs précieux conseils.

Je remercie spécialement Bernard Senger, Vincent Ball et Engin Vrana, pour leur aide tout au long de ma thèse, pour toutes les discussions enrichissantes et pour tout ce qu'ils m'ont appris.

Je tiens à remercier Karim Benmlih qui a conçu les dispositifs d'étirement. Je garde un très bon souvenir des échanges que nous avons eu aussi bien professionnels que extraprofessionnels (V à toi motard !).

J'en arrive à mes compagnons de bureau, je suis très heureux d'avoir passé du temps en leur compagnie ces dernières années, je leur adresse de grands remerciements pour avoir partagé avec moi de nombreux moments de travail, de détente, de galères parfois : Armelle Chassepot, Géraldine Koenig, Morgane Rabineau et Christian Ringwald (pour ses conseils en alsacien : a guter').

Je remercie chaleureusement Christiane Bouthier, Eric Mathieu, Christine Affolter et Arthur, pour leur joie de vivre, leur gentillesse et pour nos discussions aussi intéressantes qu'agréables. Merci également à toute l'équipe de l'ICS pour l'ambiance au laboratoire.

Une dédicace spéciale pour mes compagnons de thèse, Morgane Rabineau et Juju Barthès. Merci pour toutes nos discussions en tout genre mêlant informatique, scientifique, philosophie, histoire, humour, sport !, ça va me manquer tout ça !

Enfin, je remercie mes proches : ma famille, ma belle-famille (le Pfister crew), mes amis pour leur soutien et leur affection, et tout particulièrement ma compagne Julie qui m'a soutenu, voire supporté... et qui m'a apporté tant de belles choses.

Table des matières

ABREVIATIONS ET SYMBOLES.....	1
INTRODUCTION GENERALE	3
1 CHAPITRE 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	13
1.1 BIOINGENIERIE ET FONCTIONNALISATION	15
1.1.1 <i>Influence du substrat sur les fonctions cellulaires</i>	15
1.1.2 <i>Les biomatériaux</i>	19
1.1.3 <i>La fonctionnalisation par dépôt de revêtements multicouches</i>	21
1.2 LES FILMS MULTICOUCHES DE POLYELECTROLYTES.....	22
1.2.1 <i>Historique des films multicouches</i>	23
1.2.2 <i>Les polyélectrolytes naturels utilisés</i>	25
1.2.3 <i>Mécanismes de croissance des films</i>	28
1.2.4 <i>Stabilisation des films par réticulation</i>	29
1.3 ALIGNEMENT DE FIBRES POLYMERES ET GUIDAGE CELLULAIRE	32
1.3.1 <i>Interactions des cellules avec leur substrat</i>	33
1.3.2 <i>Conditions nécessaires pour mimer des structures tissulaires alignées</i>	40
1.3.3 <i>Principales techniques utilisées</i>	40
1.3.4 <i>Étirement du revêtement collagène/alginate</i>	48
2 CHAPITRE 2. MATERIELS ET METHODES	51
2.1 MATERIELS.....	52
2.2 PREPARATION DES ECHANTILLONS.....	53
2.2.1 <i>Construction des films</i>	53
2.2.2 <i>Dispositifs d'étirement</i>	55
2.2.3 <i>Agents de réticulation</i>	57
2.3 ANALYSES BIOLOGIQUES.....	58
2.3.1 <i>Culture cellulaire</i>	58
2.3.2 <i>Ensemencement des cellules sur les films multicouches</i>	60
2.3.3 <i>Fixation/perméabilisation</i>	60
2.3.4 <i>Marquages immuno-fluorescents</i>	61
2.4 METHODES D'ANALYSE ET DE CARACTERISATION DES FILMS ET DES CELLULES.....	63
2.4.1 <i>Microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation</i>	63
2.4.2 <i>Microscopie à force atomique</i>	68
2.4.3 <i>Observations cellulaires</i>	72
2.4.4 <i>Quantification de l'orientation des fibrilles et des cellules</i>	72
2.4.5 <i>Spectroscopie infrarouge (IRTF)</i>	75
2.4.6 <i>Microscopie confocale à balayage laser</i>	82
2.4.7 <i>Microscopie électronique à balayage environnementale</i>	86
2.4.8 <i>Ellipsométrie</i>	88
3 CHAPITRE 3 : FILMS MULTICOUCHES DE POLYELECTROLYTES A BASE DE COLLAGENE RETICULES PAR UN AGENT NATUREL	90
3.1 DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU SYSTEME MULTICOUCHE A BASE DE COLLAGENE.....	91
3.1.1 <i>Résumé de l'article 1</i>	91
3.1.2 <i>Article 1</i>	93

3.1.3	Article 1 (Supporting Information)	101
3.2	APPLICATIONS DES FILMS MULTICOUCHES COLLAGENE/ALGINATE A LA FONCTIONNALISATION DE PROTHESE EN TITANE	106
3.2.1	Résumé de l'article 2	106
3.2.2	Article 2	108
3.3	ARTICLE 3	121
3.3.1	Résumé de l'article 3	121
3.3.2	Article 3	122
4	CHAPITRE 4 : ETIREMENT MECANIQUE POUR L'ALIGNEMENT MODULABLE DE CELLULES	131
4.1	RESUME DE L'ARTICLE 4	132
4.2	ARTICLE 4	134
4.2.1	Abstract	135
4.2.2	Introduction	136
4.2.3	Materials and Methods	137
4.2.4	Results and Discussions	140
4.2.5	Conclusions	149
4.2.6	References	150
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	155
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	158
	RESUME DE LA THESE	176
	LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	181

Abréviations et symboles

- Produits utilisés :

COL :	collagène
ALG :	alginate
PEI :	poly(éthylène imine)
PLL :	poly(L-lysine)
PSS :	poly(styrène sulfonate)
PAH :	chlorydrate de poly(allylamine)
HA :	acide hyaluronique
GEN :	génipine
GLU :	glutaraldéhyde
CHI :	chitosane
EDC :	hydrochlorure de N, N-(3-diméthylaminopropyl)-N-carbodiimide
s-NHS :	sulfo-(N-hydroxysuccinimide)
DMSO :	diméthyl sulfoxyde
PDMS :	poly(diméthyl siloxane)
FITC :	fluorescéine isothiocyanate

- Techniques d'analyse et de caractérisation :

FRAP :	recouvrement de fluorescence après photoblanchiment
AFM :	microscopie à force atomique
MEB (SEM) :	microscopie électronique à balayage
MET (TEM) :	microscopie électronique à transmission

CLSM :	microscopie confocale à balayage laser
QCM-D :	microbalance à cristal de quartz avec dissipation
IRTF :	spectroscopie infrarouge à transformée de fourier
UV-vis :	spectroscopie ultraviolet-visible

Introduction générale

Les progrès réalisés au cours des dernières décennies en ingénierie, biologie et médecine entrouvrent des possibilités jusqu'alors insoupçonnées de chirurgie corrective, suppléance d'organes déficients et de restauration de fonctions altérées. L'ingénierie tissulaire et la fonctionnalisation de biomatériaux s'appuient sur les connaissances acquises dans des domaines cellulaires, des technologies, des sciences des matériaux et des mécanismes moléculaires et cellulaires aux interfaces.

La fonctionnalisation de surfaces est une stratégie adoptée dans de nombreux domaines tels que l'automobile, l'électronique, l'aérospatial, le textile et les biomatériaux. Cette stratégie permet de modifier les propriétés physiques et/ou chimiques des matériaux telles que leur dureté, leur résistance aux chocs ou à l'abrasion, leur conductivité thermique ou électrique, leurs propriétés optiques, d'adsorption, de barrières aux agents biologiques et leurs interactions biochimiques avec un environnement biologique.

La fonctionnalisation de biomatériaux consiste à modifier une surface, par exemple en déposant un revêtement sur cette surface. Auparavant, les matériaux destinés à être implantés dans un organisme vivant devaient être inertes et stables au long terme. Des matériaux comme le titane (Noort 1987), les céramiques et certains polymères ont été utilisés car répondant à ces exigences. Leurs propriétés physiques ou chimiques permettent de les utiliser pour remplacer des os, des articulations, ou bien pour pallier à des déficiences biologiques (stent, pacemaker, implants dentaires). Pour améliorer l'intégration de tels matériaux, il est possible de les fonctionnaliser en modifiant leurs propriétés de surface. Cela peut se faire par déposition d'un film à leur surface. Ces films peuvent être dotés de propriétés anti-

microbiennes, anti-bactériennes, anti-adhésives, anti-inflammatoires, contenir des médicaments ou des enzymes pouvant être libérés.

Les surfaces fonctionnalisées peuvent aussi répondre à l'application de stimuli externes. La plupart de ces surfaces, dites « adaptatives », développées répondent aux variations de pH (Cai *et al.* 2009), de température (Mueller *et al.* 2005) ou de contraintes mécaniques (Hemmerlé *et al.* 2005). Ces fonctionnalisations de surfaces ont pour but de développer des matériaux ayant des propriétés physico-chimiques modulables (densité de charges, propriétés viscoélastiques, propriétés optiques), soit dans le but de délivrer des composés actifs consécutivement à une variation de pH, de température, de lumière ou de contraintes mécaniques.

Le dépôt couche par couche de films multicouches de polyélectrolytes sur une surface constitue une technique fiable, simple et respectueuse de l'intégrité des composés utilisés pour fonctionnaliser des biomatériaux. Les prémices de cette technique datent des années 1930. Les travaux de Langmuir et Blodgett ont ouvert la voie aux premières méthodes pour réaliser des assemblages de molécules chargées positivement et négativement. Ces films communément appelés films de « Langmuir-Blodgett » (LB) consistent à construire un film monocouche par le dépôt de molécules tensioactives ou amphiphiles, à une interface air/eau (Blodgett and Langmuir 1937). Un autre concept d'élaboration de tels films basé sur les interactions électrostatiques a été décrit dès 1966 par Iler (Iler 1966). Cette approche simple a consisté à utiliser des particules colloïdales anioniques et cationiques interagissant via des forces électrostatiques pour créer des films multicouches. Au début des années 1990, les travaux de Decher ont véritablement mis en valeur la méthode d'assemblage couche par couche, appliquée en particulier à des polymères chargés, ou polyélectrolytes (Decher *et al.* 1992a; Decher *et al.* 1992b; Decher 1997). Depuis une dizaine d'années, ces assemblages supramoléculaires suscitent une attention considérable due à leur fort potentiel d'applications

notamment en tant que revêtements d'implants, traitements de surfaces antireflets pour l'optique, systèmes de séparation de molécules et de nanofiltration, ou encore membranes à haute résistance mécanique.

Beaucoup de travaux se sont portés sur des films multicouches à base de polypeptides et polymères synthétiques tels que poly(L-lysine) (PLL)/acide hyaluronique (HA) ou poly(styrène sulfonate) (PSS)/poly(allylamine hydrochloride) (PAH). Depuis quelques années, des systèmes à base de polysaccharides ont vu le jour. Ainsi, le chitosane a été utilisé entre autres pour ses propriétés anti-microbiennes. L'alginate, un autre polysaccharide naturel provenant de ressources renouvelables (algues marines), a été utilisé pour sa biocompatibilité et sa biodégradabilité. En vue d'applications biomédicales, plusieurs équipes ont étudié des systèmes multicouches à base de collagène (Johansson *et al.* 2005b; Mhanna *et al.* 2011). Cependant, l'association du collagène avec l'alginate pour la fabrication de films multicouches n'avait jamais été proposée. Ce système a pourtant les avantages d'être totalement naturel, et d'être constitué d'une part de collagène (type I), protéine à la structure fibrillaire indispensable aux propriétés mécaniques des tissus, et d'autre part, l'alginate, déjà utilisé pour de multiples applications biomédicales et agroalimentaires.

La modification de la topographie et/ou des propriétés physico-chimiques d'une surface peut permettre d'aligner des fibres selon un axe et de « guider » l'adhésion et la prolifération de cellules déposées sur le support structuré. Weiss a introduit le terme de « contact guidance » ou guidage par contact en 1934 (Weiss 1934). Certains tissus comme les tendons (tissu conjonctif dense orienté) possèdent des structures fibrillaires alignées, à base de collagène, parmi lesquelles les cellules s'alignent dans le même sens. D'autres études ont également montré l'importance de l'alignement cellulaire au cours de la morphogénèse (Simone 2010).

Depuis quelques années, plusieurs techniques d'alignement d'un support fibrillaire pour guider différents types cellulaires ont vu le jour. Le collagène est beaucoup utilisé comme matériau de base puisqu'il est présent dans la matrice extracellulaire et contribue à la structure mécanique des tissus conjonctifs. En 1984, Torbet *et al.* ont décrit l'alignement de fibres de collagène induit par un champ magnétique. Cet alignement peut être utilisé pour l'alignement de cellules cultivées sur ce type de substrat. La micro- ou nanostructuration de surfaces par lithographie permet d'obtenir des surfaces avec une topographie également capable d'induire l'alignement de cellules. Les cellules sont alors guidées par les canaux ou rainures tracés sur le matériau. Plusieurs équipes ont notamment étudié l'influence de la taille de ces canaux sur l'alignement et la prolifération cellulaires (Oakley and Brunette 1993). D'autre part, certaines modifications ont été apportées à l'électrofilage (technique utilisant un champ électrique pour tisser des fibres de polymères à partir d'une solution liquide) pour permettre d'aligner des fibres polymériques. Yang *et al.* ont ainsi développé une technique basée sur l'électrofilage (Yang *et al.* 2005), mais à la place d'un récepteur plat, ils ont utilisé une roue tournant à une vitesse donnée et permettant d'enrouler les fibres de polymères à la manière d'une pelote de fil. Les fibres sont alors alignées le long de l'axe d'enroulement.

Une autre technique consiste à appliquer un étirement cyclique (5 à 10% de la longueur au repos, nombre de répétitions donné) à des feuilles de PDMS. Les cellules s'alignent alors perpendiculairement à l'axe d'étirement après un certain temps (Mills *et al.* 1997). Lorsque l'étirement cyclique est arrêté, les cellules perdent l'alignement et s'orientent de nouveau aléatoirement. Cette technique ne permet donc pas de conserver l'alignement des cellules après suppression de la déformation (stimulus) mécanique en vue d'utilisations *in vivo*. Les applications potentielles de ce type de fonctionnalisation vont de l'étude des mécanismes de migration cellulaire à la reconstruction de tissus naturellement alignés dans un organisme vivant (tendons, cornée). Il est également possible d'étudier les phénomènes de

cicatrisation de tissus de la moelle épinière et du cerveau ainsi que la croissance des neurites (provenant des neurones) afin de favoriser la prolifération des neurones.

Cependant, la plupart des techniques employées actuellement ne permettent pas de fabriquer des matériaux à base de collagène directement implantables dans un environnement biologique. Or, il serait intéressant de recréer des systèmes mimant des architectures naturellement alignées pour les implanter *in vivo*. C'est pourquoi l'utilisation du collagène (surtout du collagène de type I), protéine majoritaire dans la structure d'un tendon par exemple, paraît essentielle. Il a été décrit que l'électrofilage pouvait endommager les molécules de collagène (Zeugolis *et al.* 2008). L'utilisation d'un fort champ magnétique est une technique lourde à mettre en œuvre. Il nous a donc paru opportun de mettre au point une technique simple permettant de conserver la structure fibrillaire tout en préservant les propriétés (bio)chimiques du collagène.

C'est au cœur de ces problématiques que se place ce travail de thèse. L'objectif étant de mettre en place une stratégie de fonctionnalisation de biomatériaux, notre attention s'est orientée vers les films multicouches à base de polyélectrolytes naturels : le collagène et l'alginate. Les films ainsi formés sont réticulés avec un agent naturel, la génipine (réticulant naturel d'origine végétal, *Gardénia Jasminoides*), pour être stables en conditions physiologiques. Ces films multicouches ont pour but de favoriser l'adhésion et la prolifération de différents types cellulaires. Ils peuvent être déposés sur des surfaces aux morphologies variables ce qui permet, par exemple, de fonctionnaliser des prothèses constituées de microbilles en titane.

A notre connaissance, l'alignement de matériaux fibrillaires induit par étirement d'un support en PDMS sur lequel est déposé un film multicouche composé de collagène et d'alginate, n'a fait l'objet d'aucune étude. Dans cette optique, nous avons exploité la mise au

point du système collagène/alginate. Ces films ont été déposés sur des supports élastiques en PDMS, étirés à l'aide d'une platine d'étirement manuelle fabriquée au laboratoire, puis réticulés avec la génipine. De plus, ces films peuvent être pelés puis déposés sur différents types de surfaces en conservant leurs propriétés mécaniques, chimiques et structurales ainsi que leur faculté à aligner les cellules. Il serait donc possible d'utiliser les films ou membranes multicouches collagène/alginate alignés pour la fonctionnalisation de biomatériaux ou comme supports pour l'étude, la fabrication ou la régénération de tissus tels que la cornée, les tendons ou d'autres tissus naturellement alignés.

La stratégie consistant à fonctionnaliser des surfaces de biomatériaux présente pourtant certaines limites au regard des enjeux actuels pour la reconstruction d'organes ou de certains tissus. En effet, cette stratégie permet de modifier ou d'améliorer l'intégration d'un implant dans un environnement biologique mais ne permet pas, à elle seule, de reconstruire un organe dans son intégrité. Pour cela, une autre stratégie a vu le jour à la fin des années 1980 : l'ingénierie tissulaire. Cette approche se situe à l'interface de l'ingénierie et des sciences de la vie afin de développer des substituts pour restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus biologiques (Langer and Vacanti 1993). La combinaison des connaissances en matériaux, (bio)polymères, culture cellulaire et mécanismes biologiques a permis d'offrir de nouvelles solutions pour une meilleure intégration des implants ou pour la reconstruction d'organes.

On pourrait ainsi imaginer un jour reconstituer *in vitro* ou *in vivo*, suivant une approche ascendante (bottom-up approach), un tendon ou une cornée par exemple à partir de films multicouches alignés par étirement et à base de collagène. Cela permettrait de mettre à profit la stratégie de fonctionnalisation de surfaces pour l'ingénierie tissulaire. Ceci étant, des

problématiques majeures restent à surmonter telles que reproduire la résistance mécanique du tissu, les structures histologiques et la stabilité du matériau à long terme.

La première partie du chapitre 1 fait le point sur les travaux réalisés en ingénierie tissulaire et en fonctionnalisation de matériaux. Dans la deuxième partie, nous décrivons les films multicouches de polyélectrolytes, notamment à base de collagène et leur utilisation pour la fonctionnalisation de biomatériaux. Dans la troisième partie sont exposées les différentes techniques utilisées pour aligner des fibres polymères et ainsi guider l'adhésion et la prolifération de cellules déposées sur ces surfaces structurées.

Dans le chapitre 2 sont décrits les méthodes, techniques et protocoles utilisés au cours de nos travaux. Nous développons particulièrement la technique d'étirement de films multicouches déposés sur des feuilles de PDMS, technique mise au point au laboratoire. Nous décrivons les étapes (culture cellulaire, ensemencement) des études biologiques réalisées sur les films COL/ALG. Nous détaillons aussi les techniques de caractérisation utilisées (microbalance à cristal de quartz, microscopie à force atomique) dans le cadre de nos investigations.

Dans le chapitre 3, nous abordons le nouveau système de films multicouches à base de collagène et d'alginate mis au point au cours de ce travail de thèse. Nous détaillons la construction, la stabilisation et la caractérisation de ces architectures. Nous donnons également les résultats obtenus quant à la morphologie, l'adhésion et la prolifération de cellules endothéliales humaines sur ces films. Dans la deuxième partie de ce même chapitre, nous montrons que des implants en microbilles de titane, destinés à la reconstruction de trachées, peuvent être recouverts par les films multicouches collagène/alginate.

Dans le chapitre 4, nous développons la méthode d'alignement des fibres de collagène élaborée au laboratoire. Nous montrons les résultats obtenus quant à la morphologie, l'adhésion et la prolifération de différents types cellulaires déposés sur les films collagène/alginate alignés. Nous soulignons aussi la possibilité de fabriquer des membranes auto-portées (détachées de leur support de fabrication) et que l'on peut déposer sur différents types de surfaces à visées biomédicales.

Enfin, nous présentons les conclusions générales et proposons des perspectives pour ces travaux.

Références bibliographiques

- Blodgett, K. B. and I. Langmuir (1937). "Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties." Physical Review **51**(11): 964-982.
- Cai, G., W. Lee, et al. (2009). "Modification of ion permeability utilizing pH-dependent selective swelling of polyelectrolyte multilayer films." J Nanosci Nanotechnol **9**(12): 7209-7214.
- Decher, G. (1997). "Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites." Science **277**(5330): 1232-1237.
- Decher, G., J. D. Hong, et al. (1992). "Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process .3. Consecutively Alternating Adsorption of Anionic and Cationic Polyelectrolytes on Charged Surfaces." Thin Solid Films **210**(1-2): 831-835.
- Decher, G., J. Maclellan, et al. (1992). "Creation and Structural Comparison of Ultrathin Film Assemblies - Transferred Freely Suspended Films and Langmuir-Blodgett-Films of Liquid-Crystals." Thin Solid Films **210**(1-2): 504-507.
- Hemmerle, J., V. Roucoules, et al. (2005). "Mechanically responsive films of variable hydrophobicity made of polyelectrolyte multilayers." Langmuir **21**(23): 10328-10331.
- Iler, R. K. (1966). "Multilayers of colloidal particles." Journal of Colloid and Interface Science **21**(6): 569-594.
- Johansson, J. Å., T. Halthur, et al. (2005). "Build-up of Collagen and Hyaluronic Acid Polyelectrolyte Multilayers." Biomacromolecules **6**(3): 1353-1359.
- Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue Engineering." Science **260**(5110): 920-926.
- Mhanna, R. F., J. Vörös, et al. (2011). "Layer-by-Layer Films Made from Extracellular Matrix Macromolecules on Silicone Substrates." Biomacromolecules **12**(3): 609-616.
- Mills, I., C. R. Cohen, et al. (1997). "Strain activation of bovine aortic smooth muscle cell proliferation and alignment: Study of strain dependency and the role of protein

kinase A and C signaling pathways." Journal of Cellular Physiology **170**(3): 228-234.

Mueller, R., K. Kohler, et al. (2005). "Melting of PDADMAC/PSS capsules investigated with AFM force spectroscopy." Macromolecules **38**(23): 9766-9771.

Noort, R. (1987). "Titanium: The implant material of today." Journal of Materials Science **22**(11): 3801-3811.

Oakley, C. and D. M. Brunette (1993). "The Sequence of Alignment of Microtubules, Focal Contacts and Actin-Filaments in Fibroblasts Spreading on Smooth and Grooved Titanium Substrata." Journal of Cell Science **106**: 343-354.

Simone, R. P. (2010). Epithelial morphogenesis and cell polarity in the drosophila embryo and larva. Ann Arbor, University of Pennsylvania. **3447171**: 110.

Weiss, P. (1934). "In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber." Journal of Experimental Zoology **68**(3): 393-448.

Yang, F., R. Murugan, et al. (2005). "Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering." Biomaterials **26**(15): 2603-2610.

Zeugolis, D. I., S. T. Khew, et al. (2008). "Electro-spinning of pure collagen nano-fibres - Just an expensive way to make gelatin?" Biomaterials **29**(15): 2293-2305.

1 Chapitre 1. Revue bibliographique

1.1. Bioingénierie et fonctionnalisation

1.1.1. Influence du substrat sur les fonctions cellulaires

1.1.2. Les biomatériaux

1.1.3. La fonctionnalisation par dépôt de revêtements

1.2. Les films multicouches de polyélectrolytes

1.2.1. Historique des films multicouches

1.2.2. Les polyélectrolytes naturels utilisés

1.2.3. Mécanisme de croissance des films

1.2.4. Stabilisation des films par réticulation

1.3. Alignement des fibres polymères et guidage cellulaire

1.3.1. Interactions des cellules avec leur substrat

1.3.2. Conditions nécessaires pour mimer des structures tissulaires alignées

1.3.3. Principales techniques utilisées

1.3.4. Etirement du revêtement collagène/alginate

L'ingénierie tissulaire est un domaine multidisciplinaire à la confluence de la biologie, de la science des matériaux et des disciplines technologiques. Son but est de développer des substituts biologiques permettant de restaurer, de maintenir ou encore d'améliorer des fonctions tissulaires. L'ingénierie tissulaire repose sur l'utilisation d'architectures ou de substituts temporaires à la surface ou à l'intérieur desquelles des cellules vont produire de la matrice extracellulaire, ce qui conditionne l'intégration d'un matériau dans un environnement biologique. Jusqu'à récemment, ces architectures étaient dites biocompatibles et pouvaient servir de substrats pour l'adhérence ou la prolifération cellulaires. Williams a défini l'ingénierie tissulaire comme « la création de nouveaux tissus pour la reconstruction thérapeutique du corps humain par la stimulation induite et contrôlée de cellules grâce à la combinaison de signaux moléculaires et mécaniques » (Williams 2006). La problématique actuelle n'est donc plus de proposer des systèmes à longue durée de vie, dits inertes, n'ayant presque pas d'interactions avec leur environnement biologique mais de promouvoir ou, mieux, de guider des interactions avec celui-ci.

Pour conférer à des implants inertes la bioactivité en plus de la biocompatibilité, il est possible de les fonctionnaliser en déposant un film à leur surface. La méthode couche par couche permet l'élaboration de films multicouches de polyélectrolytes particulièrement adaptés au recouvrement d'implants. Au début des années 1990, les travaux de Decher ont véritablement mis en valeur la méthode d'assemblage couche par couche, appliquée en particulier à des polymères chargés, ou polyélectrolytes (Decher and Hong 1991; Decher *et al.* 1992a; Decher *et al.* 1992b; Decher 1997). Depuis une dizaine d'années, ces assemblages supramoléculaires suscitent une attention particulière due à leur fort potentiel d'applications notamment en tant que revêtements d'implants, traitements de surface antireflets pour l'optique, systèmes de séparation de molécules et de nanofiltration, ou encore membranes à haute résistance mécanique.

La fonctionnalisation d'une surface, c'est-à-dire la modification de sa topographie et/ou de ses propriétés physico-chimiques de surface, permet dans certains cas d'aligner des cellules selon un axe et de guider la migration cellulaire. Weiss a introduit le terme de « guidage par contact » en 1934 (Weiss 1934). Depuis quelques années, plusieurs techniques telles que l'électrofilage (de l'anglais « electrospinning »), l'utilisation d'un champ magnétique ou la nano/micro structuration de surfaces ont émergé afin d'aligner un support fibrillaire et ainsi de guider différents types cellulaires déposés sur ces revêtements. Toutefois, il a été décrit que l'électrofilage pouvait endommager les molécules de collagène (Zeugolis *et al.* 2008). Il est donc souhaitable de mettre au point une technique simple permettant de conserver la structure fibrillaire tout en préservant les propriétés (bio)chimiques du collagène.

1.1 Bioingénierie et fonctionnalisation

1.1.1 Influence du substrat sur les fonctions cellulaires

1.1.1.1 Prolifération cellulaire

Le rôle que joue le substrat sur le comportement cellulaire a beaucoup été étudié et est maintenant bien connu (Lo *et al.* 2000; Karamichos *et al.* 2006; Dado and Levenberg 2009). Il a été mis en évidence que les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire mènent à deux mécanismes signalétiques concurrents :

- Le premier dépend des propriétés chimiques de la surface de la matrice extracellulaire ;
- Le deuxième dépend des stimuli mécaniques transmis par la matrice extracellulaire.

Les travaux de Discher *et al.* ont montré que le phénotype et la prolifération cellulaire étaient dépendants des propriétés mécaniques du substrat de la même manière qu'ils peuvent l'être au regard des interactions biochimiques (Discher *et al.* 2005). Ces études ont été menées sur différents types de substrats et plus particulièrement sur du poly(diméthyl siloxane) (PDMS) recouvert de collagène et sur des gels de polyacrylamide (Wang and Pelham 1998). Une étude portant sur des architectures à base de hyaluronane et de fibronectine a montré que des fibroblastes humains (provenant du derme) cultivés sur des substrats plus durs avaient, entre autres caractéristiques, un cytosquelette d'actine très organisé et étiré, et proliféraient uniquement sur les substrats durs (Ghosh *et al.* 2007).

Le collagène est la protéine la plus abondante dans la matrice extracellulaire. Ainsi, les matériaux à base de collagène pourraient être des supports adaptés à l'étude des mécanismes cellulaires et à l'intégration de biomatériaux ou à la fonctionnalisation de biomatériaux placés dans un environnement biologique.

1.1.1.2 Migration cellulaire

Comprendre les mécanismes qui guident les cellules apporterait des réponses dans l'étude des interactions cellules-substrats ou de l'élaboration d'architectures biomimétiques, ou encore dans l'ingénierie tissulaire. Il a déjà été établi que le mouvement directionnel des cellules joue un rôle majeur au cours de la cicatrisation, du développement des tumeurs et dans le développement des tissus (Noden 1991). Les cellules peuvent d'une part migrer préférentiellement selon un axe sous l'effet d'un gradient d'agent chimique, d'autre part, être guidées par une modification de la dureté du substrat, des fonctions chimiques ou de la topographie du matériau (Wallingford *et al.* 2002).

1.1.1.3 Intégration d'un implant

Plusieurs études sur l'intégration d'un matériau se sont portées, par exemple, sur la réparation et l'ingénierie de cartilage fibreux (Spalazzi *et al.* 2006). D'autres études ont exploré la migration de fibroblastes dans la peau et les tendons (Marenzana *et al.* 2007). Les forces d'adhésion entre les cellules et la surface sur laquelle elles sont déposées ont alors été mises en relation avec le dépôt de collagène (Gobin *et al.* 2006) et la durée des cultures cellulaires (Obradovic *et al.* 2001; Marenzana *et al.* 2007; Scotti *et al.* 2007). La migration cellulaire a été identifiée comme le phénomène majeur lors de l'intégration d'un matériau (Gobin *et al.* 2006; Marenzana *et al.* 2007). Le manque de contrôle de certains paramètres essentiels tels que l'organisation de la structure à l'interface, la densité cellulaire, et la dureté du substrat rendaient l'identification des mécanismes cellulaires difficiles. L'ingénierie tissulaire apporte certaines réponses à ces problématiques, puisqu'elle permet de construire des architectures ayant des propriétés mécaniques, physiques et chimiques déterminées ainsi que des propriétés de dégradation adaptables.

La dureté du substrat est un facteur important qui permet d'agir sur la migration cellulaire, la prolifération cellulaire et le dépôt de collagène (Gray *et al.* 2003; Discher *et al.* 2005; Ghosh *et al.* 2007; Dado and Levenberg 2009). En fait, il a été suggéré que l'étude des effets de la dureté du substrat pouvait constituer une méthode utile pour comprendre les phénomènes mis en jeu au cours de la réparation du cartilage. Comme les cellules produisent de la matrice extracellulaire (riche en collagène) à l'interface avec le substrat, la densité et la dureté de la matrice augmentent. L'augmentation de la dureté de la matrice extracellulaire pourrait, dans ce cas, influencer le processus d'intégration en modifiant les fonctions cellulaires aux interfaces (Dado and Levenberg 2009). La possibilité de contrôler la dureté

d'un substrat à l'interface avec son environnement, et de ce fait la réponse cellulaire, permettrait de moduler ou optimiser l'intégration d'un matériau.

La modification de la topographie ou des fonctions chimiques d'une surface telle que celle des implants en titane conduisent, dans certains cas, à l'augmentation de la quantité de protéines adsorbées et ainsi à l'amélioration de l'attachement cellulaire (Aita *et al.* 2009). Il est également possible de greffer des protéines ou peptides sur ces surfaces afin de favoriser l'adhésion et la prolifération de fibroblastes gingivaux et de cellules épithéliales (Zhao *et al.* 2005). Le greffage de collagène de type I sur des surfaces de titane a permis d'améliorer la croissance de l'os et les interactions avec l'implant (Morra *et al.* 2003).

Il est toutefois difficile de caractériser avec précision l'influence de la topographie ou des interactions chimiques sur le comportement cellulaire. Britland *et al.* ont étudié le comportement cellulaire sur des substrats nanostructurés et modifiés chimiquement (Britland *et al.* 1996). Ils ont montré que l'influence des modifications chimiques était plus importante que celle de la topographie. Les travaux d'Anselme *et al.* ont montré, quant à eux, que la prolifération cellulaire était dépendante de l'adhésion cellulaire à court et à long termes (Bigerelle *et al.* 2002; Bigerelle and Anselme 2005; Anselme and Bigerelle 2006a; Anselme and Bigerelle 2006b). Des travaux sur le comportement d'ostéoblastes ont permis de montrer que l'adhésion à court terme était influencée par la présence d'un revêtement sur la surface. Ces travaux soulignent également que l'adhésion à long terme de ces cellules était fortement liée à la topographie de la surface.

1.1.2 Les biomatériaux

Un biomatériau est un dispositif destiné à améliorer les propriétés d'un organe, à remplacer un organe ou à remplacer/créer une fonction déficiente dans un organisme vivant. De nombreux matériaux existent déjà tels que les valves cardiaques, les stimulateurs cardiaques, les prothèses orthopédiques ou encore les lentilles de contact (liste non exhaustive). D'autres, plus ambitieux encore, sont en développement ou ont été récemment mis sur le marché ; c'est le cas des peaux artificielles.

Le titane et les alliages à base de titane sont employés dans le domaine des implants depuis la fin des années 1940, mais ce n'est que depuis les années 1980 que leur intérêt a cru fortement (Vannoort 1987). Le titane possède une excellente résistance à la corrosion en milieu biologique et est biocompatible. Cela est dû à sa passivation par la formation d'une couche de protection, constituée majoritairement de dioxyde de titane (TiO_2) à la surface du matériau par corrosion. Cette couche permet ainsi de ralentir une éventuelle dégradation de la surface par l'environnement biologique par exemple. Ces caractéristiques ont permis de développer de nombreuses applications dans le domaine biomédical telles que les prothèses de hanches ou les implants dentaires (Figure 1.1).



Figure 1.1 : Exemple d'implant dentaire en titane, utilisé pour la pose d'une prothèse fixe.

La particularité des implants est qu'ils sont en contact direct avec des tissus vivants. Les mécanismes mis en jeu à l'interface entre substrat et environnement biologique sont donc cruciaux. Ils vont déterminer le mode d'intégration de l'implant à court terme et à long terme. Il a été démontré que le titane est un métal inerte physiologiquement et n'est pas cytotoxique (Okazaki *et al.* 1998). Toutefois, pour l'ingénierie tissulaire, il est utile de modifier le comportement d'intégration de ce matériau. A l'aide de différentes méthodes (modifications physiques ou chimiques des surfaces) développées récemment, il est ainsi possible de conférer une bioactivité à ce matériau. Cela veut dire que des matériaux modifiés, inertes à l'origine, ont des interactions avec leur environnement biologique.

De manière générale, des traitements de surface tels que la lithographie, le traitement par UV, le traitement plasma, l'électrochimie par oxydation permettent de changer les propriétés chimiques et physiques de la surface pour modifier l'intégration de ces matériaux. Afin d'améliorer les interactions entre l'implant et l'environnement biologique, en l'occurrence le tissu osseux, il est possible, par exemple, de former des pores en surface (Bobyne *et al.* 1980). La présence de ces pores en surface améliore le développement de tissu osseux comparé à une surface plane. Bobyne *et al.* ont pu optimiser la taille des pores formés à la surface pour améliorer l'intégration d'implants en alliage métallique à base de cobalt. Cela indique encore que la topographie de la surface des implants joue un rôle prépondérant pour l'intégration de ces matériaux dans un environnement biologique. Toutefois, la modification de la structure d'un matériau peut entraîner la fragilisation de sa tenue mécanique. Ainsi, Zou *et al.* ont montré la diminution du module d'Young avec l'augmentation de la porosité de matériaux à base de titane (Zou *et al.* 2008).

Depuis quelques années, une autre stratégie consistant à fonctionnaliser les implants par des dépôts de films, gels ou mousses a émergé. Ces revêtements ont pour but de conserver l'intégrité du matériau utilisé pour l'implant (préservation de la résistance mécanique), de guider l'orientation cellulaire, voire de contrôler les interactions avec l'environnement biologique, par exemple pour favoriser la prolifération cellulaire.

1.1.3 La fonctionnalisation par dépôt de revêtements multicouches

La grande variété de paramètres ajustables (nature des polyélectrolytes, épaisseur, propriétés physiques et chimiques, etc.) permet d'utiliser les films multicouches de polyélectrolytes comme revêtements de surface pour la fonctionnalisation de matériaux.

Des études ont montré la possibilité de construire des films multicouches antiadhésifs ou antibactériens pour la fonctionnalisation de matériaux. Pour cela, Boulmedais *et al.* ont étudié des films poly(L-lysine) (PLL)/poly(acide glutamique) (PGA). Du poly(éthylène glycol) (PEG) a été greffé chimiquement sur des chaînes de PGA. A la fin de la construction des films PLL/PGA, ces auteurs ont déposé quelques paires de couches de PLL/PGA-(greffé PEG). De telles surfaces permettent une réduction de l'adhésion de bactéries *Escherichia coli* (Boulmedais *et al.* 2004).

Un autre avantage des films multicouches est qu'il est possible d'y intégrer des agents thérapeutiques pour ajouter un effet sur l'environnement biologique. Plusieurs paramètres peuvent être contrôlés afin de stimuler la libération de ces agents. Ces paramètres sont par exemple, le pH, la température, la force ionique ou encore un stimulus mécanique. Crouzier *et al.* ont étudié l'absorption et la libération de facteurs de croissance dans des films PLL/HA-héparine (Crouzier *et al.* 2010). D'autres travaux portant sur des films multicouches poly(N-isopropylacrylamide-co-acide acrylique) (pNIPAm-AAc)/PAH ont montré que la libération

d'un agent anticancéreux était favorisée par l'augmentation de la température (Serpe *et al.* 2005).

Les films multicouches de polyélectrolytes peuvent également être déposés sur des implants en titane. Cai *et al.* ont déposé des films multicouches chitosane/gélatine sur des supports en titane afin d'améliorer leur ostéointégration. Les études biologiques d'adhésion, prolifération et viabilité ont montré que les surfaces ainsi fonctionnalisées amélioraient les interactions cellules/cellules et cellules/substrat (Cai *et al.* 2005).

Enfin, les films multicouches peuvent servir à favoriser l'adhésion ou la prolifération cellulaire. Wang *et al.* ont déposé des films multicouches composés d'héparine, d'un facteur de croissance (VEGF) et de fibronectine sur des substrats en titane (Wang *et al.* 2013). Ils ont montré que des cellules déposées sur les substrats en titane fonctionnalisés avec les films multicouches adhéraient et proliféraient mieux que sur les substrats en titane seul. Des films multicouches déposés sur des implants en titane pourraient donc conférer aux implants une certaine bioactivité en plus de la biocompatibilité.

1.2 Les films multicouches de polyélectrolytes

Les polyélectrolytes sont des polymères (synthétiques ou naturels) comportant des fonctions ioniques. Ces groupements se dissocient en solution aqueuse et conduisent à la formation de polymères chargés, soit positivement soit négativement. Les propriétés des polyélectrolytes combinent donc les propriétés d'électrolytes et de polymères. Ces macromolécules chargées jouent un rôle fondamental dans la stabilisation ainsi que dans la détermination des structures et des interactions d'assemblages moléculaires. Dans le but de fonctionnaliser des matériaux, plus particulièrement en vue d'applications biomédicales, des

polyélectrolytes naturels peuvent être utilisés. Beaucoup de macromolécules biologiques sont des polyélectrolytes tels que les polypeptides, les glycosaminoglycanes et l'ADN.

Depuis une vingtaine d'années, les polyélectrolytes ont été utilisés pour former de nouvelles architectures communément appelées multicouches de polyélectrolytes. Les dépôts sont généralement réalisés par trempage (Decher 1997), par centrifugation (Lee *et al.* 2001) ou encore par pulvérisation (Schlenoff *et al.* 2000).

Les films multicouches de polyélectrolytes (PEM) possèdent l'avantage de pouvoir être déposés sur des surfaces aux formes variées (planes, sphériques, cylindriques, etc.) et d'être préparés sous la forme de solutions aqueuses. Les applications sont nombreuses. Parmi celles-ci, les applications dans le domaine biomédical ont une place prépondérante. En effet, la littérature nous indique que les PEM sont beaucoup utilisés pour la fonctionnalisation d'implants en tant que revêtements permettant, par exemple, de favoriser la prolifération cellulaire (Wang *et al.* 2013), la libération de médicaments (Crouzier *et al.* 2010) ou encore pour produire des surfaces anti-bactériennes (Boulmedais *et al.* 2004).

1.2.1 Historique des films multicouches

Au début du XX^e siècle, Irving Langmuir et Katherine Blodgett ont décrit la possibilité d'obtenir des films minces nano-structurés. Ces films communément appelés films de « Langmuir-Blodgett » (LB) se présentent sous la forme d'une monocouche obtenue par dépôt de molécules tensioactives ou amphiphiles à une interface air/eau. Cette monocouche est ensuite transférée sur un support solide par trempage (Blodgett and Langmuir 1937).

Dans les années 1980, d'autres méthodes d'auto-assemblage ont été développées pour former des films organiques structurés. Ainsi, la chimie de coordination des systèmes

métal/phosphonate (Guang *et al.* 1992) et la chimie covalente (Netzer and Sagiv 1983) ont constitué les premières alternatives à la technique LB. Un autre concept d'élaboration de films nanostructurés basé sur les interactions électrostatiques a été décrit dès 1966 par Iler (Iler 1966). Cette approche simple consistait à utiliser des particules colloïdales anioniques et cationiques interagissant via des forces électrostatiques pour créer des films multicouches. Ce concept est tombé dans l'oubli, sans doute à cause du manque de techniques expérimentales nécessaires pour caractériser ces assemblages. Par ailleurs, il était admis que le dépôt de substances de charges opposées s'arrêtait dès que les charges des espèces cationiques avaient exactement compensé celles des espèces anioniques ou l'inverse. Au début des années 80, des publications font état de travaux appliquant ce concept à l'adsorption de protéines (Fromherz and Arden 1980; Golander *et al.* 1982). Au début des années 1990, les travaux de Decher ont véritablement mis en valeur la méthode d'assemblage couche par couche, appliquée en particulier à des polyélectrolytes (Decher *et al.* 1992a; Decher *et al.* 1992b; Decher 1997).

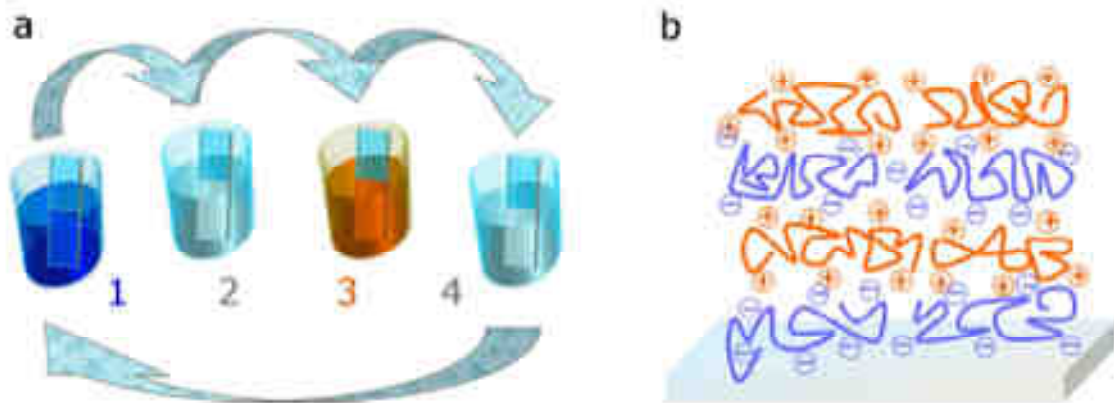


Figure 1.2 : a) Principe de la méthode de construction de films multicouches de polyélectrolytes. Les étapes 1 et 3 correspondent à l'adsorption des polyanions et des polycations respectivement sur un substrat (ici chargé positivement en surface). Les étapes 2 et 4 correspondent à l'étape de rinçage qui suit l'adsorption d'un type de polyélectrolyte. Ces quatre étapes représentent la séquence de base pour le dépôt d'une paire de couches. La répétition de cette séquence permet d'obtenir le nombre de paires de couches souhaité. b) Schéma simplifié à l'échelle moléculaire d'un film multicouche constitué de deux paires de couches (Decher 1997).

La technique couche par couche (LbL, layer-by-layer) appliquée aux polyélectrolytes conduit à la formation de films appelés multicouches de polyélectrolytes, présentant une architecture nano ou microstructurée (Figure 1.2).

1.2.2 Les polyélectrolytes naturels utilisés

1.2.2.1 Collagène

Les collagènes forment une famille de protéines constituant les tissus conjonctifs dans le règne animal. Il s'agit des protéines les plus abondantes dans l'organisme humain, représentant le quart de la masse protéique. Ces molécules sont secrétées par les cellules des tissus conjonctifs. Le « collagène » est en réalité un terme général pour définir des protéines composées de trois chaînes polypeptidiques associées qui s'organisent en hélice (Wyckoff *et al.* 1935; Rich and Crick 1955; Ramachandran 1956). Il n'existe pas moins d'une vingtaine de types de collagène. Chaque type de collagène possède une structure propre et se retrouve dans des organes particuliers. Par exemple, le collagène de type I intervient dans la formation de la peau, des tendons, des os et de la cornée, tandis que le type III se retrouve au niveau du système cardiovasculaire. Il existe parmi tous ces types des collagènes fibrillaires, non fibrillaires et transmembranaires. Au cours de ce travail de thèse, nous nous intéresserons uniquement au collagène de type I, qui est un collagène fibrillaire. Ces protéines ont pour fonction de conférer aux tissus une résistance mécanique à l'étirement. Le collagène est notamment indispensable aux processus de cicatrisation. Contrairement à l'élastine présente aussi dans les tissus conjonctifs, le collagène est inextensible et résiste bien à la traction. Le collagène s'organise suivant quatre types de structures.

- Structure primaire :

Le collagène comporte essentiellement des résidus de glycine, de proline et d'hydroxyproline, et possède entre 1050 et 1060 acides aminés. Les chaînes polypeptidiques des collagènes fibrillaires sont composées dans leur région centrale d'une succession de triplets G-X-Y (en général proline en position X et hydroxyproline en position Y). Des domaines terminaux beaucoup plus courts et de composition différente y sont accolés (Hulmes *et al.* 1973). D'un point de vue industriel et économique, il faut noter que le collagène constitue la matière première permettant la production de gélatine.

- Structure secondaire :

La molécule de collagène est une chaîne polypeptidique qui a la forme d'une hélice de type gauche étirée. Cette hélice est stabilisée par la teneur élevée en amino-acides. Les mécanismes de conformation ont été décrits par Ottani *et al.*. Cette hélice est généralement nommée hélice α .

- Structure tertiaire :

La structure tertiaire correspond à la molécule de tropocollagène. Les travaux de Ramachandran *et al.* ont permis de montrer que trois chaînes en hélice α s'enroulent en une superhélice droite pour former la molécule de tropocollagène ou triple hélice (Davison 1969). Ce sont les liaisons hydrogènes entre les chaînes qui assurent la stabilité de la triple hélice.

- Structure quaternaire :

Les molécules de tropocollagène s'assemblent pour former les fibrilles de collagène. Les fibrilles ont en moyenne un diamètre d'environ 50 nm. Ces fibrilles peuvent s'agréger et former des fibrilles de plus gros diamètre (environ 500 nm). Enfin, les fibrilles peuvent former des fibres de collagène, avec un diamètre variant de 1 à 10 μm (Traub 1981).

Le collagène a beaucoup été utilisé sous diverses formes telles que des hydrogels, mousses ou films multicouches de polyélectrolytes dans le domaine des biomatériaux (Zhang *et al.* 2005; Kopecek 2007). L'historique de son utilisation (biocompatibilité) prouve qu'il est judicieux de fabriquer des matériaux ou surfaces basés sur cette molécule pour l'ingénierie tissulaire. Il existe deux stratégies d'utilisation du collagène dans les biomatériaux :

- Une approche descendante : à partir d'une matrice complexe riche en collagène qui ressemble à l'architecture désirée où les cellules sont retirées (Qiu *et al.* 2012) ;
- Une approche ascendante : à partir de molécules de collagène que l'on assemble pour former une architecture (Oh *et al.* 2012).

Tandis que l'approche descendante tend à simplifier la complexité d'un tissu biologique, l'approche ascendante permet d'élaborer des architectures complexes.

1.2.2.2 Alginate de sodium

Les alginates représentent l'ensemble des polysaccharides appartenant à la famille des copolymères, constitués des résidus de l'acide D-mannuronique et de l'acide L-guluronique, dans des proportions et des arrangements séquentiels différents. L'alginate de sodium est un polysaccharide linéaire, polyanionique, naturel, extrait des algues brunes. A l'échelle industrielle, il est essentiellement issu de certaines espèces d'algues brunes : *Macrocystis pyrifera* aux Etats-Unis, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* ou encore *Ascophyllum nodosum* en Europe. L'alginate est le polysaccharide le plus abondant de ces organismes, constituant plus de 40% de leur poids sec.

L'alginate de sodium est utilisé comme gélifiant dans un vaste domaine d'applications industrielles. Il est également utilisé dans l'industrie agroalimentaire. Il est fréquemment employé pour l'encapsulation de cellules ou d'enzymes (Elçin 1995).

1.2.3 Mécanismes de croissance des films

Dans les films multicouches de polyélectrolytes, un type de polyélectrolytes (anionique ou cationique) interagit avec l'autre type de polyélectrolytes de charge opposée constituant la surface externe du film (Decher 1997). Le système poly(allylamine hydrochloride)/poly(styrène sulfonate) (PAH/PSS) en est sans doute l'exemple le plus largement étudié. Ce type de film est caractérisé par une augmentation de son épaisseur constante pour chaque paire de couches déposée et est donc dénommé "film à croissance linéaire". Des analyses réalisées par réflexion de RX et neutrons aux petits angles ont montré que ces films sont pseudo-stratifiés, c'est-à-dire qu'ils présentent une interpénétration partielle entre les couches adjacentes (Schmitt *et al.* 1993; Decher *et al.* 1994; Decher 1997; Decher *et al.* 1997). Plusieurs paramètres caractérisant ces films à croissance linéaire peuvent être contrôlés tels que l'épaisseur, la densité et la structure. Par exemple, le choix de différents polycations et polyanions, faibles ou forts, permet de moduler l'épaisseur des films, de même que la variation de la force ionique ou du pH des solutions de polyélectrolytes. En effet, la conformation des polyélectrolytes dépend du taux de sel en solution : à faible concentration, il existe une grande longueur de persistance en raison des répulsions entre les charges du polyélectrolyte alors qu'à forte concentration, l'écrantage des charges lui confère une conformation plus repliée. L'épaisseur des films formés à fort taux de sel est donc plus grande, jusqu'à atteindre une force ionique critique au-delà de laquelle les interactions électrostatiques sont complètement écrantées.

En augmentant le taux de sel en solution, certains auteurs ont observé une croissance plus rapide que la croissance linéaire, qu'ils ont appelée « super linéaire » (Ruths *et al.* 2000; McAloney *et al.* 2001). Ils ont relié cette augmentation d'épaisseur à une augmentation de la rugosité du film. En effet, l'augmentation de la rugosité entraîne une augmentation de l'aire de la surface d'adsorption et, par conséquent, de la quantité de matière pouvant être déposée. D'autres études portant sur des polyélectrolytes de type polypeptides et polysaccharides ont mis en évidence une croissance exponentielle de l'épaisseur. En 1999, Elbert *et al.* (Elbert *et al.* 1999) ont montré que le système poly(L-lysine) (PLL)/alginate (ALG) présentait une croissance exponentielle et l'épaisseur mesurée à sec atteignait 150 nm après le dépôt de 15 paires de couches. Ils ont attribué la croissance du film à la présence de complexes formés progressivement au cours du dépôt des couches. Par la suite, d'autres films à croissance exponentielle ont été mis en évidence par Lavallo *et al.* : des films construits à base de polypeptides comme les systèmes (PLL)/poly(acide L-glutamique) (PGA) (Lavallo *et al.* 2002) et à base d'un polypeptide et d'un polysaccharide, PLL/Hyaluronane (HA) (Picart *et al.* 2001) en sont deux exemples types. L'épaisseur des films peut atteindre un à plusieurs micromètres après dépôt d'une vingtaine de paires de couches. Ces épaisseurs permettent d'utiliser la microscopie confocale pour visualiser la structuration en z du film après marquage fluorescent d'un des polyélectrolytes.

1.2.4 Stabilisation des films par réticulation

Certains films multicouches sont très fragiles et peu résistants à des changements de pH, de solvant ou de force ionique. De plus, il paraît possible de moduler certaines propriétés des films multicouches par réticulation, telles que leur perméabilité (Dai and Möhwald 2002) ou leurs propriétés mécaniques (Francius *et al.* 2006). Ainsi, plusieurs travaux ont porté sur

les procédés de réticulation des films multicouches en vue de changer leurs propriétés physico-chimiques (Tableau 1.1).

Techniques de réticulation		Avantages	Inconvénients	Références
Par voie chimique	Glutaraldéhyde	Efficace, très répandu	Risques de toxicité (calcification...) pH	(Schuetz and Caruso 2003; Richert <i>et al.</i> 2004)
	Carbodiimides : EDC-(sulfoNHS)	Moins toxique que les aldéhydes	Cytotoxique	(Francius <i>et al.</i> 2006)
	Génipine	Non toxique	Solubilisation (DMSO : TMP)	(Johansson <i>et al.</i> 2005b; Hillberg <i>et al.</i> 2009)
Par voie thermique : DHT (dehydration treatment)		Pas de réactifs supplémentaires	Trop haute température	(Chen <i>et al.</i> 1999) (Vuillaume <i>et al.</i> 2002)
Par voie photo-chimique	Films contenant une diazoresine (polycation réactif à l'UV) et du PSS, réaction entre les groupes N^{2+} et SO^{3-}	Contrôle spatial de la réticulation avec possibilité de motifs réalisés avec des masques	Modification chimique requise des polymères	(Chen <i>et al.</i> 1999)
	Poly(diallylammonium) couplé à un groupement styrène sensible à 254 nm et laponite		Fabrication dans le DMSO	(Vuillaume <i>et al.</i> 2002)

Tableau 1.1 : Récapitulatif des différents agents réticulants pouvant être utilisés.

Les procédés de réticulation peuvent être répartis en trois catégories :

- La réticulation chimique utilise un agent réticulant en vue de réaliser des ponts chimiques entre les groupements chimiques des polyélectrolytes. Selon l'agent de couplage, les groupements réactifs ne sont pas les mêmes. Ainsi, le glutaraldéhyde, qui réagit uniquement avec des fonctions amines, a été utilisé pour réticuler des films à base d'héparine et d'albumine (Brynda and Houska, 1996). Cependant, pour des applications biomédicales, ce produit peut se révéler toxique. Les carbodiimides permettent la formation de liaisons amides entre les groupements acide carboxylique et amine (Schuetz and Caruso 2003). Les carbodiimides sont moins toxiques que le glutaraldéhyde. Cependant, ils doivent être complètement éliminés avant toute utilisation du film dans le domaine des biomatériaux. Plusieurs équipes (Mi *et al.* 2005; Hillberg *et al.* 2009) ont proposé un mécanisme de réaction chimique entre la génipine et les groupements amines du chitosane ou du collagène (Figure 1.3). La génipine, d'origine végétale (*Gardenia Jasminoïde*), est maintenant connue pour être un agent réticulant efficace et non cytotoxique. Elle peut également être utilisée comme agent de régulation lors de l'administration de médicaments ou encore comme composé de base pour la préparation de pigments bleus. La police scientifique s'intéresse d'ailleurs à ses propriétés de coloration bleue (après réaction chimique) pour le relevé d'empreintes digitales. Le mécanisme de réaction chimique entre la génipine et les fonctions amines du collagène n'est à ce jour pas encore parfaitement déterminé. La génipine formerait des ponts entre les chaînes de protéines. Ces ponts pourraient faire intervenir une ou plusieurs molécules de génipine.

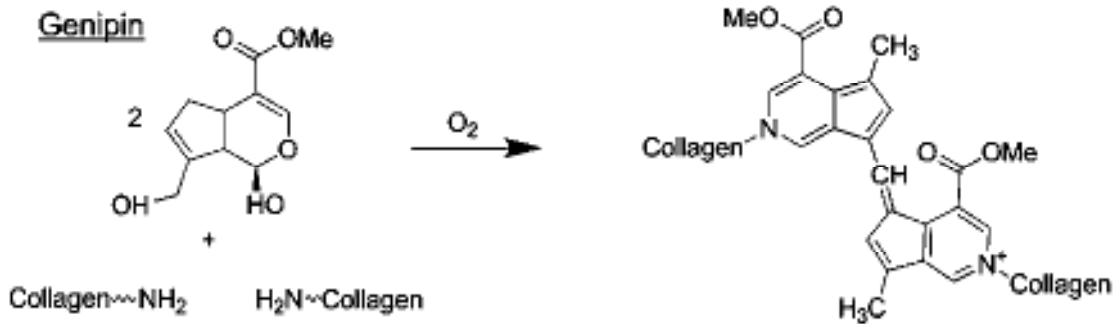


Figure 1.3 : Schéma de principe du mécanisme de réaction de la génipine avec le collagène (Hillberg *et al.* 2009).

- La réticulation thermique, qui consiste à placer le film à haute température (~ 100 °C, à l'étuve) pendant une certaine durée : elle peut être appliquée à des polyélectrolytes contenant des groupements amines et imines, qui en réagissant avec des groupements carboxyliques vont former des liaisons amides ou imides, respectivement (Lee and Kunitake 1994; Harris *et al.* 1999). Cette technique est difficile à appliquer lorsque des protéines sont incluses dans le film. En effet, les protéines peuvent être dénaturées à haute température.

- La photo-réticulation fait intervenir un agent photo-sensible qui est soit incorporé dans le film soit couplé à un des polyélectrolytes. Dans ce cas, le film est réticulé lorsque l'agent est irradié à une longueur d'onde précise (Chen *et al.* 1999; Vuillaume *et al.* 2002). Ce type de réticulation permet d'envisager la réalisation de motifs gravés en utilisant des masques.

1.3 Alignement de fibres polymères et guidage cellulaire

Les échafaudages de biomatériaux jouent un rôle majeur pour guider la régénération tissulaire en tant que supports temporaires mimant la matrice extracellulaire. Comprendre

comment les propriétés physico-chimiques ou l'architecture d'un échafaudage influencent les fonctions cellulaires et la régénération de tissus constitue un défi de première importance. Ces connaissances pourraient faciliter le développement d'architectures aux propriétés physiques, chimiques et biologiques parfaitement contrôlées. Cette partie expose les stratégies actuelles utilisées pour contrôler la topographie (échelle micro ou nanométrique) ainsi que les comportements biologiques. Les architectures, en vue d'applications en ingénierie tissulaire, peuvent être préparées par plusieurs méthodes telles que l'électrofilage, l'utilisation d'un champ magnétique ou encore par micro ou nanostructuration de surfaces. Ces méthodes permettent d'aligner des fibres de polymères (synthétiques et naturels) et les cellules déposées sur ces mêmes surfaces.

1.3.1 Interactions des cellules avec leur substrat

Fabriquer des objets capables de mimer des tissus naturellement alignés dans un organisme vivant constitue un défi de taille depuis des années. Le guidage par contact de cellules joue un rôle dans beaucoup de processus physiologiques. Le mouvement d'une cellule dû au guidage par contact est dit directionnel, sachant que la probabilité qu'une cellule migre dans cette direction est la plus forte. Cette direction est fortement liée à l'anisotropie chimique, structurale ou mécanique du substrat (Dunn and Ebdal 1978). L'exemple le plus probant met en jeu la migration bi-directionnelle de cellules le long de fibres orientées de la matrice extracellulaire. La littérature nous indique que le guidage par contact est un mécanisme important pour la morphogénèse, où les forces de traction appliquées par les cellules sur le substrat génèrent l'orientation des fibres, ce qui entraîne l'orientation de leur migration (Stopak and Harris 1982). Le guidage par contact est également impliqué dans

plusieurs processus homéostatiques tels que la cicatrisation (Katz and Lasek 1980), où la rétraction des caillots de fibrine par les plaquettes et la contraction de la plaie par les fibroblastes peut entraîner l'orientation radiale des fibres de la matrice extracellulaire et de ce fait guider les cellules jusqu'à la plaie (Lackie and Lawrence 1986).

Bien qu'il y ait eu des études réalisées sur le guidage par contact de cellules déposées sur des surfaces orientées par différentes techniques, il reste à développer une technique simple et rapide, permettant d'élaborer des revêtements entièrement naturels, biocompatibles et implantables conduisant au guidage de différents types cellulaires.

1.3.1.1 Matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire est un ensemble complexe composé de protéines d'adhésion (fibronectine, laminine), de protéines de structure (collagène, élastine), d'eau, d'ions et de petites molécules solubilisées (sucres, oligopeptides, etc.). Cette matrice comble les espaces entre les cellules (espace extracellulaire) et possède plusieurs fonctions [Wang et al. 2006] :

- favoriser l'association des cellules pour former un tissu cohérent
- permettre les divisions et la différenciation cellulaires
- contrôler la mobilité cellulaire
- assurer la résistance mécanique dans certains tissus comme les os, les parois des artères, les tendons et les ligaments.

La teneur et la composition de la matrice extracellulaire dépendent de la nature du tissu (Sanes *et al.* 1990; Sechler *et al.* 1998). La matrice peut être soit liquide, soit gélatineuse,

soit rigide. Les propriétés fonctionnelles, morphologiques et biologiques sont propres à chaque tissu. Les paramètres influençant ces propriétés sont : la nature des cellules, la composition de la matrice extracellulaire et la proportion cellules/matrice extracellulaire. Quatre grandes familles de tissus peuvent ainsi être distinguées : les tissus épithéliaux, musculaires, nerveux et conjonctifs.

1.3.1.2 Tissus conjonctifs

Il existe plusieurs types de tissus conjonctifs dont les tissus muqueux (exemple : paroi de l'appareil respiratoire), lâche (exemple : derme), dense (exemple : tendons) et élastique (exemple : trachée). Les proportions en élastine et en collagène, composants majoritaires des tissus conjonctifs, permettent de les distinguer. Parmi ceux-ci, les tissus conjonctifs denses sont riches en fibres et pauvres en cellules. Ils ont essentiellement une fonction mécanique et peuvent être séparés en deux groupes : les tissus fibreux non-orientés et les tissus fibreux orientés. Nous nous intéresserons particulièrement aux tissus fibreux orientés au cours de la deuxième partie de ce travail. Ces tissus peuvent être répartis en deux sous-groupes :

- Les tissus fibreux unitendus tels que les ligaments ou les tendons. Les fibres (en majorité des fibres de collagène) forment des faisceaux parallèles. Les cellules sont peu nombreuses et sont alignées selon l'axe d'alignement des fibres.
- Les tissus fibreux bitendus tels que le stroma de la cornée (majeure partie de l'épaisseur la cornée ~ 400 nm) ou les aponévroses (membrane recouvrant et séparant les muscles en loges musculaires). Les fibres, en partie de collagène, sont organisées en lames, c'est-à-dire en couches superposées d'orientations différentes. Par exemple,

dans la cornée, l'orientation de la première lame est orientée à 0°, la deuxième lame est orientée à 90°.

Dans les tissus naturels, la matrice extracellulaire apporte les propriétés chimiques, physiques ou topographiques nécessaires à l'expression des fonctions cellulaires. Ces différents facteurs se combinent aux signaux cellulaires pour déclencher des mécanismes tels que l'expression de protéines, la différenciation cellulaire et l'apoptose des cellules. Jusqu'à présent, les technologies d'ingénierie n'ont pas permis de mimer le degré de complexité de la matrice extracellulaire, mais de grandes avancées ont été réalisées afin d'étudier l'influence d'architectures nanostructurées sur les comportements cellulaires à l'échelle micrométrique et sur la régénération de tissus.

- Les cellules :

Les cellules mésenchymateuses et les fibroblastes sont les cellules les plus présentes dans le tissu conjonctif. Les cellules mésenchymateuses sont peu différenciées et ont toutes la même morphologie au stade de l'embryon. Cependant, leur destinée au cours du développement peut varier. En effet, certaines pourront se différencier en fibroblastes, d'autres en cellules du tissu conjonctif de différents types (chondroblastes, ostéoblastes, etc.). Ces cellules sont déterminées puis se différencient sous l'influence d'éléments extérieurs spécifiques, comme par exemple des facteurs de croissance mais aussi l'orientation ou la dureté du substrat (Discher *et al.* 2005).

Les fibroblastes sont les cellules les plus fréquentes dans un tissu conjonctif adulte non spécialisé. Les fibroblastes sont fusiformes et leur noyau est allongé dans l'axe de la cellule. Ces cellules ont deux fonctions. D'une part, elles synthétisent et sécrètent les fibres et la

substance fondamentale (cf. 1.3.1.3 ci-dessous) du tissu conjonctif, d'autre part, elles produisent les enzymes indispensables à la dégradation des protéines présentes dans la matrice extracellulaire. Les fibroblastes assurent ainsi le renouvellement du tissu.

- Les fibres :

L'ensemble des fibres constitue le deuxième élément des tissus conjonctifs. Les fibres se distinguent en fibres de collagène et en fibres élastiques. Les fibres de collagène (COL I essentiellement) assemblées à partir de fibrilles de collagène, majoritaires dans les tissus conjonctifs, s'organisent en forme de faisceaux entre les cellules.

1.3.1.3 Substance fondamentale

Au cœur de la matrice extracellulaire, les cellules et les fibres sont entourées de substance fondamentale. Cette substance est un gel très hydraté. Elle assure la cohésion entre cellules et fibres. Les propriétés de la substance fondamentale sont dues à la présence de protéoglycanes et de glycoprotéines, et particulièrement les fibronectines. Ce sont les fibronectines qui favorisent la cohésion entre les cellules et les fibres. Elles ont la faculté de s'attacher d'une part au collagène organisé en fibres ou fibrilles et, d'autre part, à la membrane des cellules. Elles sont donc directement impliquées dans la formation des contacts focaux et dans la migration cellulaire (Norton and Izzard 1981).

1.3.1.4 Interactions cellules/ matrice extracellulaire

Les interactions cellules-matrice extracellulaire jouent un rôle majeur dans la formation, le développement des tissus et les processus de cicatrisation. Ces interactions mènent à la formation de structures, à la morphogénèse, à l'acquisition et à la maintenance de phénotypes différenciés au cours du développement ainsi qu'à la migration voire à l'alignement des cellules. Les interactions avec la surface sur laquelle les cellules sont déposées jouent également un rôle important (Curtis and Wilkinson 1997). L'intérêt d'utiliser du collagène pour fabriquer de telles architectures réside dans le fait que, contrairement aux polymères synthétiques, le collagène de type I est constitué par des mécanismes d'auto assemblage conduisant à un matériau présentant des structures ordonnées à différentes échelles de taille (cf. 1.2.2.1), et que sa séquence protéique contient des motifs spécifiques permettant l'adhésion cellulaire.

Comprendre comment les cellules ressentent leur environnement extracellulaire, et plus particulièrement la topographie d'un substrat sur lequel elles sont déposées, pourrait fournir des indications quant à la préparation de matrices tridimensionnelles pour l'ingénierie tissulaire. La littérature nous indique que les cellules perçoivent et trouvent de nouveaux sites d'attachement par l'intermédiaire des filopodes qui sont des excroissances cytoplasmiques permettant aux cellules de se mouvoir (Curtis *et al.* 2004). Ces mécanismes proviendraient des contraintes mécaniques transmises au niveau du cytosquelette, qui est constitué de filaments d'actine, de filaments intermédiaires et de microtubules (Chan and Odde 2008). Les travaux de Teixeira *et al.* ont montré l'influence de la topographie extracellulaire sur le comportement des filopodes (Teixeira *et al.* 2003; Rajniecek *et al.* 2008). Sur des surfaces micro ou nanostructurées, les cellules semblent allonger leurs filopodes afin de mieux percevoir leur environnement ou la topographie locale (Dalby *et al.* 2002). De plus, le réseau

de filaments d'actine, lié aux contacts focaux qui sont des structures cellulaires impliquées dans les contacts cellules/matrice extracellulaire, sont influencés par la topographie de la surface. Sur des surfaces nano/microstructurées, ces phénomènes conduisent à l'alignement des cellules et à leur migration préférentielle dans le sens de la structuration (Teixeira *et al.* 2003). Les études d'Oakley *et al.* ont montré que les microtubules, les filaments d'actine et les contacts focaux de fibroblastes gingivaux réagissent simultanément et entraînent l'alignement des cellules dans l'axe d'orientation de la surface sur laquelle elles sont déposées (Oakley and Brunette 1993). Cependant, ces mécanismes ne sont pas les seuls mis en jeu au cours de l'alignement. En bloquant les récepteurs du cytosquelette, Wojciakstothard *et al.* ont montré que les cellules déposées sur des surfaces orientées s'alignaient quand même (Wojciakstothard *et al.* 1995).

En plus de la topographie, d'autres facteurs peuvent influencer l'alignement et la migration cellulaire. Ainsi, un étirement mécanique cyclique (5 à 10% de la longueur d'origine) appliqué à des cellules endothéliales vasculaires (Houtchens *et al.* 2008) ou un champ électrique appliqué à des cellules épithéliales de la cornée entraînent l'alignement et la migration préférentiels des cellules (Rajnicek *et al.* 2007).

En résumé, tous les principes gouvernant l'alignement ou la migration cellulaire ne sont pas encore parfaitement compris. L'investigation de ces mécanismes revêt donc un intérêt majeur. Le développement de nouvelles techniques de préparation de surfaces influençant l'alignement et la migration cellulaire trouve donc toute sa place dans l'étude de ces principes. De tels travaux permettront d'améliorer la compréhension des interactions intervenant entre les cellules et la topographie ou les propriétés physico-chimiques des surfaces sur lesquelles elles sont déposées.

1.3.2 Conditions nécessaires pour mimer des structures tissulaires alignées

Il existe deux conditions indispensables pour préparer des substrats ou matériaux dans lesquelles les molécules présentent un ordre à une échelle de taille définie. La géométrie des molécules constitue une de ces deux conditions. En effet, les molécules doivent présenter une certaine anisotropie pour pouvoir être assemblées de manière ordonnée. C'est le cas par exemple des cristaux liquides. Lorsque les molécules sont organisées en phase nématique, elles possèdent une orientation globale caractérisée par un paramètre d'ordre, l'orientation moyenne des molécules. Dans le cas du collagène, les molécules sont des fibrilles ou fibres qui sont des molécules anisotropes. La deuxième condition est la possibilité d'appliquer une contrainte ou force extérieure aux molécules. Les molécules, en général, ne s'auto-organisent pas pour former un matériau ordonné. Il est alors possible d'appliquer une force extérieure telle qu'un champ électromagnétique ou une contrainte mécanique (traction, compression). L'application de cette force sert à guider l'orientation des molécules.

1.3.3 Principales techniques utilisées

Dans le but d'aligner un matériau ou des fibres de polymères, c'est-à-dire de créer un ordre au sein d'un matériau, plusieurs techniques ont été développées. Des études ont ainsi décrit l'utilisation d'un champ magnétique (Kotani *et al.* 2000; Dubey *et al.* 2001; Kaufman and Guo 2007; Builles *et al.* 2010), de l'électrofilage (Yang *et al.* 2005; Baker *et al.* 2006; Huang *et al.* 2006; Liu *et al.* 2010), de la microstructuration de surfaces (Vernon *et al.* 2005; Chen *et al.* 2011), de la microfluidique (Lee *et al.* 2006), ou d'un flux (Tanaka *et al.* 2011) et encore de techniques combinées telles que l'électrofilage associé à un champ magnétique (Kaufman and Guo 2007).

1.3.3.1 Structuration de surfaces

L'utilisation de surfaces nano ou microstructurées est une stratégie non biologique pour réguler les fonctions cellulaires. Ces surfaces servent de supports extracellulaires et ne font pas intervenir d'interactions biochimiques. Cependant, la topographie de ces surfaces permet de guider les cellules (Figure 1.4). Les différentes topographies sont classées par échelle de taille et par type de structure (stries, sillons). Parce que les membranes de divers tissus biologiques (la cornée par exemple) sont composées de pores, stries, particules ou fibres à l'échelle nanométrique (5 - 200 nm), les surfaces nano-structurées pourraient être mieux adaptées que les surfaces microstructurées (Flemming *et al.* 1999).

L'orientation et la migration de cellules sur des surfaces structurées par nanolithographie ont été étudiées par différentes équipes (Oakley and Brunette 1993; Wojciakstothard *et al.* 1995; Lim and Donahue 2007). Ils ont ainsi observé une modification de la forme du cytoplasme des cellules. Leur cytosquelette subit également des modifications puisqu'on observe une certaine orientation. L'orientation des filaments d'actine et des microtubules a été identifiée comme l'élément intervenant en premier lors de l'alignement de cellules « guidées » (Oakley and Brunette 1993; Wojciakstothard *et al.* 1995). De plus, il a été démontré que les protéines des contacts focaux (vinculine) jouaient un rôle primordial dans l'alignement cellulaire (den Braber *et al.* 1998).

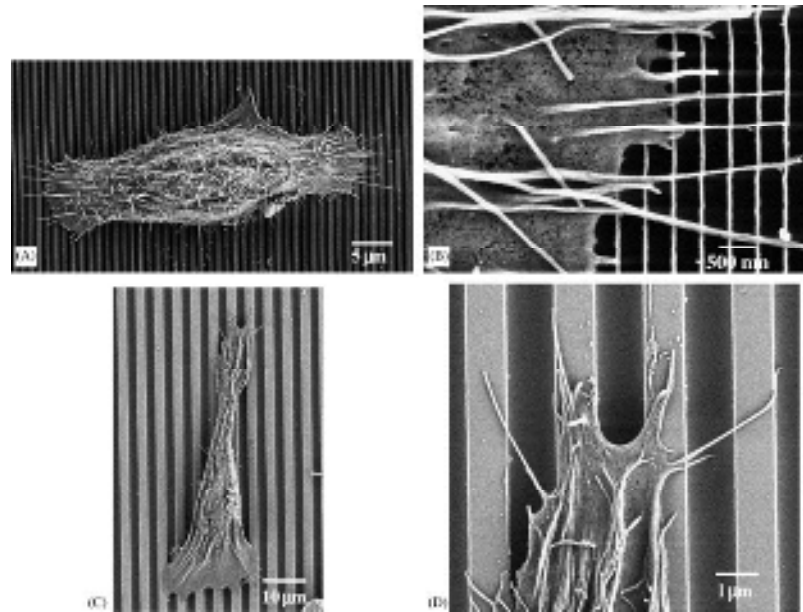


Figure 1.4 : Cellules cultivées sur des substrats structurés observés par microscopie électronique à balayage (Teixeira *et al.* 2006). (A) Cellule alignée perpendiculairement aux rainures (70 nm de large, 400 nm de profondeur). (B) Zoom de l'image A. (C) Cellule alignée parallèlement aux rainures (1900 nm de large, 4000 nm de profondeur). (D) Zoom de l'image C.

La plupart des premières études réalisées sur des surfaces portaient sur des rainures espacées de l'ordre du millimètre. Il a été mis en évidence que l'échelle des rainures jouait un rôle crucial sur l'alignement des cellules. L'alignement des cellules augmente, en général, avec l'augmentation de la profondeur des rainures et la diminution de leur espacement (Lim and Donahue 2007). A l'échelle du micromètre, avec l'augmentation de la profondeur des rainures et la diminution de l'espacement, les cellules semblent faire des « ponts » entre les rainures sans descendre au fond de celles-ci. En même temps, les auteurs notent que les contacts focaux montrent une orientation dépendante de la largeur des rainures. Avec le développement des techniques lithographiques, des études récentes ont pu être menées sur l'alignement de cellules sur des surfaces nanostructurées. L'influence des dimensions minimales des rainures pouvant entraîner l'alignement des cellules a ainsi été étudiée. Teixeira *et al.* ont observé l'alignement de cellules épithéliales (humaines de la cornée) sur des surfaces nanostructurées avec des rainures de 70 nm de large (Teixeira *et al.* 2003). L'alignement et la prolifération d'axones ont également été

observés sur des surfaces nano-imprimées, avec des largeurs de rainures comprises entre 100 et 400 nm (Johansson *et al.* 2006). Une étude utilisant des surfaces nanostructurées en poly(styrène) (70 nm de profondeur) a montré que des cellules souches (préostéoblastes) s'orientaient de manière anisotrope non seulement au niveau des filaments d'actine mais aussi de la matrice minéralisée, suggérant que la topographie pouvait également influencer l'activité synthétique des cellules (Zhu *et al.* 2005). L'échelle d'espacement des rainures a également un effet sur le comportement des cellules qui vont former des ponts entre les rainures grâce à la formation préférentielle de contacts focaux soit sur les sommets soit sur les creux des rainures (Wojciakstothard *et al.* 1996). Ces travaux démontrent que les cellules détectent le rainurage nano ou micrométrique sur lequel elles sont déposées et réagissent de manière sélective.

1.3.3.2 Electrofilage

L'électrofilage (de l'anglais « electrospinning »), technique dont le principe a vu le jour en 1902, consiste à utiliser un champ électrique pour produire des fibres. Le principe de cette technique repose sur l'étirement d'un jet de solution de polymère sous l'effet d'une différence de potentiel de l'ordre de 10 à 20 kV pour produire des fibres dont le diamètre varie entre quelques nanomètres et quelques micromètres. Pour l'ingénierie tissulaire, des fibres de différents diamètres peuvent être préparées pour moduler des paramètres tels que la porosité, le diamètre des pores et les propriétés mécaniques. Au sein de la matrice extracellulaire, le diamètre moyen des fibres varie entre quelques dizaines de nm et environ 300 nm, c'est pourquoi il est préférable de produire des fibres ayant ces dimensions. Les travaux de Reneker *et al.* ont ainsi montré les possibilités offertes par l'électrofilage (Reneker *et al.* 2000). Il a été montré que les paramètres tels que la valeur du champ électrique, la tension de surface, le débit, la concentration en polymère et la nature du polymère permettent d'ajuster les propriétés des structures ainsi fabriquées.

Beaucoup de polymères synthétiques et naturels ont été utilisés et plusieurs types cellulaires ont été étudiés sur des supports préparés par électrofilage. Les nanofibres ainsi élaborées apportent une très large surface d'échange pour des interactions cellules-cellules et cellules-soutiens. Cependant, une étude montre que la structure du collagène des fibres préparées par électrofilage peut être dénaturée (Zeugolis *et al.* 2008).

- Applications à l'alignement

Des nanofibres électrofilées orientées peuvent être utilisées en ingénierie tissulaire pour contrôler l'alignement cellulaire. Dans les tissus naturels, les cellules peuvent être alignées et cet alignement est crucial pour assurer les fonctions cellulaires. Par exemple, dans les vaisseaux sanguins, les contraintes dues au flux sanguin entraînent l'orientation des cellules endothéliales dans le sens du flux (Levesque *et al.* 1986). Afin d'aligner des cellules le long de fibres électrofilées alignées et donc de mimer l'alignement de ces cellules dans le corps humain, Yang *et al.* ont développé une technique innovante (Yang *et al.* 2005). Ils ont placé un récupérateur capable de tourner sur lui-même et ainsi enrouler les fibres de polymères produites par électrofilage. En agissant sur la vitesse de rotation, ils ont pu aligner les fibres.

Bashur *et al.* ont utilisé la technique d'électrofilage pour produire des fibres de caprolactone alignées (Bashur and Ramamurthi 2012). Ils ont cultivé des cellules musculaires lisses sur ces supports et ont montré l'effet de l'alignement des fibres sur ces cellules. Les cellules sont guidées par les fibres et s'alignent selon celles-ci.

Pour trouver de nouvelles solutions quant à la régénération de la moelle épinière, Corey *et al.* ont étudié la croissance des neurites de cellules des ganglions de la racine dorsale sur des supports alignés. Pour cela, ils ont cultivé ces cellules sur des supports en PLLA

électrofilés et alignés (Corey *et al.* 2007). Ils ont pu montrer que les neurites s'alignaient le long des fibres.

Bhattacharai *et al.* ont cultivé des fibroblastes NIH 3T3 de souris sur des fibres à base de poly(p-dioxanone-co-L-lactide)-block-poly(ethylene glycol) (PPDO/PLLA-b-PEG) (Bhattacharai *et al.* 2004). Ils ont montré que les cellules conservent leur phénotype et sont guidées par l'orientation des fibres.

Enfin, certains travaux ont montré la possibilité de différencier des cellules souches sur des architectures fabriquées par électrofilage et soumises à des contraintes mécaniques (Subramony *et al.* 2013). Des cellules mésenchymateuses sont cultivées sur des supports électrofilés en poly(lactide-co-glycolide) (PLGA). Les cellules cultivées sur les supports alignés et sur lesquels est appliquée une contrainte mécanique se différencient en cellules du type fibroblastes ligamentaires.

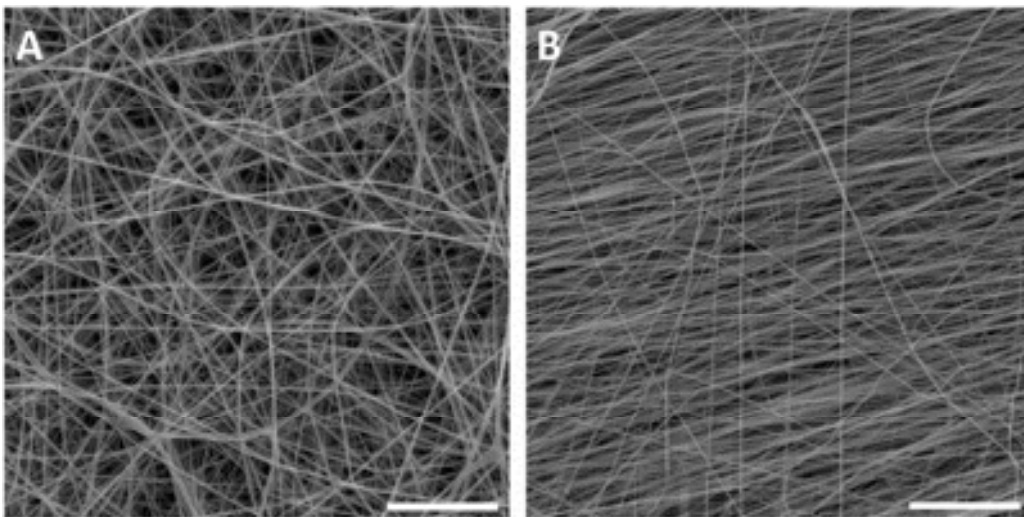


Fig. 1. 5 : Observation de fibres de collagène de type I produites par électrofilage en microscopie électronique à balayage (Nöth *et al.* 2010). (A) Orientation aléatoire des fibres récupérées sur un récupérateur plan. (B) Alignement des fibres récupérées sur un récupérateur rotatif (7 m.s^{-1}). Echelle = $10 \mu\text{m}$.

1.3.3.3 Champ magnétique

Au cours de la formation des fibrilles de collagène en solution, un champ magnétique peut être appliqué. Le collagène, tout comme d'autres protéines possède une anisotropie diamagnétique. Les origines structurales de l'anisotropie diamagnétique des protéines ont été exposées par Worcester (Worcester 1978). Les liaisons peptidiques et les résidus aromatiques sont les principales sources d'anisotropie au sein des protéines. Dans le cas du collagène, la faible présence de groupes aromatiques fait que l'anisotropie est majoritairement due aux liaisons peptidiques. L'existence de cette anisotropie permet d'aligner des fibrilles ou fibres de collagène selon un axe par application d'un champ magnétique.

- Applications à l'alignement

Les travaux de Torbet *et al.* ont décrit la formation de fibres (fibrine et collagène) alignées sous l'effet d'un champ magnétique intense (Torbet *et al.* 1981; Torbet and Ronziere 1984). Ainsi, l'orientation et la croissance de neurites de cellules neuronales ont été étudiées sur des surfaces de fibrine alignées par un champ magnétique (Dubey *et al.* 2001). L'effet de guidage par contact des fibres alignées sur les cellules a pu être démontré. Plus récemment, des substrats alignés par champ magnétique à base de collagène ont été utilisés afin d'étudier la régénération et la reconstruction de cornées (Torbet *et al.* 2007; Builles *et al.* 2010).

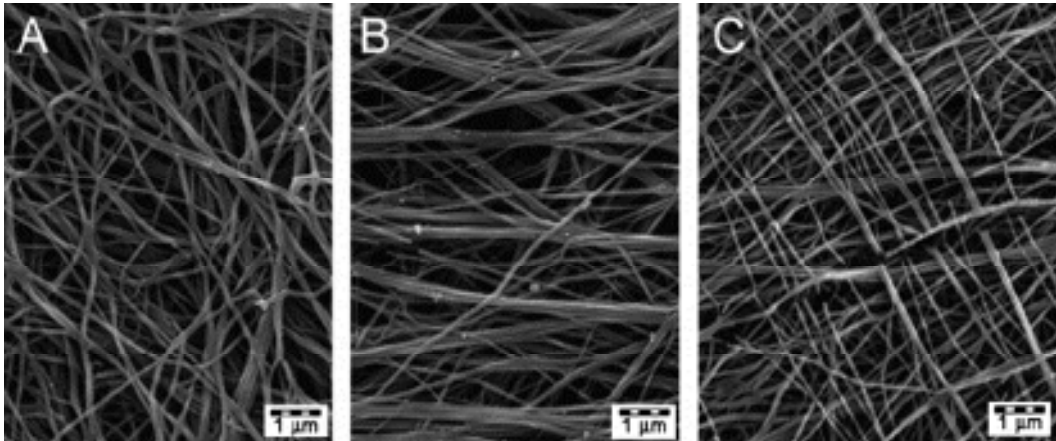


Fig. 1.6 : *Fibres de collagène sous champ magnétique observées par microscopie électronique à balayage (Torbet et al. 2007). (A) Orientation aléatoire, en l'absence de champ magnétique. (B) Fibres alignées de manière uniaxiale, champ magnétique 7T. (C) Fibres alignées orthogonalement, 2 étages de fibres.*

1.3.3.4 Microfluidique

La microfluidique permet d'étudier des écoulements de liquides dans des canaux de taille micrométrique. Whitesides a défini la microfluidique comme étant « la science et la technologie des systèmes qui manipulent de petits volumes de fluides (10^{-9} à 10^{-18} litres), en utilisant des canaux de la dimension de quelques dizaines de micromètres » (Whitesides 2006). Des micro-canaux peuvent être gravés ou moulés dans un matériau tel que du verre, du PDMS ou du silicium ce qui permet de fabriquer des puces microfluidiques à l'image des circuits intégrés en électronique. Les propriétés de ces puces telles que les caractéristiques optiques, la compatibilité biologique, le nombre et la taille des canaux sont facilement modulables (Mark *et al.* 2010).

L'origine de la microfluidique remonte aux années 1950 avec l'invention des transistors. Au cours des années 1960, l'apparition de la photolithographie a permis de miniaturiser la fabrication de ces transistors (Pease and Chou 2008). Des techniques de miniaturisation ont ensuite été utilisées pour fabriquer des microcanaux sur d'autres supports.

C'est à partir des années 2000 que la microfluidique a connu un essor particulier avec le développement de systèmes ou puces à base de poly(diméthylsiloxane) (PDMS).

- Applications à l'alignement :

Lee *et al.* ont montré la possibilité d'aligner des fibres de collagène en utilisant la microfluidique (Lee *et al.* 2006). La solution de collagène est introduite dans des micro-canaux et un flux est appliqué pour faire couler la solution. Les fibres de collagène polymérisent et se déposent sur les parois selon l'axe du flux. Cependant, cette technique ne permet pas d'obtenir des matériaux directement implantables et reste compliquée à mettre en œuvre pour fonctionnaliser une surface.

1.3.4 Étirement du revêtement collagène/alginate

Les contraintes mécaniques appliquées aux protéines et plus généralement aux polymères ont fait l'objet de nombreuses études. Les travaux de Hemmerlé *et al.* ont montré l'influence de l'étirement sur des films multicouches PAH/nafion et PAA/PAH (Hemmerlé *et al.* 2005). Un film PAH/nafion est déposé sur un substrat en silicone puis recouvert d'un film PAA/PAH. La surface est hydrophile avec un angle de contact d'environ 50° pour l'eau. Après étirement, la surface devient hydrophobe avec un angle de contact de 100° pour l'eau, et ceci de manière réversible. Des films multicouches étirables et compartimentés (réservoirs/barrières) ont également été développés (Mertz *et al.* 2007). Par exemple, Mertz *et al.* ont étudié l'effet de l'étirement sur des films compartimentés avec comme structure de base dite « réservoir » un film PLL/HA recouvert par un film dit « barrière » PSS/poly(diallyldiméthylammonium) (PDADMA). L'étirement provoque la formation de pores en surface. Lorsque que la contrainte d'étirement est supprimée, les pores se referment et les films retrouvent leur structure initiale. D'autres systèmes de modulation de l'adhésion

cellulaire (fibroblastes) en fonction de l'étirement ont vu le jour (Reisch *et al.* 2008). Plus récemment, l'étirement de films multicouches a été utilisé afin de provoquer une dégradation enzymatique pour la libération de médicaments (Barthès *et al.* 2012). La libération de protéines à partir d'un implant en fonction des contraintes mécaniques appliquées a également été étudiée (Arm and Tencer 1997).

- Applications à l'alignement

La résistance à la traction est une technique de caractérisation généralement employée pour déterminer les modules élastiques des matériaux. La résistance mécanique de matériaux tels que des fibres de collagène peut être améliorée par simple étirement mécanique du matériau (Pins *et al.* 1997). Pedicini *et al.* ont utilisé l'étirement mécanique en essai de traction pour aligner des fibres de polyuréthane électrofilées (Pedicini and Farris 2003). Ils ont ainsi pu montrer l'influence de l'étirement sur l'alignement des fibres. Il en résulte que l'alignement des fibres augmente avec le taux d'étirement.

Afin de caractériser les propriétés et le comportement de caillots de sang, constitués essentiellement de fibrine (fibres), Brown *et al.* les ont étirés mécaniquement (Brown *et al.* 2009). Ils ont ainsi montré qu'en étirant les caillots de sang de manière uniaxiale il était possible d'aligner les fibres selon cet axe. De la même manière, Yano *et al.* ont étudié l'effet de l'étirement sur l'orientation de fibres de poly(alcool vinyl) produites par électrofilage (Yano *et al.* 2012) et ont vérifié que l'alignement augmentait avec le taux d'étirement.

A notre connaissance, aucune étude n'a porté sur l'étirement uniaxial de feuilles de PDMS sur lesquelles étaient déposés des films multicouches à base de collagène afin d'aligner les fibrilles ou fibres de collagène. Cette technique présente pourtant plusieurs avantages pour aligner simplement et efficacement des fibrilles de collagène dans un

revêtement. Premièrement, elle utilise la méthode de dépôt de films multicouches de polyélectrolytes dont les avantages tels que la facilité de mise en œuvre, les paramètres ajustables (pH, nature des polyélectrolytes, etc.) et la multitude d'applications biomédicales (films anti-adhésifs, anti-microbiens, favorisant l'intégration d'implants) ont été largement cités dans la littérature (Boudou *et al.* 2010). Deuxièmement, l'intégrité de la structure chimique des polyélectrolytes utilisés demeurerait préservée. Cela veut dire qu'il n'y aurait pas de dégradation due à un champ électromagnétique ou une contrainte mécanique (pression, traction, torsion) trop importante. Le collagène pourrait donc conserver ses propriétés biochimiques et mécaniques. Troisièmement, il serait possible de fabriquer des architectures à épaisseur variable et facilement déposables sur différents types de surfaces.

Quant aux applications, ces revêtements pourraient être utilisés comme supports pour étudier les mécanismes de migration et de prolifération de cellules par guidage. On a pu voir dans la partie 1.3.3 (voir ci-dessus) que des supports alignés, élaborés par différentes techniques, suscitaient un fort intérêt dans des applications très variées. Ces supports permettent d'étudier aussi bien la régénération de fibroblastes (muscles, tendons, gingivaux) que la régénération de nerfs ou de cellules neuronales.

2 Chapitre 2. Matériels et méthodes

2.1. Matériels

2.2. Préparation des échantillons

2.2.1. Construction des films

2.2.2. Dispositifs d'étirement

2.2.3. Agents de réticulation

2.3. Analyses biologiques

2.3.1. Culture cellulaire

2.3.2. Ensemencement

2.3.3. Marquages immuno-fluorescents

2.4. Méthodes d'analyse et de caractérisation des films et des cellules

2.4.1. Microbalance à cristal de quartz

2.4.2. Microscopie à force atomique

2.4.3. Observations cellulaires

2.4.4. Quantification de l'orientation des films et cellules

2.4.5. Spectroscopie infrarouge

2.4.6. Microscopie confocale à balayage laser

2.4.7. Microscopie électronique à balayage environnementale

2.4.8. Ellipsométrie

2.1 Matériels

Les polyélectrolytes utilisés pour construire les films multicouches sont dissous dans une solution tampon citrate-NaCl à pH 3,8, à base de citrate de sodium (4 mM), d'acide citrique (7 mM) et de chlorure de sodium (150 mM NaCl) préparée avec de l'eau ultra-pure (de résistivité 18,2 M.cm, système Milli-Q-plus, Millipore). Les solutions de polyélectrolytes sont réalisées à une concentration de 0,5 mg.mL⁻¹ et le pH de ces solutions est ajusté à 3,8 avec des solutions concentrées de HCl et de NaOH (0,1 M). Le tableau 2.1 récapitule les polyélectrolytes utilisés pour nos travaux.

Nom du polyelectrolyte	Notation	Nature	Fournisseur
Poly(éthylène imine)	PEI	Polycation	Sigma Aldrich
Collagène (type I bovin)	COL	Polycation	Symathese
Alginate de sodium	ALG	Polyanion	Novamatrix

Tableau 2.1 : Liste des polyélectrolytes utilisés pour la construction de films multicouches.

Une solution tampon Hepes-NaCl à pH 7,4, à base d'Hepes (10 mM) et de chlorure de sodium (150 mM), a été utilisée afin de rincer les échantillons après les avoir construits et pour les analyses biologiques. Les solutions tampons ont été préparées à partir d'eau ultra-pure (de résistivité 18,2 MΩ.cm, système Milli-Q-plus, Millipore). Le pH des solutions a été ajusté à 7,4 avec des solutions concentrées de HCl et de NaOH (0,1 ou 1 M).

2.2 Préparation des échantillons

2.2.1 Construction des films

Lors de nos travaux, nous avons utilisé quatre types de substrats selon les expériences et la technique de caractérisation employée. Pour les expériences de spectroscopie infrarouge, nous avons utilisé un cristal de séléniure de zinc (ZnSe), pour la microbalance à cristal de quartz (QCM-D) nous avons utilisé des substrats en silice conçus spécialement pour la QCM-D, pour les mesures d'ellipsométrie nous avons utilisé des tranches (wafers) de silicium, pour la culture cellulaire nous avons utilisé des lamelles de verre de 12 mm de diamètre et pour la partie concernant l'étirement ce sont des feuilles de silicone (Statice, Besançon, France) $18 \times 25 \text{ mm}^2$ qui ont été employées.

Dans tous les cas, ces substrats ont été soigneusement nettoyés avant leur emploi pour la construction des films multicouches. Trois protocoles différents de nettoyage sont mis en œuvre suivant la nature des substrats utilisés. Ainsi, les cristaux de QCM-D et le cristal de ZnSe sont lavés pendant 15 min dans une solution de hellmanex à 2% chauffée à 70 °C, puis rincés à l'eau milli-Q et encore lavés pendant 15 min avec une solution de HCl à 100 mM chauffée également à 70 °C et enfin rincés à l'eau ultrapure et séchés sous jet d'azote. Les tranches de silicium sont lavées suivant le protocole appliqué au cristal de ZnSe mais pendant 30 min au lieu de 15 min et à une température proche de l'ébullition. Les feuilles de PDMS sont nettoyées préalablement avec de l'éthanol (quelques minutes) puis rincées abondamment avec de l'eau ultrapure. Les films multicouches ont été élaborés selon la méthode de construction par trempage (« dipping »). Les substrats (verre, PDMS), chargés négativement, sont immergés pendant 8 min dans une solution de polycations (étape 1) préparée suivant le protocole décrit précédemment, puis rincés dans une solution saline à 150 mM NaCl (étape 2) durant 8 min. Ils sont ensuite trempés dans une solution de polyanions pendant 8 min (étape

3) puis rincés (étape 4 identique à l'étape 2). Ce cycle est répété autant de fois que nécessaire pour obtenir le nombre de bicouches désiré.

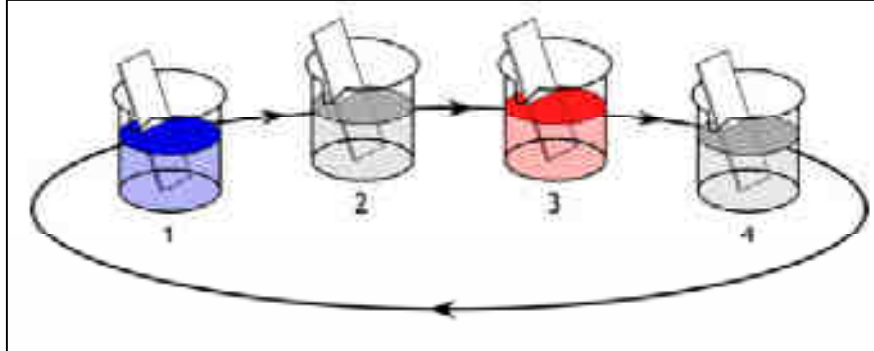


Figure 2.1 : Construction d'un film multicouche par trempage. Les étapes de trempage sont réalisées respectivement dans les solutions de 1) polycations, 2) tampon, 3) polyanions et 4) tampon (Decher 1997).

La plupart des films étudiés ont été construits par la méthode de trempage. Cette méthode de dépôt a été facilitée par un bras automatisé (Dipping Robot DR3, Kriestein, Allemagne). Celui-ci est programmé pour déplacer de manière séquentielle les échantillons dans les différents bains de polyélectrolytes et de rinçage (Figure 2.2).



Figure 2.2 : Construction d'un film multicouche à l'aide d'un bras automatisé (Dipping Robot DR3, Kriestein, Allemagne).

2.2.2 Dispositifs d'étirement

2.2.2.1 Platine d'étirement

La feuille de PDMS, sur laquelle se trouve le système étudié est fixée à l'aide de mors sur un dispositif d'étirement (Figure 2.3). Celui-ci a été conçu au laboratoire et construit en acier inoxydable. Il permet d'étirer l'échantillon et de revenir à l'état initial manuellement.



Figure 2.3 : Photographie du dispositif d'étirement manuel.

2.2.2.2 Dispositif de maintien à l'état étiré pour l'AFM

Afin d'imager des échantillons à l'état étiré en microscopie à force atomique, où l'espace disponible est très restreint, un autre système a été conçu et fabriqué en acier inoxydable (Figure 2.4). Celui-ci ne permet pas d'étirer l'échantillon *in situ*, mais seulement de le maintenir à l'état étiré. La partie inférieure du système est placée dans la gouttière prévue à cet effet sur la platine d'étirement (Figure 2.3), puis la partie supérieure est amenée par le dessus afin de plaquer le film. Enfin, les deux parties sont vissées l'une à l'autre.



Figure 2.4 : Photographie du dispositif de maintien d'échantillons en PDMS à l'état étiré.

2.2.2.3 Brides de maintien à l'état étiré pour la culture cellulaire

Afin d'utiliser des échantillons à l'état étiré en biologie (culture cellulaire), un dernier système a été conçu et fabriqué en acier inoxydable (Figure 2.5). Celui-ci ne permet pas d'étirer l'échantillon *in situ*, mais seulement de le maintenir à l'état étiré. La partie inférieure du système est placée sous la feuille de PDMS étirée et sur la platine d'étirement (Figure 2.3), puis la partie supérieure est amenée par le dessus afin de plaquer le film. Enfin, les deux parties sont vissées l'une à l'autre.



Figure 2.5 : Photographie du dispositif de maintien d'échantillons en PDMS pour la culture cellulaire.

2.2.3 Agents de réticulation

Certaines manipulations nécessitent de réticuler chimiquement les films COL/ALG. Pour cela, les agents de réticulation (EDC/s-NHS, glutaraldéhyde) sous forme de poudres, ont été solubilisés à une concentration déterminée dans une solution tampon (citrate) à pH 3,8. La génipine a été solubilisée dans un mélange DMSO/tampon citrate (1 : 5) à pH 3,8. Les solutions tampons ont été préparées à partir d'eau ultra-pure (de résistivité 18,2 M Ω .cm, système Milli-Q-plus, Millipore). Le pH des solutions a été ajusté à 3,8 avec des solutions concentrées de HCl et de NaOH (0,1 ou 1 M). Le tableau 2.2 récapitule les agents réticulants utilisés pendant nos travaux.

Nom du produit	Notation ou formule chimique	Fournisseur	Masse molaire (g.mol ⁻¹)
1-Ethyl-3-(3-diméthylamino-propyl) carbodiimide	EDC	Sigma Aldrich	191,7
N-hydroxysolfo succinimide	Sulfo-NHS	Fluka	217,1
Génipine	GEN	WAKO	226,2
Glutaraldéhyde	GLU	Sigma Aldrich	100,1

Tableau 2.2 : Liste des agents de réticulation utilisés.

2.3 Analyses biologiques

2.3.1 Culture cellulaire

2.3.1.1 Culture de cellules endothéliales

Les cellules endothéliales humaines HUVEC (passages de 1 à 5) sont cultivées dans le milieu de culture « Minimum Essentiel Eagle » (MEM, GibcoBRL) supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (FCS) et 1% d'antibiotiques pénicilline/streptomycine (GibcoBRL) dans une étuve thermostatée à 37 °C sous une atmosphère de 5% de CO₂. Pour le passage, les cellules sont détachées par trypsination (Trypsine/EDTA, Sigma à 0,5 %) pendant 4 min à 37 °C. Les cellules sont stockées par congélation (-80 °C).

2.3.1.2 Culture de fibroblastes

Les fibroblastes de souris NIH 3T3 (passages 6 à 8) sont cultivées dans le milieu de culture DMEM (PromoCell) 4,5 g/L de glucose supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (FCS GibcoBRL) et 1 % d'antibiotiques pénicilline/streptomycine, dans une étuve thermostatée à 37 °C et sous une atmosphère à 5 % de CO₂ dans des flasques de culture de 75 cm² en conditions stériles. Pour le passage, les cellules sont détachées par trypsination (Trypsine/EDTA, Sigma à 0,5 %) pendant 4 min à 37 °C. Les cellules sont stockées par congélation (-80°C). Pour cette congélation, elles sont suspendues à 10⁶ cellules par mL dans un milieu contenant du DMEM, 20 % de sérum de veau foetal et 20 % de diméthyl sulfoxyde (DMSO, Sigma). La densité cellulaire est mesurée avec une cellule Neubauer. Pour les études

de prolifération cellulaire, les cellules sont déposées à une concentration comprise entre 10^4 et 10^5 cellules par mL. Le milieu est changé après 24 h puis tous les 2 jours.

2.3.1.3 Culture de fibroblastes gingivaux

Les fibroblastes gingivaux humains primaires (HGFs, passages 6 à 8) sont extraits de tissus gingivaux humains sains selon le protocole approuvé par le comité d'éthique pour la protection des patients des hôpitaux de Strasbourg. Les cellules sont cultivées dans le milieu de culture DMEM (PromoCell) à 1 g/L de glucose supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (FCS GibcoBRL) et 1 % d'antibiotiques pénicilline/streptomycine, dans une étuve thermostatée à 37 °C et sous une atmosphère à 5 % de CO₂ dans des flasques de culture de 75 cm³ en conditions stériles. Pour le passage, les cellules sont détachées par trypsination (Trypsine/EDTA, Sigma à 0,5 %) pendant 4 min à 37 °C. Les cellules sont stockées par congélation (-80 °C). Pour cette congélation, elles sont suspendues à 10^6 cellules par mL dans un milieu contenant du DMEM, 20 % de sérum de veau fœtal et 20 % de diméthyl sulfoxyde (DMSO, Sigma). La densité cellulaire est mesurée avec une cellule de Neubauer. Pour les études de prolifération cellulaire, les cellules sont déposées à une concentration comprise entre 10^4 et 10^5 cellules par mL. Le milieu est changé après 24 h puis tous les 2 jours.

2.3.1.4 Culture d'astrocytes

Les astrocytes primaires de rats (passages 1 à 2) sont extraits de cerveaux de rats. Les cellules sont cultivées dans le milieu de culture DMEM (PromoCell) à 4,5 g/L de glucose supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FCS GibcoBRL) et 1 % d'antibiotiques pénicilline/streptomycine, dans une étuve thermostatée à 37 °C et sous une atmosphère à 5 %

de CO₂ dans des flasques de culture de 75 cm³ en conditions stériles. Pour le passage, les cellules sont détachées par trypsination (Trypsine/EDTA, Sigma à 0,5 %) pendant 4 min à 37°C. Les cellules sont stockées par congélation (-80 °C). Pour cette congélation, elles sont suspendues à 10⁶ cellules par mL dans un milieu contenant du DMEM, 20 % de sérum de veau fœtal et 20 % de diméthyl sulfoxyde (DMSO, Sigma). La densité cellulaire est mesurée avec une cellule de Neubauer. Pour les études de prolifération cellulaire, les cellules sont déposées à une concentration comprise entre 10⁴ et 10⁵ cellules par mL. Le milieu est changé après 24 h puis tous les 2 jours.

2.3.2 Ensemencement des cellules sur les films multicouches

Les échantillons sont préalablement stérilisés sous UV (exposition de 30 min) dans une hotte de culture. Les cellules presque confluentes sont détachées des flasques de culture par trypsinisation (Trypsin, Gibco, Villebon-sur-Yvette, France), comptées avec un haemocytomètre puis ensemencées (200 µL/échantillon et avec 10⁴ cellules/cm²). Les cellules sont alors cultivées à 37 °C sous une atmosphère humidifiée (5 % de CO₂) pendant une durée déterminée. Pour les films déposés sur les feuilles de PDMS et étirés, une demi-heure après ensemencement, la quantité de milieu est complétée pour atteindre un volume de 5 mL.

2.3.3 Fixation/perméabilisation

Après lavage des cellules au tampon phosphate (PBS à 37 °C), elles sont fixées avec du paraformaldéhyde (PFA, sigma) à 3,7 % v/v dans du PBS, pendant 15 min à température ambiante. Les cellules fixées sont perméabilisées avec une solution à 0,1 % v/v de triton X-

100 (t-Octylphenoxy Polyethoxyethanol, Sigma) dans le PBS durant 10 min à température ambiante.

2.3.4 Marquages immuno-fluorescents

2.3.4.1 Marquage du noyau

Le 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) est un marqueur de l'ADN et permet d'observer le noyau de la cellule. Il donne ainsi des informations sur l'organisation et la morphologie de la cellule. Après rinçage des échantillons au PBS, le DAPI est mis en contact des cellules durant 10 min à température ambiante.

2.3.4.2 Marquage du cytosquelette

- Marquage à la rhodamine-phalloïdine

La rhodamine-phalloïdine est un marqueur des filaments d'actine et permet d'observer le cytosquelette. Elle donne ainsi des informations sur l'organisation et la morphologie de la cellule. Après rinçage des échantillons au PBS, la rhodamine-Phalloïdine à 1 µg/mL est mise en contact des cellules durant 10 min à température ambiante. Finalement, les échantillons sont rincés au PBS et conservés à 4 °C dans le PBS jusqu'à l'observation. L'observation est réalisée avec le filtre 560/590 nm sur le microscope à épi-fluorescence TE200 Nikon.

- Marquage à la vinculine

La vinculine est un marqueur des contacts focaux et permet d'observer le cytosquelette de la cellule ainsi que la manière dont les cellules s'attachent à la surface. Ce marquage permet d'obtenir des informations sur la morphologie et le comportement des cellules.

Après rinçage des échantillons au PBS, la vinculine (diluée à 1/300^e) est mise en contact des cellules durant 2 h à température ambiante. Un anticorps secondaire (dilué à 1/300^e) greffé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) est ensuite mis au contact des cellules durant 1 h 30 à température ambiante. Finalement, les échantillons sont rincés au PBS et conservés à 4 °C dans le PBS jusqu'à l'observation. L'observation est réalisée avec le filtre (560/590 nm) sur le microscope à épi-fluorescence TE200 Nikon.

- Marquage à la GFAP

La protéine acide fibrillaire gliale (de l'anglais, glial fibrillary acidic protein ou GFAP) est un filament intermédiaire présent dans certaines cellules gliales du système nerveux central, les astrocytes notamment. Décrit pour la première fois en 1971, chez l'homme, le gène codant cette protéine de type III est 17q21. Elle est étroitement liée aux autres protéines du cytosquelette de cellules non épithéliales, à savoir la vimentine, la desmine ou encore la périphérine. Cette protéine participe au maintien de l'effort cellulaire et à sa forme, ainsi qu'au fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique. Le marquage à la GFAP permet d'obtenir des informations sur la morphologie, l'adhésion et la prolifération des cellules.

Après rinçage au PBS, la GFAP (diluée à 1/800^e) est mise au contact des cellules durant 2 h à température ambiante. Un anticorps secondaire (dilué à 1/1000^e) greffé à la FITC est ensuite mis en contact des cellules durant 90 min à température ambiante. Finalement,

l'ensemble est rincé au PBS et conservé à 4 °C dans le PBS jusqu'à l'observation. L'observation est réalisée avec le filtre 560/590 nm sur le microscope à épi-fluorescence TE200 Nikon.

2.4 Méthodes d'analyse et de caractérisation des films et des cellules

2.4.1 Microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation

La technique de la microbalance à cristal de quartz (QCM) est utilisée depuis de nombreuses années pour contrôler les dépôts de couches métalliques sur des supports solides (Sauerbrey 1959). Son principe repose sur les propriétés piézo-électriques du cristal de quartz. En effet, le quartz est un matériau qui se déforme sous l'application d'une différence de potentiel électrique, et réciproquement une contrainte mécanique entraîne l'apparition d'une polarisation à ses bords.

Plus récemment, la technique a été étendue au suivi de dépôts viscoélastiques en milieu liquide. Il est alors nécessaire de mesurer l'amortissement de l'oscillation de l'ensemble quartz-dépôt-liquide qui est en général beaucoup plus important que celui du quartz seul (Figure 2.6 a). A partir du temps caractéristique d'amortissement, τ , on obtient la dissipation, D , définie par :

$$D = \frac{1}{\pi f \tau} \quad (2.1)$$

où f est la fréquence d'oscillation. On parle alors de microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation (QCM-D).

Le cristal (Q-sense AB, Göteborg, Suède) se présente sous la forme d'un disque de quartz de 0,3 mm d'épaisseur environ, entouré de deux électrodes en or, l'une d'entre elles étant recouverte de silice de 100 nm d'épaisseur (Figure 2.6 b).

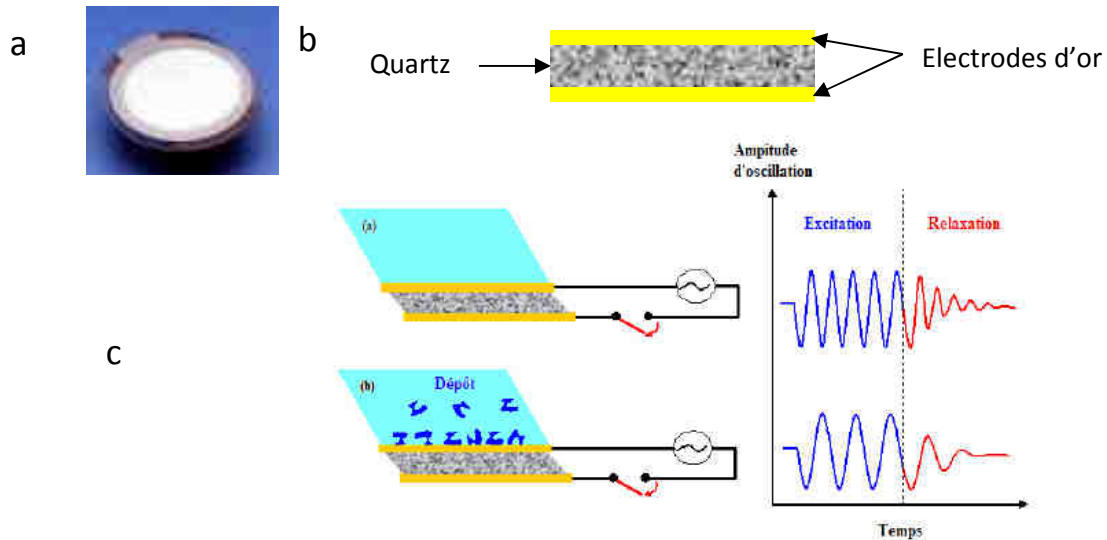


Figure 2.6 : (a) Photo et (b) coupe schématique du cristal de quartz utilisé pour les mesures de QCM (c) schéma de principe de la mesure par QCM-D.

En appliquant une différence de potentiel entre les deux faces, un mouvement de cisaillement pur est induit. Si la face inférieure de la lame est fixée sur un support immobile, la face supérieure subit un mouvement oscillant horizontal. En première approximation, l'ensemble du système est équivalent à un oscillateur harmonique. La différence de potentiel appliquée entre les électrodes est équivalente à une force mécanique extérieure qui s'applique sur l'oscillateur. Cet oscillateur harmonique est caractérisé par sa fréquence de résonance f_r :

$$f_r = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{M}} \quad (2.2)$$

où M représente la masse de l'oscillateur (le cristal de quartz) et k sa constante de raideur. Le dépôt d'une masse m d'un matériau ($m \ll M$) sur la lame de quartz, la masse totale de l'oscillateur s'élève alors à $M + m$ et la nouvelle fréquence de résonance f devient :

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{M + m}} \approx f_r \left(1 - \frac{m}{2M}\right) \quad (2.3)$$

Ainsi, le dépôt d'une masse m d'un matériau sur la lame de quartz conduit à une différence de fréquence de résonance donnée par la relation :

$$\Delta f = f - f_r = \frac{-mf_r}{2M} = -\frac{m}{C} \quad (2.4)$$

où C est une constante caractéristique de la lame de quartz appelée constante de Sauerbrey :

$$C = \frac{2M}{f_r} \quad (2.5)$$

Le principe de la microbalance à cristal de quartz consiste à mesurer la variation de fréquence de résonance Δf engendrée par le dépôt d'un matériau de masse inconnue et d'en déduire la masse déposée par unité de surface avec une précision proche du ng.cm^{-2} . De plus, une telle lame de quartz peut non seulement être mise en résonance à sa fréquence fondamentale (notée f), mais également à toutes ses harmoniques impaires ($f_v = \nu f$ où ν est un entier impair positif). A chaque harmonique correspond aussi un changement de fréquence de résonance consécutif au dépôt de matière et m sera relié à Δf_v par la relation de Sauerbrey :

$$m = -C \frac{\Delta f_v}{\nu} \quad (2.6)$$

Cette relation s'applique de façon approchée, à un dépôt de matériau en milieu liquide, mais toujours pour des films fins, rigides et uniformes (Rodahl and Kasemo 1996). Or, les films multicouches étudiés sont très hydratés et possèdent généralement un comportement semblable à celui d'un gel ou d'un liquide visqueux lorsqu'ils deviennent épais. La relation de Sauerbrey n'est alors plus applicable et un autre modèle qui tient compte des propriétés viscoélastiques des films multicouches est utilisé. Les récentes évolutions techniques ont

permis l'acquisition d'un nouveau paramètre expérimental : le facteur de dissipation visqueuse noté D qui est lié aux propriétés viscoélastiques du film déposé. Une analyse de l'évolution des fréquences et de la dissipation a été réalisée à partir du modèle proposé par Voinova et al. (Voinova *et al.* 1999). Un programme d'ordinateur a été élaboré à l'unité pour déterminer ainsi l'évolution de l'épaisseur sur plusieurs centaines de nanomètres ainsi que la viscosité et le module élastique de cisaillement pour des films multicouches de polyélectrolytes (Zhang et al. 2004).

2.4.1.1 Fonctionnement de la QCM-D

L'appareil que nous avons utilisé est de marque Q-Sense (Q-Sense AB, Göteborg, Suède) de type QCM-D E1. Il comporte une chambre de mesure thermostatée par un système Pelletier et une unité électronique interfacée à un ordinateur (Figure 2.7).



Figure 2.7 : Photographie du modèle QCM-D E1 (Q-Sense)

Cet appareil fonctionne sur le principe suivant : un générateur de fréquence excite le cristal de quartz avec une tension sinusoïdale de fréquence f_1 . Cette fréquence prend successivement la valeur de la fréquence fondamentale de résonance de la lame (~ 5 MHz) et de ses harmoniques ($\sim 15, 25$ et 35 MHz). L'excitation du cristal est imposée sur une durée très brève (quelques μ s). Après l'arrêt de l'excitation, pour chaque résonance ($\nu = 1, 3, 5, 7$), le cristal oscille librement à une fréquence de résonance proche de la fréquence d'excitation

du cristal. Ces oscillations mécaniques génèrent des oscillations électriques aux bords du cristal, qui sont enregistrées et traitées informatiquement. Ces oscillations sont amorties, comme cela est représenté sur la Figure 2.6 c. En effet, l'amortissement du signal est dû à l'énergie dissipée dans la lame, mais surtout dans le film et dans le fluide au contact de la lame. En QCM-D, les grandeurs que l'on mesure sont la fréquence de résonance et le facteur de dissipation visqueuse D (déterminé via la constante d'amortissement) pour les 4 fréquences d'excitation (5, 15, 25 et 35 MHz). Cette dissipation renseigne en principe sur les propriétés viscoélastiques des films.

2.4.1.2 Mode opératoire

Les cristaux utilisés sont recouverts d'un film de SiO_2 de 100 nm d'épaisseur. Ils possèdent une fréquence fondamentale de résonance de 5 MHz et des harmoniques à 15, 25 et 35 MHz. Avant chaque expérience, le cristal est nettoyé *in situ*, avec une solution de Hellmanex à 2 % pendant une demi-heure à température ambiante. Il est ensuite rincé avec une solution de HCl 0,1 M puis lavé à l'eau et séché à l'azote.

La construction d'un film multicouche de polyelectrolytes se fait dans la chambre de mesure de l'appareil QCM-D (Figure 2.8) où se trouve le cristal de quartz. Tout d'abord, on injecte 600 μL de la solution de polycations qui est mise en contact avec le cristal dans la cellule de mesure et laissée au repos pendant une durée déterminée. L'opération est répétée avec la solution de rinçage (150 mM de NaCl ou H_2O) puis la solution de polyanions est injectée de façon similaire. Les étapes d'injection et de rinçage sont poursuivies jusqu'à obtenir le nombre de couches voulu.



Figure 2.8 : Photographie d'une chambre de mesure en QCM-D (Q-Sense).

2.4.2 Microscopie à force atomique

2.4.2.1 Principe de fonctionnement d'un AFM

La microscopie à force atomique (AFM, Atomic Force Microscopy) est une microscopie à champ proche développée dans les années 1980 en même temps que la microscopie à effet tunnel (Binnig and Rohrer 1982). L'AFM est une variante de la microscopie à effet tunnel destinée à l'observation de la topographie des surfaces non-conductrices (Binnig *et al.* 1986). Le principe consiste à balayer la surface de l'échantillon avec une pointe très fine de nitrure de silicium (Si_3N_4 , jouant le rôle de sonde) montée à l'extrémité d'un levier de constante de raideur connue (Figure 2.9), l'ensemble formant le micro-levier ou *cantilever*, et à détecter les interactions entre cette pointe et la surface. L'AFM est ainsi utilisée pour imager les surfaces biologiques avec une résolution latérale (dans le plan (x,y)) de l'ordre de la dizaine de nanomètres et une résolution normale (en z) de l'ordre de l'Angström. Les évolutions des techniques AFM ont permis notamment la cartographie de différentes propriétés mécaniques (Burnham *et al.* 1990), électrostatiques et magnétiques (Martin *et al.* 1988).

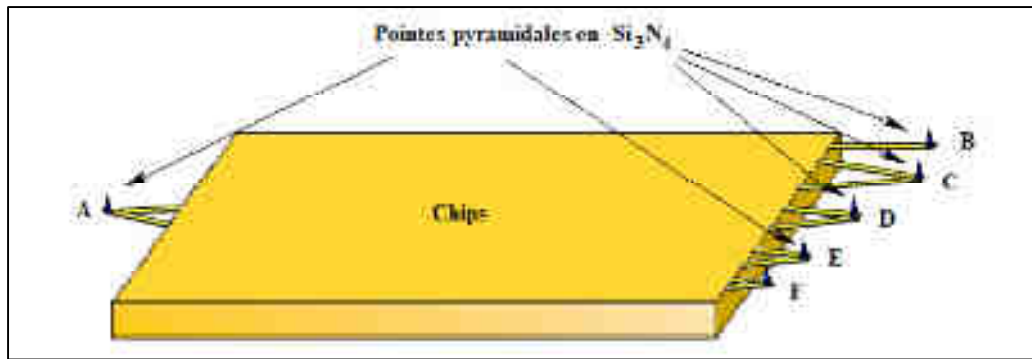


Figure 2.9 : Schéma d'un support de cantilevers à pointes pyramidales de constantes de raideur différentes (modèle MSCT-AUHW, Veeco). Généralement, seuls les cantilevers C et D à faible raideur ($0,03 \text{ N.m}^{-1}$ et $0,07 \text{ N.m}^{-1}$) sont utilisés pour l'imagerie des films de polyélectrolytes.

L'échantillon est fixé sur un tube piézo-électrique 3D qui permet un mouvement dans les 3 directions de l'espace. Lors du balayage, les interactions intermoléculaires de van der Waals de la sonde avec la surface génèrent la déflexion du cantilever. Pour mesurer la déflexion, un faisceau laser est focalisé sur l'extrémité du cantilever (zone réfléchissante) et est réfléchi sur une photodiode à quatre cadrans (Figure 2.10).

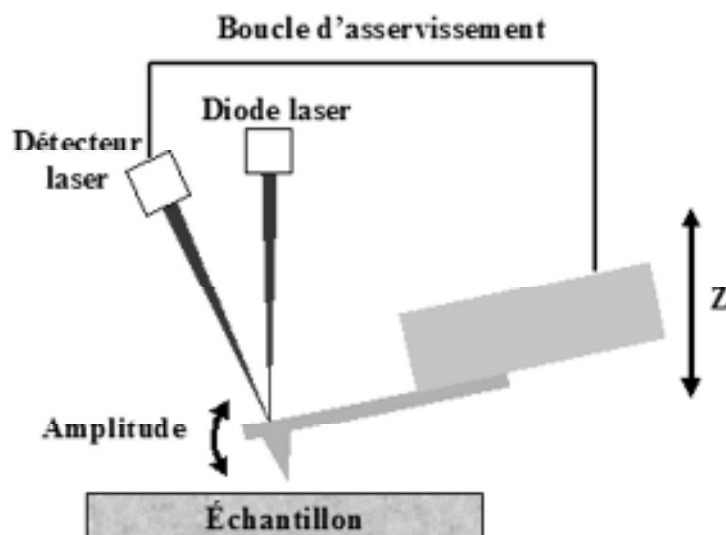


Figure 2.10 : Schéma du principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique (Université de Pau).

La différence de potentiel entre les différents quadrants indique avec précision la déflexion du cantilever. Cette méthode de mesure de la déflexion présente l'avantage de ne détecter que les variations angulaires du cantilever. En revanche, ce type de mesure est sensible à la dérive thermique et nécessite un temps d'attente avant l'obtention d'un signal stable. La déflexion est reliée à la force (F) exercée sur la pointe par la loi de Hooke :

$$F = k_c \Delta d \quad (2.7)$$

avec k_c la constante de raideur du cantilever et Δd la déflexion du cantilever.

2.4.2.2 Imagerie AFM

L'image en AFM est obtenue par la mesure de la déflexion du cantilever en chaque point (x,y) de la surface ce qui donne accès à la topographie de l'échantillon. Différents modes ont été développés afin de cartographier et de quantifier les propriétés physicochimiques de la surface : modes contact, non-contact et tapping (oscillant). Dans ce qui suit, nous nous intéresserons à l'imagerie en mode contact et en mode tapping.

- Mode contact

Dans ce mode, la pointe est maintenue en contact avec la surface de l'échantillon, généralement avec une force constante de l'ordre de 10 nN. Une boucle de rétroaction ajuste en permanence la position en z de l'échantillon à l'aide du déplacement de la céramique piézo-électrique (Figure 2.10). Le déplacement vertical (en z) du tube piézo-électrique en fonction de la position (x,y) donne alors l'image topographique de la surface.

- Mode tapping

Dans ce mode, le cantilever oscille à sa fréquence de résonance avec une certaine amplitude et la pointe interagit périodiquement avec la surface. Il est particulièrement bien adapté pour imager des échantillons mous car il réduit le risque de dégradation de la surface. L'étude de la variation d'amplitude et du déphasage entre le signal fréquentiel appliqué et celui détecté à la photodiode permet de remonter à la topographie des échantillons ainsi qu'à l'obtention des images de phase.

2.4.2.3 Mode opératoire

Les images topographiques sont réalisées sur un appareillage Nanoscope IIIa (Veeco, Santa Barbara, CA) avec des pointes pyramidales montées sur des cantilevers de constante de raideurs variables (Figure 2.9). Les films ont été observés en mode contact à une fréquence de balayage d'environ 2 Hz en utilisant des cantilevers de raideurs 0.03 N.m^{-1} (Modèle MSCT-AUHW, Veeco).

Pour les surfaces à imager en milieu hydraté, on utilise une cellule spéciale, pouvant contenir un liquide, que l'on remplit avec quelques microlitres de solution tampon (Figure 2.11).



Figure 2.11 : Photographie d'une cellule d'AFM spécialement conçue pour l'imagerie en milieu liquide.

La solution tampon est préalablement filtrée à $0,22\ \mu\text{m}$ pour éviter la présence d'impuretés et de poussières pouvant gêner le déplacement du cantilever. De plus, les surfaces ont été rincées abondamment avec la solution tampon filtrée pour les mêmes raisons.

2.4.3 Observations cellulaires

Les cellules sont observées avec un microscope (Nikon Ellipse TE200) équipé en champ clair et en épi-fluorescence (lampe au mercure 100W et filtre pour la FITC (495/520 nm) et la rhodamine (560/590 nm)). Les images sont capturées à l'aide d'une caméra numérique (DMX1200, Nikon) associée à un logiciel de capture d'images (NIS-Elements).

2.4.4 Quantification de l'orientation des fibrilles et des cellules

La distribution des angles des fibres de COL a été déterminée à l'aide de OrientationJ, un plug-in du logiciel ImageJ (Rezakhaniha *et al.* 2011). 6 images obtenues par AFM sont

transformées en format 8-bit. 64 repères de même taille sont alors dessinés par l'opérateur sur les 6 images et correspondant aux mêmes conditions expérimentales (Figure 2.12).

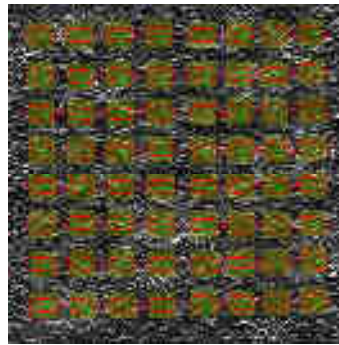


Figure 2.12 : Image obtenue par AFM sur laquelle 64 repères ont été dessinés.

Le logiciel calcule l'orientation moyenne des fibres à l'intérieur de chaque repère. 64 valeurs d'angles sont alors récupérées par image. Les $6 \times 64 = 384$ valeurs ainsi obtenues sont regroupées par classes de largeur égale à 5° . La fréquence est tracée en fonction de l'angle (Figure 2.13).

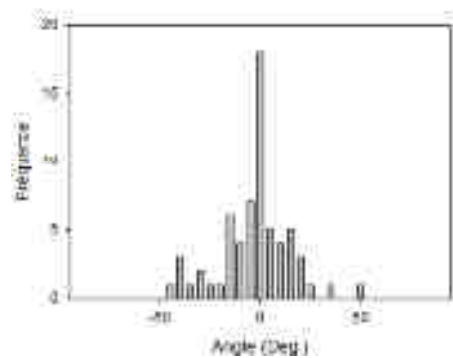


Figure 2.13 : Distribution de l'angle d'orientation des fibres de collagène déposés pour un échantillon (COL/ALG)₁₅ étiré à 100 % puis réticulé.

Afin de comparer les différentes conditions d'étirement, nous avons décidé d'utiliser les écarts-types des valeurs d'angle. Pour chaque graphique (6 images/condition), nous pouvons calculer un écart-type. La moyenne de ces écarts-types et les écarts-types correspondant ont ensuite été tracés en fonction du taux d'étirement.

Un seuillage de l'image est réalisé (Figure 2.14 a et b). La commande « Analyze particules » dans ImageJ permet de déterminer plusieurs types d'informations tels que des facteurs de forme et des angles d'orientation des objets (Figure 2.14 c). Dans ce cas précis, l'orientation est calculée comme l'angle correspondant à l'axe le plus grand compris dans l'objet, c'est-à-dire entre les deux points les plus éloignés dans l'objet. Cet axe correspond donc à l'axe d'orientation du noyau. Un total de 100 cellules par condition a été analysé (sauf contre-indication). L'influence du taux d'étirement sur l'orientation des fibroblastes 3T3 murins a été étudiée. Pour cela, les écarts-types des distributions de l'angle d'orientation pour chaque condition ont été tracés en fonction du taux d'étirement (voir Chapitre 4).

2.4.5 Spectroscopie infrarouge (IRTF)

2.4.5.1 Principe de base de l'infrarouge

La spectroscopie infrarouge est basée sur des mesures de transitions vibrationnelles, entre un état énergétique fondamental et un état excité. Ce processus est régi par les lois de la mécanique quantique. L'énergie totale d'une molécule augmente ou diminue, selon qu'il y a respectivement absorption ou émission d'un ou plusieurs quanta. Il est usuel de considérer que l'énergie totale d'une molécule est la somme de quatre contributions : l'énergie électronique (E_e), l'énergie de vibration (E_v), l'énergie de rotation (E_r) et l'énergie de translation (E_t) :

$$E_{\text{total}} = E_e + E_v + E_r + E_t \quad (2.8)$$

$$\text{avec } E_e \gg E_v \gg E_r > E_t.$$

Les changements d'énergie de vibration sont dus à des radiations dans le domaine spectral de l'infrarouge moyen (nombre d'onde de 400 à 4000 cm^{-1}). L'absorption ou l'émission d'un rayonnement infrarouge par une molécule conduit à une variation de l'énergie vibrationnelle donnée par l'équation de Bohr :

$$\Delta E = E_2 - E_1 = hf = hc\nu \quad (2.9)$$

où E_1 est l'énergie initiale, E_2 l'énergie finale, h la constante de Planck, c la vitesse de la lumière, f la fréquence de vibration (s^{-1}) et ν le nombre d'onde (cm^{-1}). Lors de l'étude des transitions vibrationnelles, il est plus commode de décrire la radiation par son nombre d'onde, ν , plutôt que par sa fréquence, f , ou par sa longueur d'onde λ (on peut rappeler que $\nu = 1/\lambda$). Les spectres infrarouges sont traditionnellement représentés en fonction du nombre d'onde, qui est souvent appelé par abus de langage "fréquence", bien qu'il soit exprimé en cm^{-1} .

Le spectre d'un composé obtenu par des méthodes de spectroscopies vibrationnelles (infrarouge, Raman) lui est propre et joue le rôle d'une véritable empreinte chimique. Parallèlement, certains groupements chimiques présentent des bandes vibrationnelles qui apparaissent toujours aux mêmes fréquences, quelle que soit la molécule qui porte ces groupements. Par exemple, le groupement méthylène $-\text{CH}_2-$ produit toujours une bande intense vers 2850 cm^{-1} (correspondant au mode d'élongation symétrique), que ce groupement appartienne à des lipides, des protéines, etc.

Les fréquences de vibration d'autres groupements peuvent varier à cause des interactions intra ou inter moléculaires. Parmi les effets intermoléculaires, la liaison hydrogène est l'un des facteurs les plus importants qui affectent les fréquences des groupements. En spectroscopie infrarouge, cette propriété permet l'étude de la structure secondaire de protéines ou de polypeptides.

2.4.5.2 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) nécessite l'utilisation d'un interféromètre de Michelson (Figure 2.15).

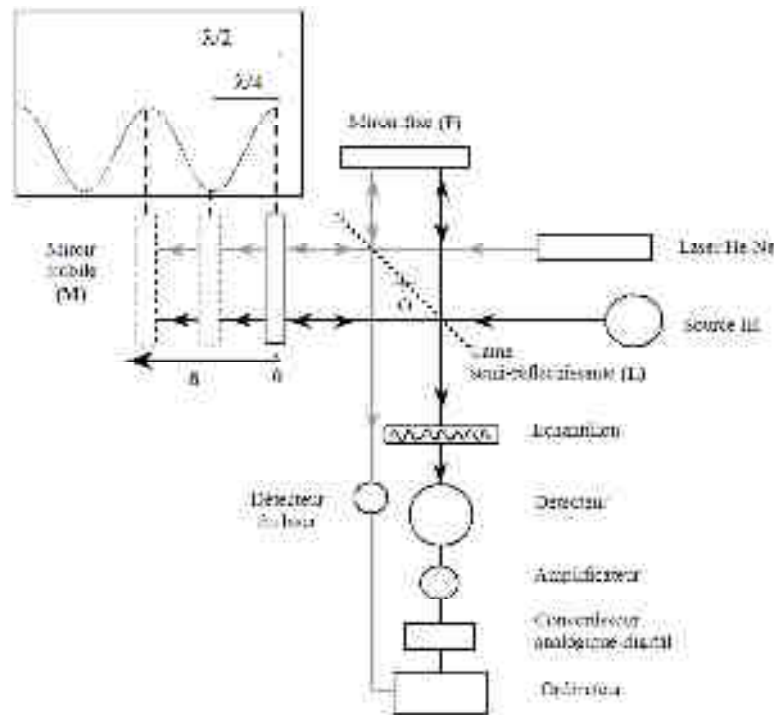


Figure 2.15 : Représentation schématique de l'interféromètre de Michelson. Encart : représentation de l'intensité (interférogramme) mesurée par le détecteur avec un faisceau monochromatique de longueur d'onde λ comme source.

Le faisceau issu d'une source infrarouge est divisé en deux faisceaux grâce à une lame séparatrice semi-réfléchissante, généralement une lame de KBr revêtue de germanium. Cette lame semi-réfléchissante (L) est montée à un angle de 45° par rapport à deux miroirs plans, dont l'un est fixe (F) et l'autre mobile (M), et qui sont placés à 90° l'un par rapport à l'autre. Lorsque le faisceau issu de la source infrarouge atteint la lame semi-réfléchissante (L), 50 % de l'intensité du faisceau incident sont réfléchis sur le miroir fixe (F), et 50 % sont transmis

au miroir mobile (M). Après réflexion des deux faisceaux sur les miroirs, ils convergent sur la lame L et sont recombinaés. Le faisceau recombinaé passe à travers l'échantillon avant d'atteindre le détecteur.

L'appareil utilisé pour nos expériences est de type Equinox IFS55/E (Bruker, Wissembourg, France), avec une gamme comprise entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} et une résolution de $0,4\text{ cm}^{-1}$. L'intensité de la lumière entrant dans l'interféromètre peut être modulée par une ouverture placée devant la source. Le laser hélium-néon émet à $632,8\text{ nm}$. Le détecteur MCT, qui requiert un refroidissement à l'azote liquide, est plus sensible que le DTGS. Le détecteur DTGS est utilisé en mode transmission et le MCT en mode réflexion totale atténuée.

2.4.5.3 Techniques d'échantillonnage

- Précautions relatives aux mesures

Dans le cadre de l'étude des polyélectrolytes en solution aqueuse, la bande de vibration de déformation H-O-H de l'eau ($\nu = 1650\text{ cm}^{-1}$) induit un chevauchement avec la bande amide I ($1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) caractéristique du collagène. Par conséquent, nos mesures ont été réalisées dans l'eau lourde (D_2O), dont la bande de déformation est déplacée à $\nu = 1215\text{ cm}^{-1}$.

D'autre part, la vapeur d'eau et le dioxyde de carbone absorbent très fortement dans l'infrarouge. Lors des mesures en IR, cette absorption réduit l'énergie totale du faisceau qui atteint le détecteur. Ceci se traduit sur les spectres par une augmentation du bruit dans les régions d'absorption de l'eau et du dioxyde de carbone. Cette augmentation est très gênante

lors de l'étude des protéines ou d'autres molécules biologiques qui présentent une faible absorption dans le même domaine de fréquence. Il est donc nécessaire de purger la cellule de mesure avec de l'air dépourvu d'eau et de dioxyde de carbone. Ainsi, le spectromètre IRTF que nous utilisons est équipé d'un sécheur d'air (série KM 25 MS/TE, Zander, Allemagne).

- IRTF en mode réflexion totale atténuée

Les multicouches de polyélectrolytes ont été étudiées par IRTF en mode réflexion totale atténuée (Attenuated Total reflection, ATR). Les principes de l'ATR ont été décrits par Harrick (Harrick 1967) et ses applications dans le domaine biologique par Fringeli et Gunthard (Fringeli and Günthard 1981). Dans notre étude, nous utilisons un cristal en ZnSe trapézoïdal (Figure 2.16).

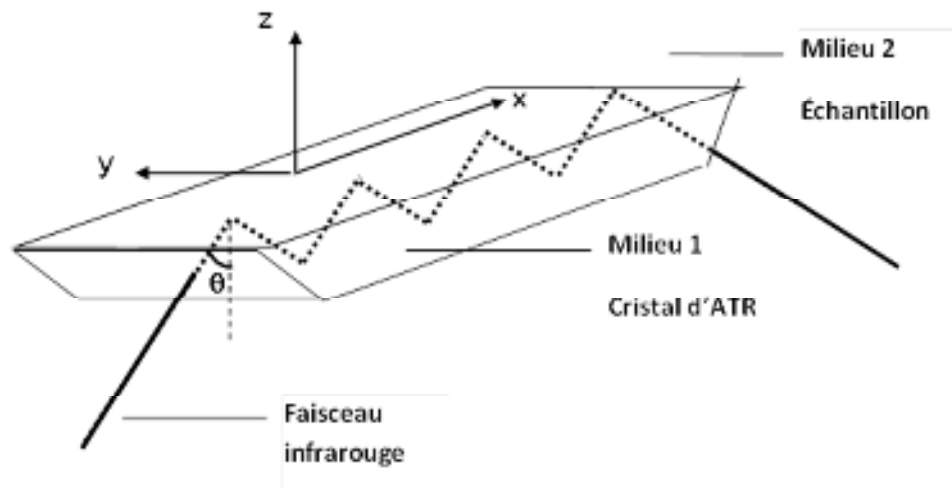


Figure 2.16 : Faisceau infrarouge traversant un cristal trapézoïdal d'ATR. Le faisceau entre normalement par une des faces du cristal ($\alpha = 45^\circ$) et frappe l'interface entre le cristal (milieu 1) et la solution aqueuse (milieu 2). Le faisceau crée une onde évanescente dans le milieu 2 au-dessus du cristal d'ATR. Le faisceau est ainsi réfléchi plusieurs fois avant de ressortir par l'autre face du prisme. L'intensité du faisceau sortant est alors mesurée par un détecteur.

Grâce à un montage optique constitué de plusieurs miroirs, le faisceau infrarouge (provenant de la lame semi-réfléchissante) est dirigé vers l'une des faces du cristal d'ATR. Ce faisceau incident tombe sur l'interface entre le cristal d'ATR (milieu 1) et la solution aqueuse au-dessus du cristal (milieu 2). Si l'angle α du faisceau incident est supérieur à l'angle critique α_c , le faisceau est totalement réfléchi à l'intérieur du cristal.

2.4.5.4 Mode opératoire

- Cellule liquide en mode transmission

Pour les mesures des spectres d'absorption des polyélectrolytes en solution, nous utilisons la cellule liquide en mode transmission avec le détecteur DTGS. La cellule se compose d'un support métallique, d'une partie en inox possédant deux injecteurs, de deux fenêtres en CaF_2 , de joints en téflon et d'un espaceur de 15 μm en téflon. Les fenêtres sont nettoyées au Hellmanex (2 %) avec du papier pour nettoyage optique (Whatman, Maidstone, Grande-Bretagne). Elles sont rincées ensuite à l'eau et à l'éthanol. D'autre part, le support en inox, les joints et l'espaceur sont lavés de même au Hellmanex, puis rincés à l'eau.

Pour le montage de la cellule, il suffit d'installer les fenêtres séparées par l'espaceur dans le support muni de son joint. La partie en inox est ensuite emboîtée avec son joint et un anneau métallique fileté est alors vissé sur la cellule pour garantir l'étanchéité de l'ensemble. La solution échantillon est alors introduite dans la cellule par l'un des injecteurs, qui sont par la suite obstrués par deux bouchons en téflon. La cellule est ensuite mise en place dans le spectroscope. Il faut attendre environ 20 min pour éliminer la vapeur d'eau dans le spectroscope avant d'effectuer la mesure du spectre de transmission de l'échantillon. 128 scans

(interférogrammes) sont enregistrés pour la référence (solution tampon utilisée) et pour l'échantillon (polypeptide + solution tampon), avec une résolution de 2 cm^{-1} .

- Cellule en mode réflexion totale atténuée :

Pour les mesures des spectres d'absorption des polypeptides en multicouches, nous utilisons la cellule en mode réflexion totale atténuée avec le détecteur MCT refroidi à l'azote liquide. La cellule se compose d'une chambre thermostatée, composée de deux parties en inox, d'un cristal de ZnSe et d'un joint qui permet d'avoir un volume de $110 \mu\text{L}$ dans la cellule. Les tuyaux en Tygon® du montage, le joint, ainsi que la chambre sont nettoyés avec du Hellmanex puis rincés à l'eau. Le cristal de ZnSe est lavé avec du Hellmanex, du méthanol et ensuite rincé à l'eau.

Le montage de la cellule s'effectue en insérant d'abord le joint dans la chambre puis le cristal de ZnSe. La deuxième partie de la chambre est ensuite emboîtée et fixée par 4 vis. La cellule est mise en place dans le spectroscope. Ensuite, il suffit d'installer les tuyaux à l'entrée et à la sortie de la chambre de mesure. Les solutions sont introduites à travers ces tuyaux par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique. Il faut attendre au moins 8 heures avant de commencer la construction de la multicouche afin d'éliminer la vapeur d'eau.

- Construction des films multicouches

Dans un premier temps, la solution tampon préparée dans D_2O est introduite dans la chambre sous un débit de $0,25 \text{ mL/min}$ en circuit fermé. 512 scans sont alors enregistrés avec une résolution de 2 cm^{-1} .

La construction des multicouches est ensuite réalisée avec les solutions de polyélectrolytes de concentration $0,5 \text{ mg/mL}$. Ces solutions sont injectées sous flux en circuit

fermé avec un débit de 0,25 mL/min. Six spectres de 128 scans sont enregistrés, ce qui correspond à un temps d'adsorption de 12 min. A la fin de chaque étape d'adsorption, la cellule est vidée et rincée par la solution tampon. Deux spectres de 128 scans, suivis d'un spectre de 512 scans, sont enregistrés. Ceci correspond à une durée de rinçage d'environ 12 min. Le film multicouche est construit en alternant l'adsorption du polyanion et du polycation. Il est très important de ne pas laisser le film multicouche trop longtemps au contact de l'air lors des changements de solutions.

2.4.6 Microscopie confocale à balayage laser

2.4.6.1 Phénomène de fluorescence

La fluorescence est la propriété d'une molécule à absorber un photon, puis à le réémettre à une longueur d'onde plus élevée (Diagramme de Jablonski, Figure 2.17). Soumise à une excitation lumineuse de longueur d'onde donnée, la molécule fluorescente est portée dans un état vibronique excité (S_1'). A température ambiante, la conversion interne entraîne une perte partielle de l'énergie absorbée par relaxation vibrationnelle et la molécule se retrouve à un état excité moins élevé en énergie (S_1). Le retour de la molécule à son état électronique fondamental (S_0) est associé à une libération d'énergie lumineuse plus faible que l'énergie associée à l'excitation lumineuse ce qui se traduit par une longueur d'onde d'émission supérieure à la longueur d'onde d'absorption (Déplacement de Stokes).

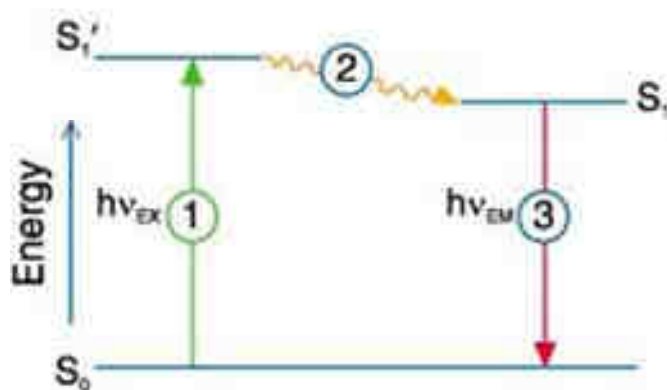


Figure 2.17 : Diagramme de Jablonski. La molécule fluorescente initialement à l'état fondamental S_0 absorbe de l'énergie lumineuse (1) et se retrouve à l'état excité S_1' . Lors de la désexcitation, la molécule perd d'abord de l'énergie par conversion interne (2) (vibrations, chocs moléculaires) et se retrouve à l'état excité d'énergie inférieure S_1 puis subit une transition électronique de l'état S_1 à son état stable S_0 (3). Cette transition libère de l'énergie sous forme lumineuse à une longueur d'onde plus élevée que la longueur d'onde d'excitation (car l'énergie d'émission est plus faible que celle d'excitation).

2.4.6.2 Sondes fluorescentes

Les sondes fluorescentes sont des molécules relativement petites pouvant être couplées de façon covalente à différents polyélectrolytes ou macromolécules biologiques. En raison de leur fort rendement quantique de fluorescence, les sondes fluorescentes peuvent fournir une très grande sensibilité de détection et permettent l'imagerie d'espèces moléculaires présentes dans les films multicouches de polyélectrolytes par des techniques de microscopie de fluorescence telle que la microscopie confocale à balayage laser.

2.4.6.3 Principe de la microscopie confocale à balayage laser

Le principe général de la microscopie confocale a été proposé par Minsky (1957). Il s'agit de diriger un faisceau laser sur un point précis (point focal) de l'échantillon à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence. Cependant, le trajet du faisceau laser dans l'échantillon génère de la fluorescence en dehors du plan focal. Pour éliminer cette fluorescence parasite, un trou de filtrage appelé pinhole (« trou d'aiguille ») est placé en amont du détecteur et ne laisse passer que la lumière en provenance du point focal (Figure 2.18). L'image ainsi obtenue présente un bon rapport signal/bruit.

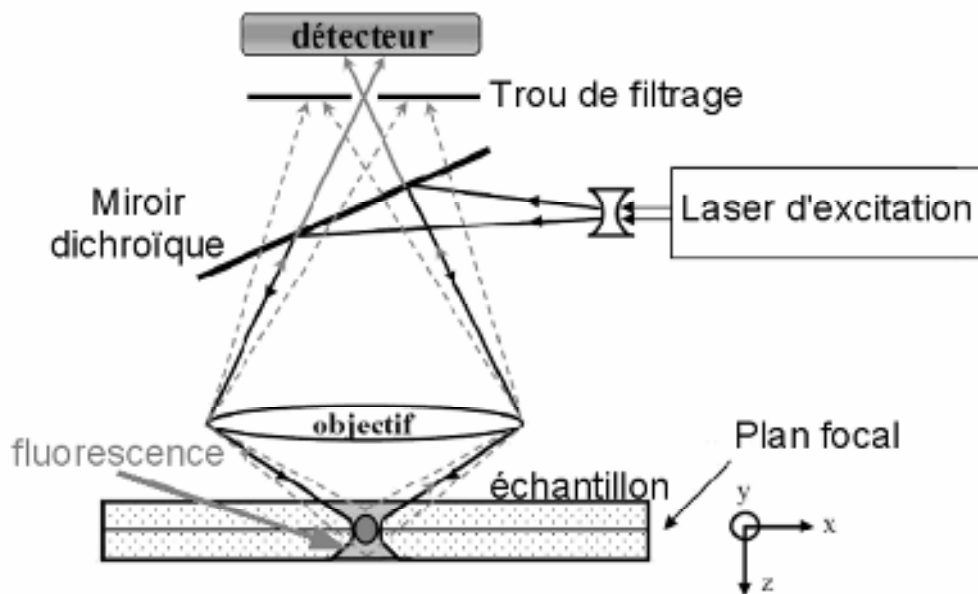


Figure 2.18 : Schéma de principe d'un microscope confocal à balayage laser. La source laser est condensée par l'intermédiaire d'une première lentille, d'un miroir dichroïque et de l'objectif en un point focal. La fluorescence émise par l'échantillon est ensuite recueillie par un photomultiplicateur. Pour éliminer la fluorescence parasite, le trou de filtrage (pinhole) est disposé au niveau du plan image de l'objectif (Université Claude Bernard Lyon I).

Le balayage de l'échantillon par le laser, en tout point (x,y) de la surface fournit une image du plan focal. Ce balayage dans le plan horizontal est obtenu à l'aide de miroirs motorisés disposés sur le trajet optique du laser. Pour le balayage vertical (en z), l'objectif est monté sur un moteur piézo-électrique. Il est ainsi possible d'obtenir des images en provenance de différents plans de l'échantillon et ainsi de reconstituer une structure en trois dimensions avec une résolution latérale et normale respectivement de $0,15 \mu\text{m}$ et $0,5 \mu\text{m}$ pour un objectif ayant une ouverture numérique de 1,4 et l'utilisation d'une longueur d'onde de 500 nm. Cette caractéristique est particulièrement intéressante pour étudier la structure normale des films multicouches épais (micrométriques) en milieu aqueux. La configuration la plus courante est le mode réflexion que nous avons utilisé pour l'observation des films multicouches. Dans ce mode, la même lentille sert à focaliser la lumière produite par la source et à former l'image sur le détecteur.

2.4.6.4 Reconstitution d'images

Le faisceau laser se déplace par lignes pour imager un plan (x,y) . La platine porte-objet, support de l'échantillon (lame de verre ou feuille de silicone fixée dans le dispositif d'étirement), est également déplacée en z d'un pas fini constant (Δz). Une image numérique des plans (x,y) du film est prise successivement pour chaque pas Δz et l'utilisation du « pinhole » permet d'imager un plan donné en éliminant les contributions des zones situées en-dessus et en-dessous de ce plan. L'image tridimensionnelle peut alors être reconstituée et l'objet peut être visualisé par tranches à l'aide du logiciel Zeiss LSM Image Browser.

Les lasers les plus couramment utilisés sont :

- Laser argon produisant trois raies : 459 nm, 488 nm (bleu) et 514 nm (bleu-vert),
- Laser hélium néon I: 543 nm (vert),
- Laser hélium néon II: 632,8 nm (rouge).

2.4.6.5 Mode opératoire

Au cours des expériences de microscopie confocale, nous avons utilisé les raies d'excitation à 488 nm fournie par le laser argon et celle à 543 nm fournie par le laser hélium néon I. Le microscope confocal utilisé est de type LSM 510 (Zeiss), monté sur un microscope AxioVert 100M (Zeiss) associé aux lasers hélium/néon et argon. Pour visualiser les films multicouches de polyélectrolytes, les polyélectrolytes sont couplés à des sondes fluorescentes, généralement l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, excitation 488 nm/émission 520 nm) ou bien la rhodamine (Rho, excitation 570 nm/émission 595 nm).

2.4.7 Microscopie électronique à balayage environnementale

2.4.7.1 Principe de la microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy en anglais) est une technique de microscopie électronique basée sur l'interaction électrons-matière, et capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon (Figure 2.19).

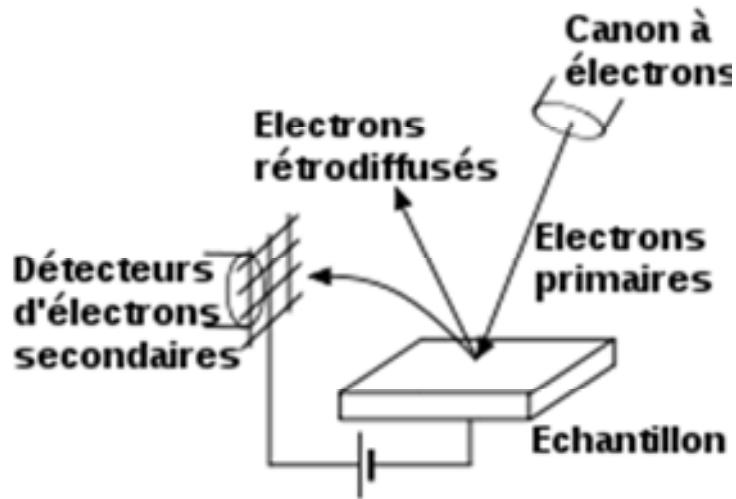


Figure 2.19 : Principe de fonctionnement d'un microscope électronique à balayage (wikipedia). Le canon produit un faisceau d'électrons qui balayent la surface d'un échantillon. Des particules telles que des électrons secondaires ou rétrodiffusés sont réémis et les signaux sont récupérés par différents détecteurs.

Basé sur les travaux de Max Knoll et Manfred von Ardenne dans les années 1930, le MEB produit un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules et rayonnements (électrons secondaires, rayons X). Ces particules et rayonnements sont analysés par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface.



Figure 2.20 : Photographie du MEB environnemental utilisé (Hitachi TM-1000).

La présence de gaz autour de l'échantillon est rendue possible en utilisant un microscope électronique à balayage environnemental (Figure 2.20). Il n'est pas nécessaire de métalliser les échantillons pour rendre la surface conductrice comme c'est le cas pour l'observation par un MEB conventionnel. En résumé, les échantillons peuvent être étudiés plus rapidement et plus facilement et avec moins de techniques de préparation, sources d'artéfacts.

2.4.7.2 Mode opératoire

L'appareil utilisé pour nos expériences est un Hitachi TM-1000. Les échantillons ont préalablement été rincés abondamment à l'eau milli-Q pour empêcher des cristaux de sel de se former pendant leur séchage.

2.4.8 *Ellipsométrie*

L'ellipsométrie est une technique optique d'analyse de surface fondée sur la mesure du changement de l'état de polarisation de la lumière après réflexion sur une surface plane (Figure 2.21). L'utilisation croissante des traitements de surface (optique, technologie des semi-conducteurs, métallurgie) a contribué au développement de techniques optiques d'analyse de surface : interférométrie, réflectométrie et ellipsométrie.

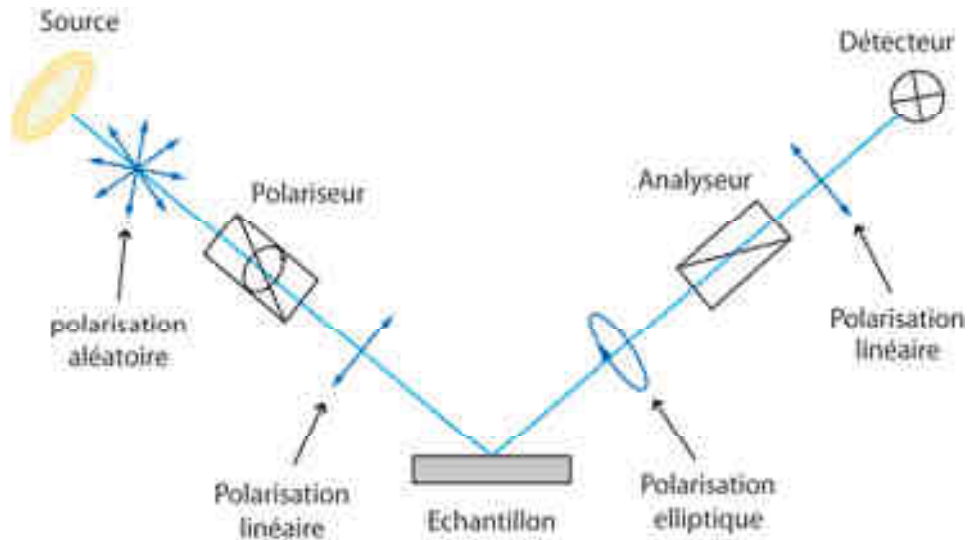


Figure 2.21 : Schéma de principe de fonctionnement d'un ellipsomètre (thèse Mathias Borella).

Les points forts de l'ellipsométrie sont son caractère non destructif et sa large gamme de mesure (mesure d'épaisseur depuis une fraction de couche monoatomique jusqu'à quelques micromètres). Il faut distinguer l'ellipsométrie à une seule longueur d'onde, qui est l'outil le plus simple, de l'ellipsométrie spectroscopique, qui effectue des mesures sur tout un spectre et permet d'interpréter des structures complexes : multicouche, rugosité d'interface, homogénéité.

3 Chapitre 3 : Films multicouches de polyélectrolytes à base de collagène réticulés par un agent naturel

3.1. Développement d'un nouveau système multicouche à base de collagène et d'alginate

3.1.1. Résumé de l'article 1

3.1.2. Article 1

3.1.3. Article 1 (Supporting information)

3.2. Applications des films multicouches COL/ALG à la fonctionnalisation d'implants en titane

3.2.1. Résumé de l'Article 2

3.2.2. Article 2

3.3. Protocoles expérimentaux pour la fonctionnalisation d'implants en titane

3.3.1. Résumé de l'Article 3

3.3.2. Article 3

3.1 Développement d'un nouveau système multicouche à base de collagène

3.1.1 Résumé de l'article 1

L'étude du système multicouche collagène (COL) / alginate (ALG) provient de la volonté de fabriquer de nouveaux revêtements entièrement naturels pour la fonctionnalisation de biomatériaux. Dans cette étude, nous introduisons les films multicouches de polyélectrolytes à base de collagène et d'alginate. La première partie de l'étude consistait à suivre la construction des films COL/ALG.

Leur construction à pH acide (un pH 3,8 s'est avéré nécessaire à la solubilisation du collagène) a été suivie par QCM-D (milieu liquide) et par ellipsométrie. L'épaisseur évolue de manière non-linéaire en fonction du nombre de paires de couches déposées. On atteint ainsi une épaisseur d'environ 300 nm pour 7 paires de couches COL/ALG déposées. La construction des films a également été suivie par spectroscopie infrarouge et potentiel zeta pour vérifier l'alternance des couches de collagène et d'alginate.

Toutefois, les architectures COL/ALG construites à pH 3,8 se dégradent à pH physiologique (pH 7,4). Nous avons donc entrepris de stabiliser les films multicouches par réticulation chimique. Une étude comparative sur la réticulation des films a été menée en utilisant d'une part, le glutaraldéhyde, un réticulant éprouvé mais cytotoxique et la génipine, un réticulant naturel d'origine végétale (*Gardénia Jasminoides*). La modulation du taux de réticulation a permis de définir un taux de réticulation seuil (pour une concentration en génipine de 100 mM), à partir duquel les films conservent leur intégrité à pH 7,4. La même étude a été réalisée avec le glutaraldéhyde. Un taux de réticulation seuil, pour une concentration en glutaraldéhyde de 50 mM, a été déterminé. La topographie des films a été

étudiée par microscopie à force atomique (AFM). Les observations par AFM montrent que les revêtements COL/ALG sont de nature fibrillaire. Les images d'AFM montrent aussi que la réticulation chimique des films avec la génipine n'altère en rien la structure fibrillaire.

Des cellules endothéliales humaines issues du cordon ombilical (HUVEC) ont été déposées sur des films (COL/ALG)₃ (3 paires de couches) pour étudier leur biocompatibilité. Ainsi, l'étude de l'attachement et de la prolifération des cellules HUVEC sur les films COL/ALG a montré, d'une part que ces films sont de bons supports pour la culture de cellules HUVEC, d'autre part que les cellules adhèrent et prolifèrent davantage sur des films réticulés avec la génipine plutôt que sur ceux réticulés avec le glutaraldéhyde.

Nous avons démontré au cours de cette étude la possibilité de fabriquer des films multicouches COL/ALG, dont l'épaisseur est modulable, et ayant une structure fibrillaire. Ces films ont été stabilisés par réticulation chimique avec du glutaraldéhyde et de la génipine afin d'être utilisés en conditions physiologiques (pH 7,4). L'étude de l'attachement et de la prolifération de cellules HUVEC sur les films COL/ALG réticulés avec la génipine a démontré la biocompatibilité de ces films et l'intérêt de choisir la génipine comme réticulant au lieu du glutaraldéhyde.

3.1.2 Article 1



Article

pubs.acs.org/biomac

Collagen-Based Fibrillar Multilayer Films Cross-Linked by a Natural Agent

Christophe Chaubaroux,^{1,2} Engin Vrana,^{1,2} Christian Debry,^{1,1} Pierre Schaaf,⁸ Bernard Senger,^{1,2} Jean-Claude Voegel,^{1,2} Youssef Hakel,^{1,2} Christian Ringwald,^{1,2} Joseph Hemmerlé,^{9,1,2} Philippe Lavalie,^{1,2} and Fouzia Boulimedais⁸

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM UMR 977, "Biomaterials and Tissue Engineering", 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France

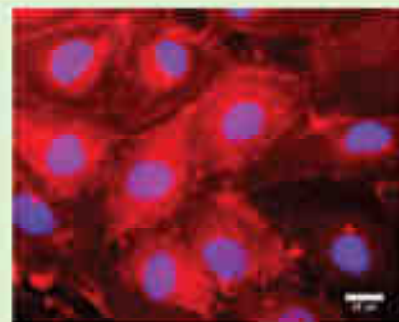
²Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 1 Place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France

³Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS UPR 22, Institut Charles Sadron, 23 rue du Loess, BP 84047, 67034 Strasbourg Cedex 2, France

⁸Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, service d'Oto-Rhino-Laryngologie, 67098 Strasbourg Cedex, France

Supporting Information

ABSTRACT: Surface functionalization plays an important role in the design of biomedical implants, especially when layer-forming cells, such as endothelial or epithelial cells, are needed. In this study, we define a novel nanoscale surface coating composed of collagen/alginate polyelectrolyte multilayers and cross-linked for stability with genipin. This buildup follows an exponential growth regime versus the number of deposition cycles with a distinct nanofibrillar structure that is not damaged by the cross-linking step. Stability and cell compatibility of the cross-linked coatings were studied with human umbilical vein endothelial cells. The surface coating can be covered by a monolayer of vascular endothelial cells within 5 days. Genipin cross-linking renders the surface more suitable for cell attachment and proliferation compared to glutaraldehyde (more conventional cross-linker) cross-linked surfaces, where cell clumps in dispersed areas were observed. In summary, it is possible with the defined system to build fibrillar structures with a nanoscale control of film thickness, which would be useful for *in vivo* applications such as inner lining of lumens for vascular and tracheal implants.



INTRODUCTION

Polyelectrolyte multilayer (PEM) films constitute surface coatings with well-defined and controlled properties, such as thickness and surface chemistry.¹ In the biomedical field, the approach is often employed to promote cell attachment and to embed bioactive molecules in the film architecture to design gene or drug delivery platforms.² Films can be prepared using synthetic polyelectrolytes, such as poly(styrene sulfonate) (PSS) and poly(allylamine hydrochloride) (PAH). Such films are relatively stiff and thus favor cell adhesion and proliferation.³ But, these polymers cannot be used in the human body because they are not approved by the U.S. FDA and also because of potential inflammatory risks. The development of PEM films using natural polyelectrolytes (polysaccharides or proteins) is of great interest for the design of (bio)material or surface coatings of devices for medical applications. A number of studies have described the buildup of films with hyaluronic acid (HA), poly(L-lysine) (PLL), chitosan (CHI), or with various proteins such as globular proteins (lysozyme, RNase, IgG),⁴ bovine⁵ or human serum albumin,⁶ myoglobin,^{7,8} hemoglobin,⁹ and cytochrome C.¹⁰ Cellular adhesion and proliferation on such films, however, are poor,

mainly because of the weak stiffness and high water content of those films.

Collagen (COL) is the most abundant extracellular matrix (ECM) protein present in the mammalian body. It has been used for biomaterial applications in countless forms, mainly as hydrogels,¹¹ foams, and PEM films.¹² In addition to the interaction of its amino acid sequences with cell adhesion receptors, physical properties of collagen have also been shown to play a main role in cellular activities. Collagen, when organized in fibrils, provides structural and mechanical support. Electrospinning is one of the most common nanofibrillar material processing techniques, but there are strong concerns about its effect on collagen denaturation.¹³ COL-based structures are comparable to those found *in vivo* and may mimic basement membranes where the fibrillar aspect of collagen constitutes an important feature.

Previously, COL-based PEM films were produced with HA,¹⁴ heparin^{15,16} (HN), chondroitin sulfate^{16,17} (CS), PSS,¹⁸ or even

Received: April 4, 2012

Revised: June 4, 2012

Published: June 4, 2012

cellulose nanowhiskers.²⁸ Alginate (ALG), a natural, degradable polysaccharide as HA, is often employed as a biomaterial.²⁹ To our knowledge, no study was realized on PEM films in which both alginate and collagen were employed. COL/ALG is a system based on natural compounds, both FDA approved, that can be easily dedicated to clinical applications. Thus, combining the properties of collagen and alginate could be of great interest to understand the COL-based multilayer film growth and for future biomedical applications.

Polyelectrolyte films built with polysaccharides and proteins or only polysaccharides raise the problem of their stability in physiological conditions and low stiffness hindering cell adhesion. These drawbacks can be avoided by film cross-linking. Several cross-linking methods exist, such as dehydrothermal treatment, which is not very efficient or chemical cross-linking. Various chemical cross-linkers such as a water-soluble carbodiimide (EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) in combination with sulfo-NHS (N-hydroxysulfo-succinimide),³¹ or bifunctional aldehydes such as glutaraldehyde,³² have been reported. However, cross-linking of natural PEM films carried out with EDC or glutaraldehyde caused significant changes in the physicochemical properties of the films.²⁵

Genipin, a natural cross-linking agent found in plants, which has been shown to be quite efficient in protein cross-linking,³⁴ represents an alternative of interest. Recently, tissue engineering strategies have used genipin with beneficial side effects, such as control of inflammation³⁵ or enhancement of fibroblastic cells attachment.³⁶

The aim of this work was first to investigate the layer-by-layer film assembly of collagen and alginate, then to characterize the physicochemical properties of the film and finally to stabilize it at physiological pH by genipin cross-linking. We also investigated the adhesion and growth of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) on this innovative multilayer architecture.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Materials and Methods. Chemicals and Polyelectrolyte Solutions. Poly(ethyleneimine) was purchased from Sigma Aldrich (PEI P314), $M_n = 750000$ Da, Saint Quentin Fallavier, France) and was used as a positively charged precursor layer. It was dissolved in 0.15 M NaCl buffer at pH 3.8 (citrate buffer) and deposited for 10 min on the substrate and then rinsed with buffer. Lyophilized collagen (COL, Type I from bovine, medical grade, Spmatrise, Lyon, France) and sodium alginate (ALG, Pemasco UPLVG medical grade, FMC Biopolymer AS Noveamatrix, Sandvika, Norway) were dissolved at a concentration of 0.5 g/L in 150 mM NaCl buffer at pH 3.8 (citrate buffer). ALG and COL were deposited alternatively on the substrate with deposition times of 10 and 15 min, respectively, before rinsing. During film construction, all the rinsing steps were performed with an aqueous NaCl solution (150 mM) at pH 3.8 for 5 min. To study the stability of the COL/ALG films at physiological pH, a last rinsing step was performed using a 150 mM NaCl buffer solution (Hepes 10 mM) at pH 7.4. Genipin was purchased from Wako Chemicals (Richmond, USA) and used without purification. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Sigma Aldrich. All solutions were prepared using ultrapure water (resistivity of 18.2 M Ω cm obtained by a Milli-Q water purification system, Millipore).

Chemical Cross-Linking of the Films. Cross-linking was performed on films deposited either on ZnSe crystals (for FTIR-ATR experiments, see below), on SiO₂-coated crystals (for quartz crystal microbalance experiments and atomic force microscopy imaging see below), or on glass slides (for ζ potential measurements and for cell culture, see below). Glutaraldehyde solutions were prepared in a 150 mM NaCl solution at pH 3.8 (citrate buffer). Genipin solutions were prepared by dissolving the adequate amount of lyophilized genipin

into a DMSO/citrate buffer (150 mM NaCl pH 3.8) mixture (1:4). The cross-linking agent solution was incubated with the multilayer film for 12 h. Rinsing steps were then performed with citrate buffer at pH 3.8.

Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring (QCM-D). The PEI/(ALG/COL) film buildup and the cross-linking process were followed in situ by quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D, QSense AB, Göteborg, Sweden). Briefly, the quartz crystal is excited at its fundamental frequency (about 5 MHz), as well as at the third, fifth, and seventh overtones (denoted by $i = 3, 5, 7$ corresponding respectively to 15, 25, and 35 MHz). Changes in the resonance frequencies (Δf_i) and in the relaxation of the vibration once the excitation is stopped are measured at these four frequencies. The relaxation gives access to the dissipation D of the vibrational energy stored in the resonator. An increase in $-\Delta f_i/\nu$ is usually associated, in a first approximation, to an increase of the mass coupled to the quartz.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Attenuated Total Reflection Mode (FTIR-ATR). The cross-linking of PEI/(ALG/COL) films deposited on a ZnSe crystal was investigated by in situ Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in the attenuated total reflection (ATR) mode with a Vertex 70 spectrophotometer (Bruker, Wissembourg, France). The experiments were performed in a deuterated 150 mM NaCl solution at pH 4. D₂O is used as the solvent instead of H₂O because the amide I band of COL is affected by the strong water absorption band located around 1643 cm⁻¹ (O–H bending), whereas the corresponding vibration in D₂O is found around 1209 cm⁻¹. During the buildup, the film was continuously in contact with the 150 mM NaCl solution. After each rinsing step following a polyelectrolyte deposition and after the final contact with the cross-linking agent solution, single-channel spectra from 128 interferograms were recorded between 700 and 4000 cm⁻¹ with a 2 cm⁻¹ resolution, using Blackman-Harris three-term apodization and the standard Bruker OPUS 7.0 software (version 3.0.4). Analysis of the raw spectrum was performed at each deposition/rinsing step. During the contact of the film with the cross-linker solution, single-channel spectra from 128 interferograms were recorded at different times.

ζ Potential Measurements. The ζ potential of surfaces was determined with ZetaCAD device (CAD Instrumentation, Les Essarts le Lou, France) and is based on streaming potential measurements. Two glass slides were mounted parallel to each other in a Plexiglas chamber. They were separated by 300- μ m thick poly(tetrafluoroethylene) spacers. The streaming potential was measured 10 times after each layer deposition. The ζ potential was calculated according to the Smolouchowski relation:³⁷

$$\zeta = \frac{\Delta E \eta_0}{\Delta P \epsilon_0 \epsilon_r}$$

where η , λ , ϵ_0 and ϵ_r correspond respectively to solution viscosity, solution conductivity, relative dielectric permittivity of solution and dielectric permittivity of vacuum. The potential difference ΔE is measured between two Ag/AgCl reference electrodes located on both sides of the measurement cell. The pressure difference ΔP between the electrolyte compartments is varied between -300 and $+300$ kPa with 30 kPa increments. The polyelectrolyte solutions were injected in the measuring cell. Measurements were taken after rinsing with citrate buffer solution (5 mM or 150 mM NaCl pH 3.8). At the end of the buildup, the cross-linker solution was injected and left in contact for 12 h before rinsing.

Atomic Force Spectroscopy (AFM). Atomic force microscopy (AFM) measurements using a MultiMode Nanoscope IV from Bruker (Palaiseau, France) were carried out in contact mode. All images were acquired after a rinsing step with water and drying with a nitrogen flow. Silicon nitride probes (MSCT model, Bruker) with a spring constant of 600 N m⁻¹ were used for imaging. Fibers thickness was determined by measuring the diameter of 10 individual filaments in a given image using the ImageJ software and calculating the average thickness and standard deviation (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2011).

Cell Compatibility. Cell Culture. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, PromoCell, Heidelberg, Germany) were used at passage 4–5 for all experiments. Cell culture was done with endothelial cell growth medium (PromoCell) with supplement mix (heparin, hydrocortisone, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, endothelial cell growth supplement, fetal calf serum, PromoCell) and 1% penicillin/streptomycin.

The samples were sterilized with UV (30 min exposure) under a tissue culture hood. Near confluent HUVEC cells were removed from flasks with TrypsinExpress (Gibco, Villebon-sur-Yvette, France) treatment, counted with a hemocytometer and then seeded into the films in 50 μ L volume with initial cell number of 1×10^4 (proliferation tests) or 5×10^4 (adhesion tests). After an attachment period of 30 min medium was completed to 1 mL and changed daily. Cell attachment, spreading and proliferation were determined by the following tests.

Vitruvit Cell Adhesion Assay. For this assay 5×10^4 HUVEC cells labeled with Calcein AM were used as per instructions of the provider. Briefly, 5×10^4 HUVEC were suspended in 1 mL of growth medium, which then was supplemented with calcein AM to bring the final concentration to 0.005 mM. Then cells were incubated at 37 °C for 30 min, washed with medium, and after centrifugation, resuspended. Cellular attachment was checked after 30 min and 1 h of incubation at 37 °C with a fluorescence microscope Nikon Eclipse TE2000 (objective lens 63 \times 1.4 NA). Images were acquired with Nikon Digital Camera (DXM 1200 or DS-Q1Mc) with ATC-1 or NIS-Elements software).

Proliferation Assay. TOXN (Sigma Aldrich) is a Rosarium-based assay, where cell number can be inferred from the decrease in the absorption of the dye at 600 nm due to metabolic activity. The test was carried out on samples at days 1, 3, and 5 with 2 h of incubation and readings from the supernatant were performed at reference wavelength of 690 nm.

Cell Morphology. After 5 days, cells on films were fixed with 3.7% paraformaldehyde and stained with Hoechst (20 μ g/mL, nuclear dye) and TRITC-Phalloidin (1 μ g/mL, binds to cytoskeletal actin). For phalloidin staining, cells were previously permeabilized with 1% Triton X for 3 min and incubated at room temperature for 1 h with phalloidin. Cells were observed with a fluorescence microscope.

■ RESULTS AND DISCUSSION

Buildup of the Film. The buildup of polyelectrolyte multilayer films based on collagen and alginate was first monitored in situ with QCM-D. Figure 1 depicts the buildup of

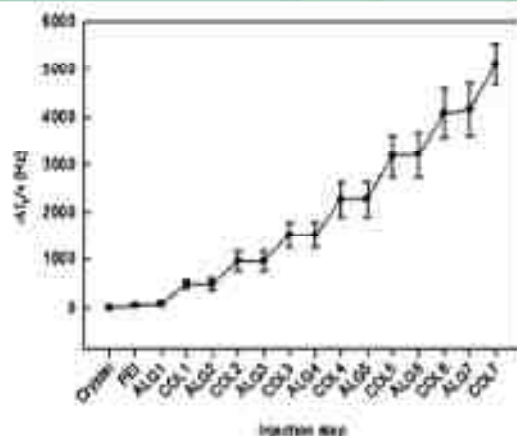


Figure 1. Buildup at pH 3.8 of a PEI/(ALG/COL)₃ multilayer film on a SiO₂-coated crystal followed by QCM-D. Evolution of the opposite of the normalized frequency shift $-\Delta f/i$ ($i = 3$) as a function of the injection step. Error bars correspond to standard deviation determined from three independent experiments.

PEI/(ALG/COL)₃ (7 bilayers) film. Each deposition step of alginate leads to a small increase in the opposite of the normalized frequency noted $-\Delta f/i$ (Supporting Information S1). This parameter is, in a first approximation, proportional to the mass of polyelectrolyte deposited. Increments in the normalized frequency due to COL injections are greater than the ALG increments. The increment in the normalized frequency because of a COL deposition increases gradually with the number of layers, which indicates that the growth regime of the film is nonlinear. Indeed, it can be verified that the growth regime is exponential up to COL6.

In situ buildup of a PEI/(ALG/COL)₃ film was also followed by FTIR-ATR. Figure 2 shows the spectra acquired after each deposition step. The characteristic bands, amide I, II, and $\delta(\text{CH}_2)/\delta(\text{CH}_3)$, respectively, at 1655, 1560, and 1460 cm^{-1} were attributed to COL.²⁸ The bands at 1604 and 1415 cm^{-1} were attributed to the antisymmetric and to the symmetric stretching of the COO⁻ groups of ALG.²⁹ The region at 950–1200 cm^{-1} is representative of the skeletal vibrations of saccharide rings of ALG, that is, C–O and C–O–C stretching peaks at 1095 and 1034 cm^{-1} .³⁰ Intensities of all these representative bands increase after each deposition step which demonstrates the layer-by-layer buildup of a PEI/(ALG/COL)₃ film.

Collagen type I, with a pI of 5.5, is positively charged at pH 3.8.³¹ Alginate (pK_a of 3.5) is slightly negatively charged at pH 3.8. Zeta potential measurements of a PEI/(ALG/COL)₃ film during its buildup and after each injection step performed at pH 3.8 in a citrate buffer 150 mM NaCl demonstrate that an overcompensation after each injection step occurs: the ζ -potential alternates between negative values (from -4.7 to -1.9 mV) after each ALG injection step and positive values (from $+1.7$ to $+3.3$ mV) after each COL deposition step (Figure 3a). However, the amplitude of this alternation is quite low compared to that of other PEM films.³² This is probably due to the low charge density carried by COL or ALG. Similar measurements, also performed at pH 3.8, but with a lower salt concentration (5 mM) revealed stronger amplitude in signals after each injection step (around 16 mV) (Figure 3b).

Morphology of the Films. Atomic force microscopy images show the formation of a homogeneous film after the deposition of only $n = 3$ pairs of layers (Figure 4a and b). At higher magnification, collagen fibrils are observed (Figure 4b).

Thicknesses of PEI/(ALG/COL)₃ and PEI/(ALG/COL)₆ films reach about 24 and 84 nm, respectively (Supporting Information S2). The layer-by-layer method is ideal to prepare films with a good control of thickness. These results show that it is possible to control the thickness of COL/ALG films at a nanometric scale by changing the number of bilayers deposited.

Stabilization by Chemical Cross-Linking. PEI/(ALG/COL)₃ films have been designed with the final aim to be applied for biomedical purposes. For this reason, after their buildup in acidic conditions (citrate buffer at pH 3.8), the films were incubated in a physiological buffer (HEPES buffer at pH 7.4).

This step was followed by QCM-D (Figure 5) which reveals that a large fraction of the PEI/(ALG/COL)₃ film was dissolved (about 80% in less than 1 min). This is probably due to the collagen chains which become negatively charged at pH 7.4 and thus to the disappearance of the electrostatic attraction with the negatively charged alginate (which remains negatively charged at pH 7.4). The same behavior was observed on the dissipation curves (Supporting Information S3).

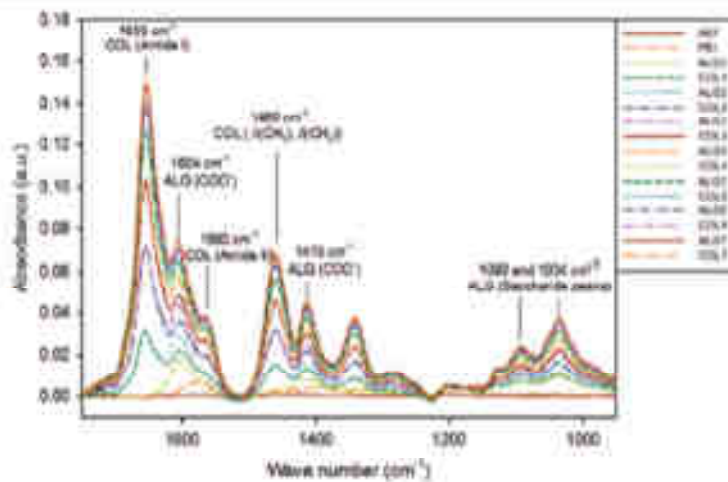


Figure 2. Evolution of FTIR-ATR spectra of a PEI/(ALG/COL) film during its buildup in 150 mM NaCl buffer solution (in D₂O) at pH 3.8. Each spectrum was recorded after each deposition of a layer followed by the rinsing step.

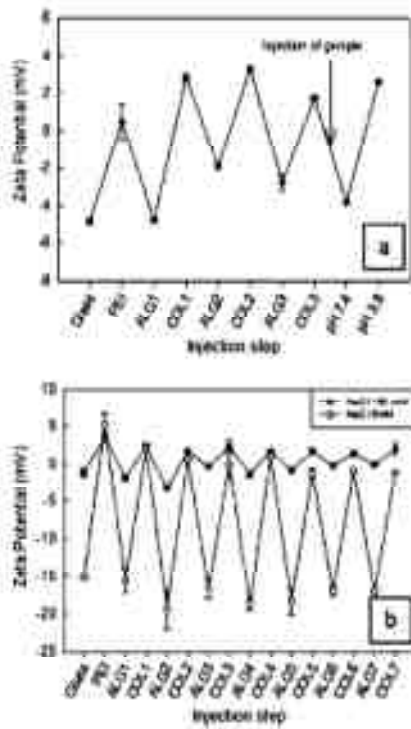


Figure 3. Evolution of the zeta potential of the surface during the buildup of a PEI/(ALG/COL) film. (a) PEI/(ALG/COL) film built at an ionic strength of 150 mM NaCl and pH 3.8 (citrate buffer). At the end of the construction, genipin is injected (indicated by an arrow on the graph, $C_{genipin} = 100$ mM) and then the film was rinsed at pH 7.4 (HEPES buffer) followed by another rinsing step with a citrate buffer at pH 3.8. (b) PEI/(ALG/COL) film built at an ionic strength of 150 mM and 5 mM NaCl. Each mean value corresponds to the average of four measurements and error bars correspond to the standard deviations. The solid lines serve only to guide the eye.

To stabilize these COL/ALG films at physiological pH, genipin, a natural molecule was used. Genipin is becoming of great interest because of its noncytotoxicity and biocompati-

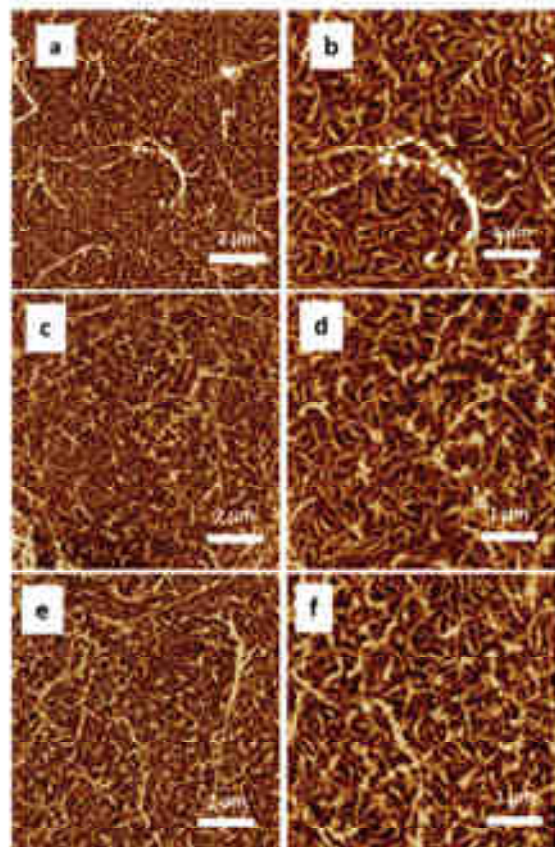


Figure 4. AFM observations of (a) PEI/(ALG/COL) film, (c) PEI/(ALG/COL) film cross-linked with genipin at 100 mM, (e) PEI/(ALG/COL) film cross-linked with glutaraldehyde at 50 mM. Panels b, d, and f are zoomed in views of panels a, c, and e, respectively. Image sizes are $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ (a, c, e) and $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ (b, d, f), and the z scale is 40 nm.

bility.^{32–34} However, the chemical process of the cross-linking of genipin with an amine-containing compound is not well-

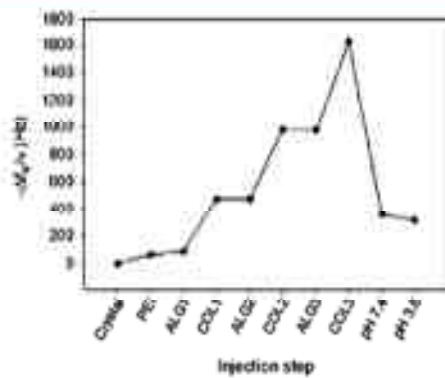


Figure 5. Buildup of a PEI/(ALG/COL)₃ multilayer film on a SiO₂-coated crystal followed by QCM-D. Evolution of the opposite of the normalized frequency shift $-\Delta f_i/v_i$ as a function of the injection step. The buildup is performed at pH 3.8 (citrate buffer) and at the end of the construction, the film is rinsed successively with a HEPES buffer at pH 7.4 and a citrate buffer at pH 3.8.

defined (Supporting Information S4). So far there are still several different mechanisms describing the chemical reaction between the primary amine (chitosan, collagen) and the carboxylic group on genipin.²⁶

The PEI/(ALG/COL)₃ multilayer film was built at pH 3.8 and then incubated overnight in a 100 mM genipin solution (Figure 6). There was only a slight frequency shift after both

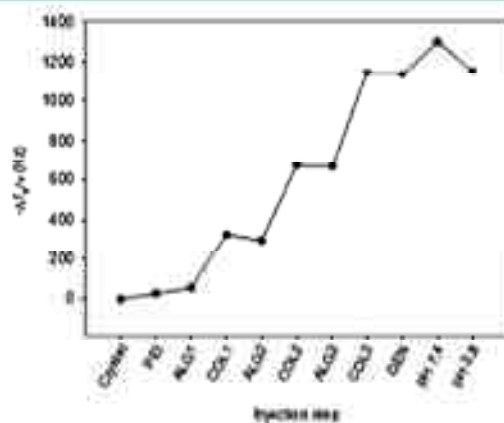


Figure 6. Buildup of a PEI/(ALG/COL)₃ multilayer film on a SiO₂-coated crystal followed by QCM-D. Evolution of the opposite of the normalized frequency shift $-\Delta f_i/v_i$ ($i = 3$). The buildup is performed at pH 3.8 (citrate buffer), then genipin (GEN) is put in contact with the architecture at a concentration of 100 mM. Finally, the film is rinsed with a HEPES buffer at pH 7.4, and then brought back to pH 3.8.

genipin injection and rinsing at pH 7.4. However, as soon as the film was brought back to pH 3.8, the frequency measured after film buildup at pH 3.8 was recovered. This clearly indicates that genipin has cross-linked the film preventing dissolution when exposed to a buffer solution at pH 7.4. Thus, the QCM-D measurements confirm the cross-linking suggested by ζ potential measurements (Figure 3a): the results showed that the film resists the pH jump from 3.8 to 7.4, whereas it would have been degraded without cross-linking.

The influence of genipin concentration on the cross-linking ratio was evaluated through QCM-D experiments. PEI/(ALG/COL)₃ films built at pH 3.8 were cross-linked with genipin overnight at concentrations ranging from 5 up to 180 mM, then rinsed with a buffer solution at pH 7.4, and finally rinsed with a buffer solution at pH 3.8. The ratios of the frequencies before and after cross-linking (both at pH 3.8) were evaluated (Figure 7a). Similar experiments were performed with glutaraldehyde (Figure 7b). Glutaraldehyde has been previously used for cross-linking CHI/ALG film to render them more robust.³

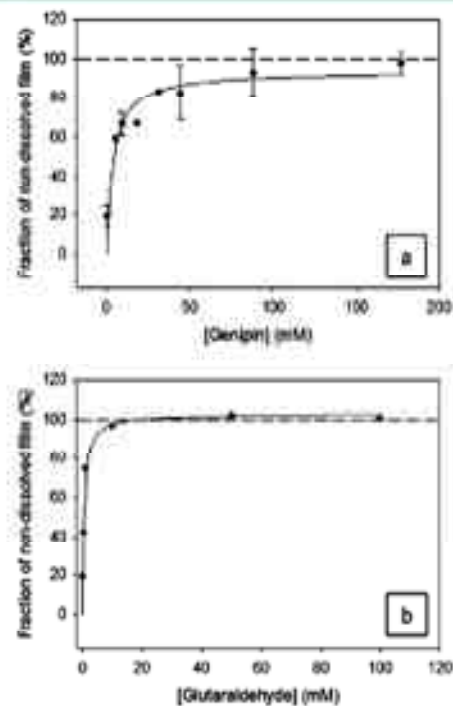


Figure 7. (a) Influence of the genipin concentration on the fraction of non-dissolved film for PEI/(ALG/COL)₃ films built at pH 3.8, cross-linked with genipin, rinsed with a pH 7.4 buffer solution and then brought back at pH 3.8. These amounts were evaluated through QCM-D experiments and correspond to the frequency evaluated after cross-linking of the films and rinsing steps at pH 7.4 and pH 3.8. (b) Similar to (a) except that cross-linking was performed with glutaraldehyde. Error bars correspond to standard deviations determined from three independent experiments. The solid lines were only to guide the eye.

For cell culture experiments, the integrity of the films is needed. As indicated in Figure 7a and b, the films are stable once the plateau is reached, independently of the cross-linker concentration. Concentrations of 100 mM (genipin) and 50 mM (glutaraldehyde) were thus chosen to produce films that resist to biological conditions (pH 7.4). PEI/(ALG/COL)₃ films cross-linked with genipin at 100 mM and glutaraldehyde at 50 mM were observed with AFM after rinsing at pH 7.4 and after being brought back to pH 3.8 (Figure 4). Both films reveal similar structures and morphologies than in the native state (without cross-linking), that is, a roughness of about $R_a = 4$ nm and thickness of 20–22 nm (Supporting Information S5).

Figure 4c and d show the structure of a COL/ALG film after cross-linking with genipin at 100 mM. The fibrillar structure of the film is preserved and is very similar to the structure of a noncross-linked film, with collagen fibers randomly organized. However, the structure of a COL/ALG film cross-linked with glutaraldehyde at 50 mM is slightly different (Figure 4e and f). The structure is still organized in fibrils, but these are a bit aggregated, which might induce a reduction of available active sites distributed along them. This could be due to glutaraldehyde molecules that make more bonds between the collagen chains than genipin ones during the cross-linking step. The mean diameters of the collagen fibrils are 75 ± 8 nm (uncross-linked), 74 ± 8 nm (cross-linked with genipin) and 82 ± 13 nm (cross-linked with glutaraldehyde). These results indicate that the fibrillar structure of a COL/ALG film is not altered after cross-linking with genipin at 100 mM. Increasing the genipin concentration for cross-linking would probably make the film stiffer due to a large number of bonds between COL chains and thereby render the fibrillar structure like that of a glutaraldehyde-cross-linked film, whereas it is of major importance to keep the collagen fibrils intact for biomedical applications.

COL/ALG film cross-linking was also followed by FTIR-ATR spectroscopy. Genipin (100 mM) or glutaraldehyde (50 mM) solutions were put in contact with PEI/(ALG/COL) films during 12 h. For both cross-linkers, we monitored the spectra of the films in contact with a 150 mM NaCl solution at pH 3.8 before and after cross-linking by genipin (Figure 8a) or by glutaraldehyde (Figure 8b). After cross-linking at pH 3.8, the films were rinsed consecutively with 150 mM NaCl solutions at pH 3.8, pH 7.4, and again at pH 3.8 to remove the noncross-linked material. The difference between the spectra before and after cross-linking is also shown in Figure 8. After cross-linking with genipin (Figure 8a), the absorbance values in the 1410–1500 cm^{-1} region increase, demonstrating the formation of conjugated alkene and an increase in the CH_2 content (1440 cm^{-1}).³³ A small increase of the band at 1560 cm^{-1} is visible because of the formation of alkene bonds (stretch of $\text{C}=\text{C}$ bond) because of the presence of genipin-cross-linked COL (Figure 8a).^{33,34} The decrease of the amide I (1654 cm^{-1}) band of COL and of the carboxylic band of ALG (1604 cm^{-1}) could be explained by a small loss of noncross-linked material during the rinsing step at pH 7.4.

When COL/ALG films are cross-linked with glutaraldehyde (Figure 8b), a small decrease of the carboxylic group band of ALG can be seen at 1604 and 1415 cm^{-1} , probably due to a small loss of noncross-linked ALG after the rinsing at pH 7.4. This result is similar to that found by Alves et al.⁵ on CHI/ALG films cross-linked by glutaraldehyde. Iminic bonds ($\text{C}=\text{N}$) are visible at 1640 and 1670 cm^{-1} materializing the cross-linking of COL by glutaraldehyde.³¹

Cell Culture on PEI/(ALG/COL) Films. HUVEC culture was followed on PEI/(ALG/COL) films cross-linked either with genipin at 100 mM or with glutaraldehyde at 50 mM. Initial HUVEC attachment after 1 h of incubation was determined with sybrant cell adhesion assay. Figure 9a and b shows the initial attachment of HUVEC onto glutaraldehyde and genipin-cross-linked samples after 1 h of incubation. Cell attachment is notably better onto genipin-cross-linked samples than on glutaraldehyde ones.

Cell morphology was studied after 5 days of incubation time (Figure 9c and d). Cells are scarcely present onto glutaraldehyde cross-linked samples. However, onto genipin

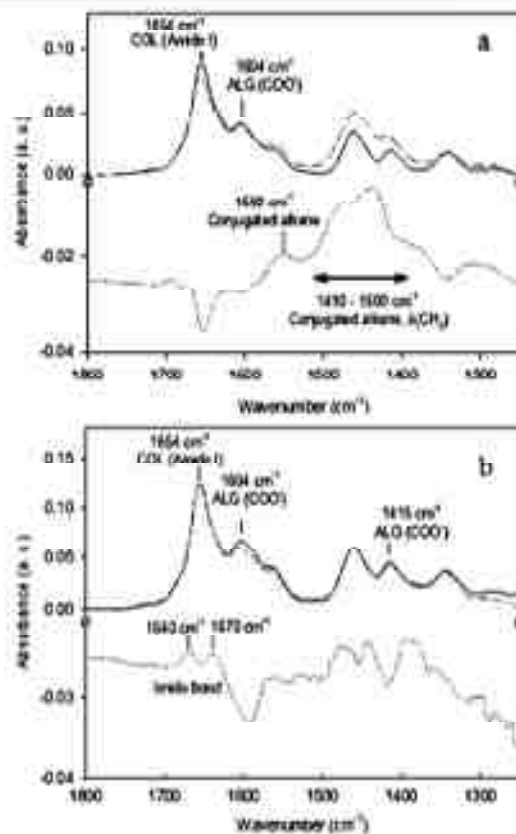


Figure 8. Evolution of the FTIR-ATR spectra of a PEI/(ALG/COL) film before (solid line) and after cross-linking (dashed line) with (a) genipin at 100 mM or (b) glutaraldehyde at 50 mM. Dotted line: difference between the two spectra. The film buildup step was performed at 150 mM NaCl in D_2O at pH 3.8. The cross-linking step was followed by a rinsing step at pH 7.4. Then the films were brought back to pH 3.8 before analysis.

cross-linked samples, a confluent HUVEC layer is obtained. Cells seem not only to attach well but also to spread and proliferate well on genipin-cross-linked films. The good proliferation of HUVEC on those films may be due to the good cell attachment in the early period, which is not the case onto glutaraldehyde-cross-linked films.

Proliferation was determined with resazurin-based assay (see Materials and Methods) to determine metabolic activity at 1, 3, and 5 days (Figure 9e). Proliferation results are accompanied by one-way ANOVA tests to show significant differences. Absorption intensities corresponding to glutaraldehyde-cross-linked films are significantly lower than those corresponding to TCPS, independently of the incubation period ($p < 0.05$). On the contrary, absorption intensities corresponding to genipin-cross-linked films are significantly higher than those corresponding to TCPS at day 1 and 3 ($p < 0.01$ at day 3). At day 5, results are quite equivalent as absorption intensities corresponding to genipin-cross-linked films seem to reach a maximum. This may confirm that within an incubation time of 5 days, an endothelial cell layer is formed onto the surface. The cell behavior on genipin-cross-linked films is quite equivalent to the cell behavior on TCPS after 5 days of incubation. Furthermore, absorption intensities corresponding

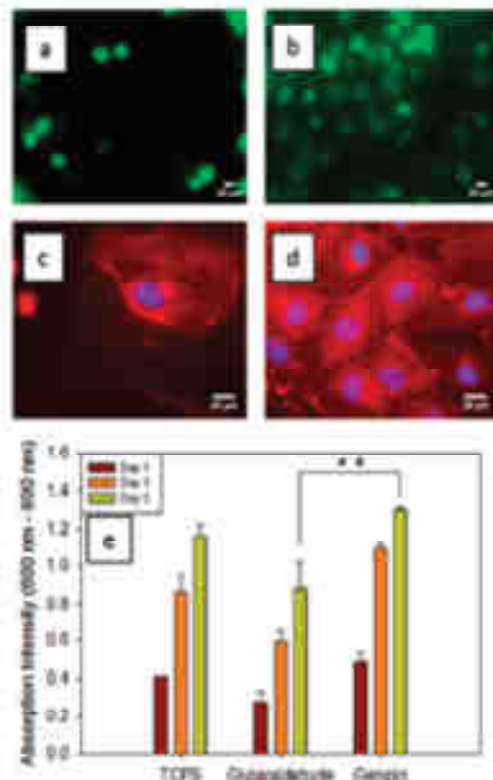


Figure 9. HUVEC behavior on PBL/(ALG/COL)₃ film cross-linked with glutaraldehyde at 50 mM (a and c) or cross-linked with genipin at 100 mM (b and d). (a, b) Initial cell attachment was determined with vibrant cell adhesion assay and calcein-AM staining after 1 h of incubation. (c, d) Cell morphology was studied after 5 days of incubation with Hoechst labeling (nuclear dye = blue) and TRITC-Phalloidin (cytoskeletal actin dye = red). (e) Proliferation was determined with Resazurin-based assay to determine metabolic activity (absorbance of the supernatant at 600 nm-690 nm) at 1, 3, and 5 days. One-Way ANOVA tests were performed for each time of incubation (day 1, 3, 5). The significant difference between absorption intensities of genipin and glutaraldehyde cross-linked films at day 5 is reported on the graph ($p < 0.01$ indicated by **). For the sake of clarity, significant differences at day 1 and 3 are not reported on the graph but mentioned in the text. Error bars correspond to standard deviation determined from measurements performed in three different wells per condition (i.e., TCPS, genipin-cross-linked films and glutaraldehyde-cross-linked films).

to genipin-cross-linked films are significantly higher than those corresponding to glutaraldehyde-cross-linked ones, independently of the incubation period ($p < 0.001$ at day 3; $p < 0.01$ at day 5, Figure 9e).

These results indicate that genipin-cross-linked PBL/(ALG/COL)₃ surfaces constitute ideal substrates for cellular proliferation. This may originate from the fact that cells sense a surface that contains collagen which mimics ECM. Moreover, genipin, alginate, and collagen are natural and nontoxic molecules, whereas, toxicity of glutaraldehyde toward cells is well-known.

CONCLUSIONS

We successfully demonstrated the possibility to build collagen/alginate multilayer films, which show a supralinear growth

regime. The cross-linking of such films with genipin, a natural cross-linker, allowed film stabilization at physiological conditions which is of primary importance for their biomedical applications. After cross-linking with genipin, cells adhere better than on films cross-linked with glutaraldehyde. In addition, it was shown that cell proliferation is substantially improved on genipin-cross-linked films compared to TCPS in the early period of incubation. Films based on natural molecules and ECM components could be used in the future as a biocompatible and cell stimulating material to coat prostheses.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Buildup of a PBL/(ALG/COL)₃ film followed by QCM-D, AFM observations of PBL/(ALG/COL)₃ and PBL/(ALG/COL)₃ films, thickness analysis. Buildup of PBL/(ALG/COL)₃ films followed by QCM-D (dissipation curves). Schematic collagen cross-linking reactions by (a) genipin and (b) glutaraldehyde. AFM observation of PBL/(ALG/COL)₃ films cross-linked with either (a) genipin at 100 mM or (b) glutaraldehyde at 50 mM, thickness analysis. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +33 (0)3 68 85 33 77; Fax: +33 (0)3 68 85 33 79; E-mail: joseph.hemmerle@inserm.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

C.C. is indebted to the Faculté de Chirurgie Dentaire of Strasbourg for financial support. We acknowledge the Région Alsace and the Pôle Matériau et Nanosciences d'Alsace (PMNA) for financial contribution. We thank K. Benmlih for the buildup of the Zeta Potential cell and C. Bouthier for her assistance.

REFERENCES

- (1) Alota, N. M.; Picot, C.; Mano, J. F. Self Assembling and Crosslinking of Polyelectrolyte Multilayer Films of Chitosan and Alginate Studied by QCM and IR Spectroscopy. *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30* (8), 776–785.
- (2) (a) Buck, M. E.; Lynn, D. M. Layer-by-Layer Fabrication of Covalently Crosslinked and Reactive Polymer Multilayers Using Aldehyde-Functionalized Copolymers: A Platform for the Design of Functional Biomaterials. *Adv. Eng. Mater.* **2011**, *13* (10), B543–B552. (b) Mu, Y. J.; Hammond, P. T. Catechol-Modified Polymers in Layer-by-Layer Assembly to Enhance Stability and Sustain Release of Biomolecules: A Biomimetic Approach. *Chem. Mater.* **2011**, *23* (24), 5349–5357.
- (3) Boura, C.; Müller, S.; Vautier, D.; Dumas, D.; Schaaf, P.; Voegelé, J.-C.; Stille, J. F.; Meunier, P. Endothelial Cell Interactions with Polyelectrolyte Multilayer Films. *Biomaterials* **2008**, *29* (22), 4568–4575.
- (4) Izumrudov, V. A.; Kharlampova, E.; Sokhidsvidi, S. A. Multilayers of a Globular Protein and a Weak Polyelectrolyte: Role of Polyelectrolyte Ionization in Growth and Decomposition in Salt Solutions. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (3), 1792–1798.
- (5) Nisöl, T. R.; Kiziminski, A.; Muffat, J.; Parker, B.; Wehner, N.; Ring, S. G. The Deposition and Stability of Pectin/Protein and Pectin/Protein/Alginate/Protein Multilayers. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *70* (4), 393–405.

- (6) An, Z. H.; Tan, C.; Lu, G.; Mülwald, H.; Zhong, S. P.; Cui, Y.; Li, J. B. Fabrication and Characterization of Human Serum Albumin and 1-(4-Dimethylamino)pyridine Acid Microcapsules Based on Template Technique. *Chem. Mater.* **2005**, *17* (10), 2514–2519.
- (7) Pizzo, E. M.; Baran, M. M.; Brett, C. M. A. Mechanism of Formation and Construction of Self-Assembled Myoglobin/Hyaluronic Acid Multilayer Films: An Electrochemical QCM, Impedance, and AFM Study. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (46), 15354–15361.
- (8) Mao, X.; Liu, Y.; Gao, W. C.; Fu, N. F. Layer-by-layer assembly of collagen and electroactive myoglobin. *Bioelectrochemistry* **2010**, *79* (2), 187–192.
- (9) Zhang, F.; Liu, L. J.; Wu, Q.; Liu, X. F. Design and in Vitro Biodegradation of Novel Hepatocyte-Targetable (Galactose Polyelectrolyte/Hemoglobin) Multilayers and Microcapsules. *Macromol. Chem. Phys.* **2009**, *210* (12), 1052–1060.
- (10) Kappelrodt, C.; Lindat, F.; Wollenberger, U. Cytochrome *c*/Polyelectrolyte Multilayers Investigated by E-QCM-D: Effect of Temperature on the Assembly Structure. *Langmuir* **2011**, *27* (13), 3309–3315.
- (11) Kopeček, J. Hydrogel Biomaterials: A Smart Future? *Biomaterials* **2007**, *28* (34), 5185–5192.
- (12) Zhang, J.; Sogge, B.; Vanier, D.; Picot, C.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Lavalle, P. Natural Polyelectrolyte Films Based on Layer-by-Layer Deposition of Collagen and Hyaluronic Acid. *Biomaterials* **2005**, *26* (16), 3553–3561.
- (13) Zruggli, D. L.; Khoo, S. T.; Yew, E. S. Y.; Thirathar, A. K.; Tong, Y. W.; Yung, L. Y. L.; Huttmacher, D. W.; Sheppard, C.; Raghunath, M. Electro-spinning of Pure Collagen Nano-Fibers: Just an Expensive Way to Make Gelatin? *Biomaterials* **2008**, *29* (15), 2293–2305.
- (14) Johansson, J. A.; Hällberg, T.; Herranen, M.; Sjöberg, L.; Elfvén, U.; Håbo, J. Build-up of Collagen and Hyaluronic Acid Polyelectrolyte Multilayers. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (3), 1353–1359.
- (15) Chen, J. L.; Li, Q. L.; Chen, J. Y.; Chen, C.; Huang, N. Improving Blood Compatibility of Titanium by Coating Collagen-Heparin Multilayers. *Appl. Surf. Sci.* **2009**, *255* (15), 6994–6999.
- (16) Mhanna, R. F.; Vitro, J.; Zenobi-Wong, M. Layer-by-Layer Films Made from Extracellular Matrix Macromolecules on Siloxane Substrates. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (3), 409–416.
- (17) Gong, Y. H.; Zhu, Y. B.; Liu, Y. X.; Ma, Z. W.; Gao, C. Y.; Shen, J. C. Layer-by-Layer Assembly of Chondroitin Sulfate and Collagen on Aminolyzed Poly(L-Lactic Acid) Porous Scaffolds to Enhance Their Chondrogenesis. *Acta Biomater.* **2007**, *3* (8), 677–685.
- (18) Grant, G. G. S.; Koktysh, D. S.; Yun, B.; Matti, R. L.; Kotov, N. A. Layer-By-Layer Assembly of Collagen Thin Films: Controlled Thickness and Biocompatibility. *Biomed. Microdevices* **2001**, *3* (4), 301–306.
- (19) de Mesquita, J. P.; Patrício, P. S.; Dourado, C. L.; Pêgo, D. F. S.; de Oliveira, L. C. A.; Pereira, E. V. Hybrid Layer-by-Layer Assembly Based on Animal and Vegetable Structural Materials: Multilayered Films of Collagen and Cellulose Nanowhiskers. *Soft Matter* **2011**, *7* (9), 4405–4413.
- (20) Lee, K. Y.; Minney, D. J. Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37* (1), 106–126.
- (21) Richard, L.; Boumediene, F.; Lavalle, P.; Matheon, J.; Ferrais, E.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Picot, C. Improvement of Stability and Cell Adhesion Properties of Polyelectrolyte Multilayer Films by Chemical Cross-Linking. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (2), 284–294.
- (22) Leporatti, S.; Vogt, A.; Mülbauer, B.; Sukhorukov, G.; Dornath, R.; Mülwald, H. Scanning Force Microscopy Investigation of Polyelectrolyte Nano- and Microcapsule Wall Texture. *Langmuir* **2000**, *16* (9), 4059–4063.
- (23) Martins, G. V.; Merino, B. G.; Mann, J. E.; Alyn, N. M. Crosslink Effect and Albumin Adsorption onto Chitosan/Alginate Multilayered Systems: An in situ QCM-D Study. *Macromol. Biosci.* **2010**, *10* (12), 1444–1455.
- (24) Big, A.; Cojari, G.; Panzavolta, S.; Rowat, N.; Kulmi, K. Stabilization of Gelatin Films by Crosslinking with Genipin. *Biomaterials* **2002**, *23* (24), 4827–4832.
- (25) Koo, H. J.; Lim, K. H.; Jung, H. J.; Park, E. H. Anti-inflammatory Evaluation of Ganderia Extract, Geniposide and Genipin. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *103* (3), 496–500.
- (26) Hillberg, A. L.; Holms, C. A.; Tabrizian, M. Effect of Genipin Cross-Linking on the Cellular Adhesion Properties of Layer-by-Layer Assembled Polyelectrolyte Films. *Biomaterials* **2009**, *30* (27), 4463–4470.
- (27) Smoluchowski, M. *Handb. Elektrostat. Magn.* **1921**, *2*, 336.
- (28) (a) Vidal, B. D.; Melo, M. L. S. Collagen: Type I Amide I Band Infrared Spectroscopy. *Micron* **2011**, *42* (3), 283–289. (b) Belluchic, K.; Nosen, R.; Gouppilau, G.; Petibou, C. Collagen Types Analysis and Differentiation by FTIR Spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395* (3), 829–837.
- (29) Valentia, R.; Bonaldi, B.; Garma, E.; Di Rienzo, F.; Quignard, F. Accessibility of the Functional Groups of Chitosan Arranged Probed by FT-IR Monitored Deuteration. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (11), 3646–3650.
- (30) Gomez-Ordóñez, E.; Raperos, P. FTIR-ATR Spectroscopy As a Tool for Polysaccharide Identification in Fiddle Brown and Red Seaweeds. *Food Hydrocolloids* **2011**, *25* (6), 1519–1520.
- (31) Barham, N.; Izzett, L.; Cristofani, C.; Cascone, M. G.; Polizzio, G.; Pizzano, G. Biomimetic Materials Based on Blends of Collagen and Poly(Acrylic Acid). *J. Appl. Polym. Sci.* **1999**, *72* (7), 971–976.
- (32) Picot, C.; Lavalle, P.; Hubert, P.; Cuivier, F. J. G.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C. Budding Mechanism for Poly(L-lysine)/Hyaluronic Acid Films onto a Solid Surface. *Langmuir* **2001**, *17* (23), 7414–7424.
- (33) Mi, F.-L.; Shyu, S.-S.; Peng, C.-K. Characterization of Ring-Opening Polymerization of Genipin and pH-Dependent Cross-Linking Reaction between Chitosan and Genipin. *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* **2008**, *46* (10), 1955–2000.
- (34) Madhavi, K.; Bédouk, D.; Tan, W. Role of Genipin Crosslinking and Biomolecule Conditioning in Collagen-Based Biopolymer: Potential for Vascular Media Regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2011**, *97A* (1), 16–26.
- (35) Yanagawa, H.; Ogawa, Y.; Kojima, K.; Ito, M. Construction of Proto-cellular Structures under Simulated Primitive Earth Conditions. *Origins Life Evol. B* **1988**, *18* (3), 179–207.
- (36) Bet, S.; Kuo, G. T.; Haurin, V. Bone Tissue Engineering on Patterned Collagen Films: An in situ QCM-D Study. *Biomaterials* **2005**, *26* (14), 1977–1986.

3.1.3 Article 1 (Supporting Information)

S1. Buildup of PEI/(ALG/COL)₇ multilayer films on a SiO₂-coated crystal followed by QCM-D.

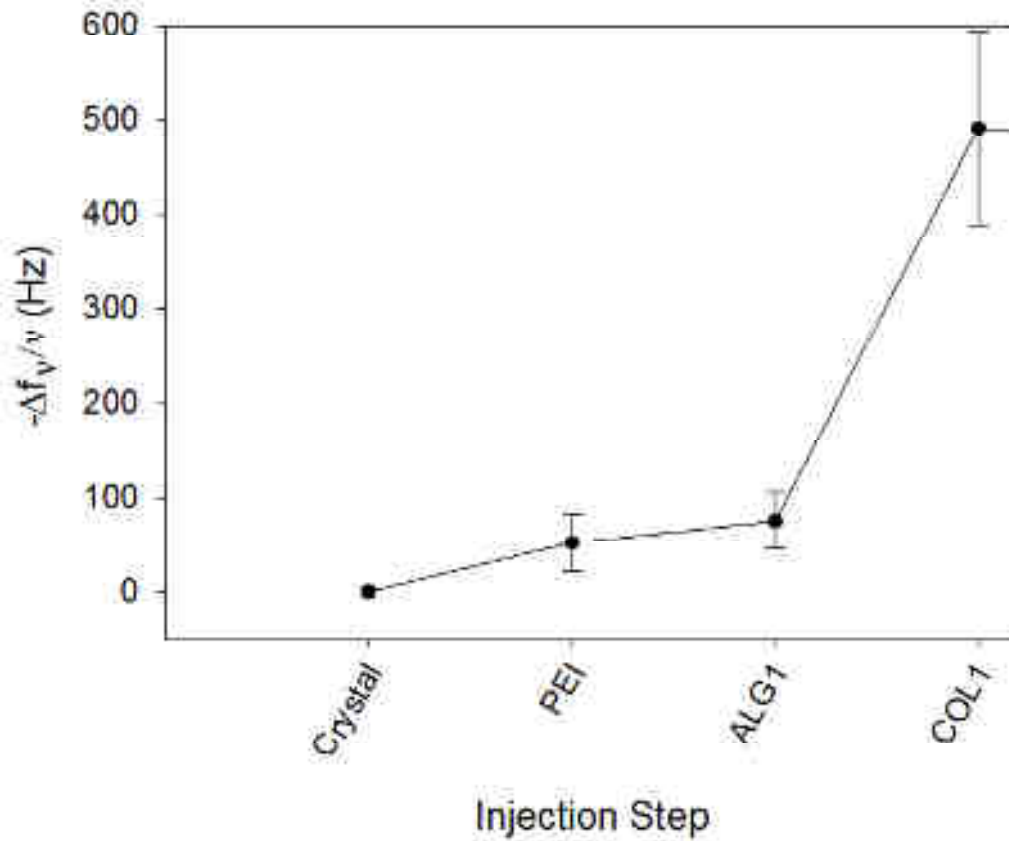


Figure S1. Buildup of PEI/(ALG/COL)₇ multilayer films on a SiO₂-coated crystal followed by QCM-D. The buildup is performed at pH 3.8 (citrate buffer).

S2. PEI/(ALG/COL)_n films observed with an AFM.

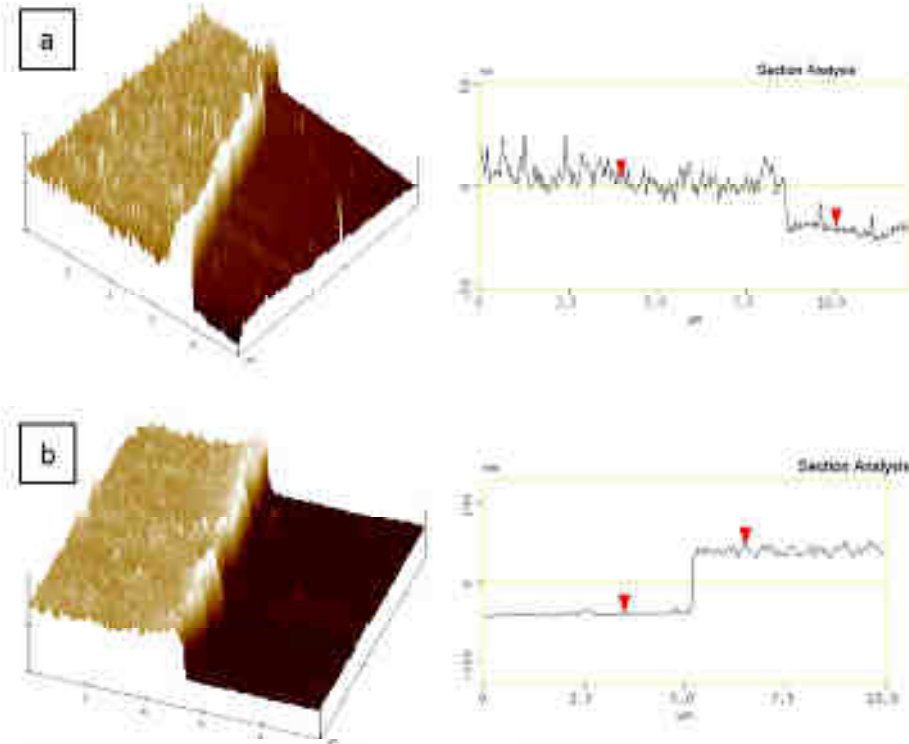


Figure S2. AFM observation of a (a) PEI/(ALG/COL)₃ film, and (b) a PEI/(ALG/COL)₇ film. The buildup was performed at pH 3.8. A scratch was performed to determine the thickness of the films. Image size is $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ and Z scale is 50 nm (a) and 100 nm (b).

S3. Buildup of PEI/(ALG/COL)₃ multilayer films on a SiO₂-coated crystal followed by QCM-D.

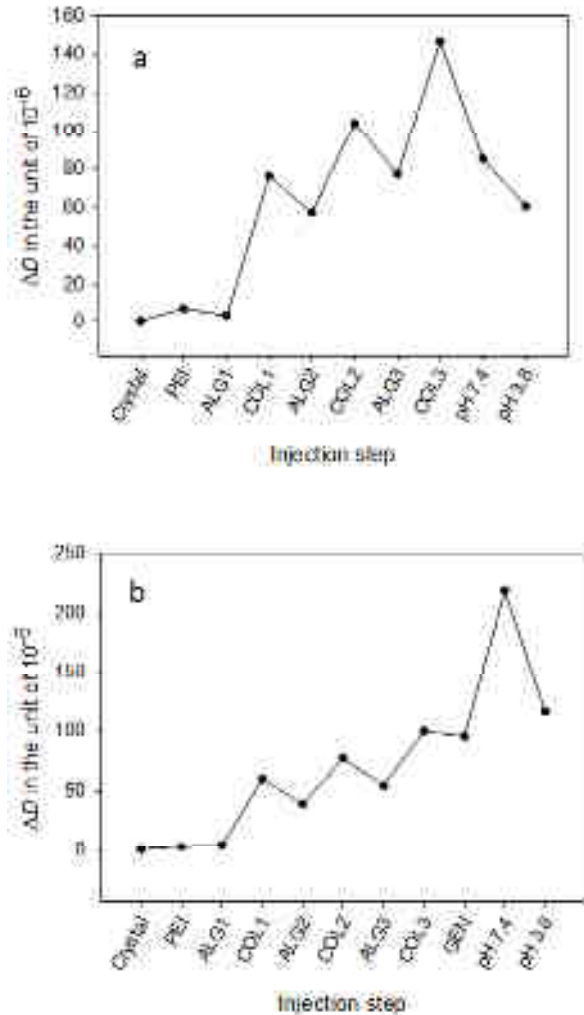
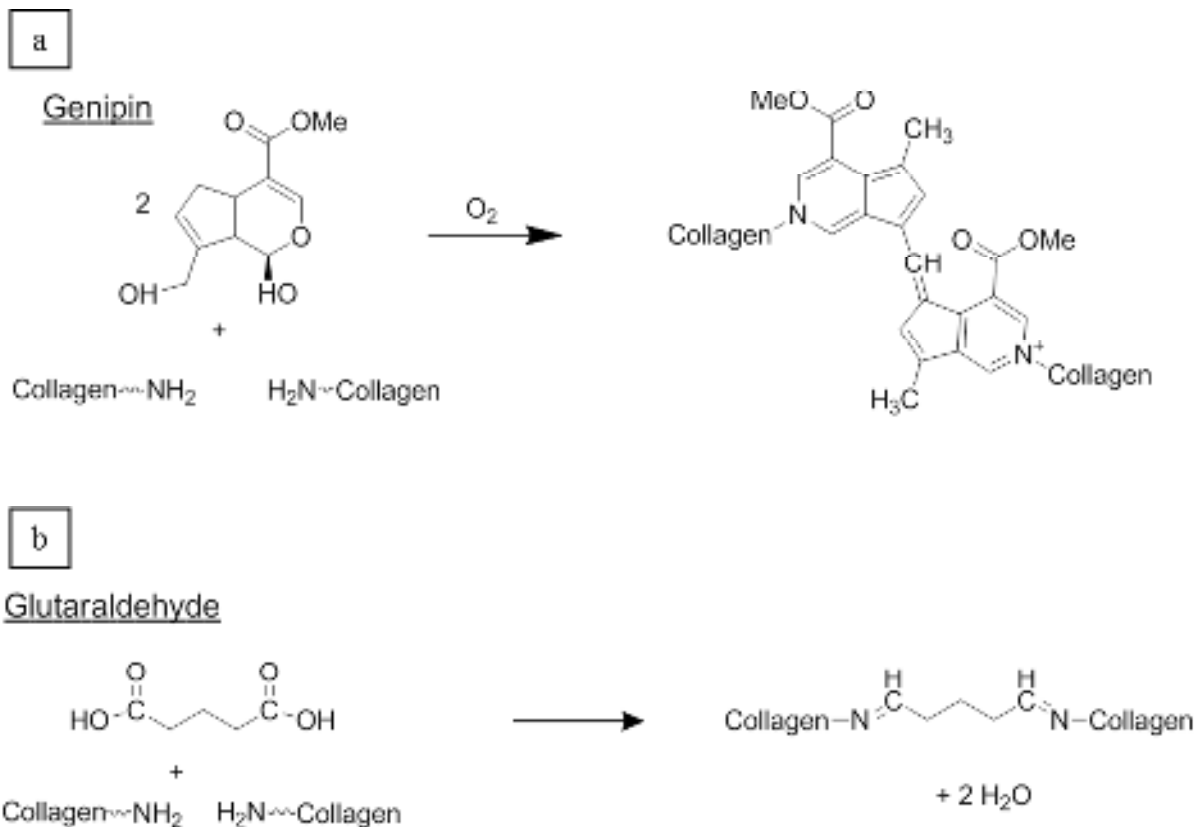


Figure S3. Buildup of PEI/(ALG/COL)₃ multilayer films on a SiO₂-coated crystal followed by QCM-D. Evolution of the dissipation ($\nu = 3$). a: The buildup is performed at pH 3.8 (citrate buffer), then the film is rinsed with a HEPES buffer at pH 7.4, and then brought back to pH 3.8. b: The buildup is performed at pH 3.8 (citrate buffer), then genipin (GEN) is put in contact with the architecture at a concentration of 100 mM. Finally, the film is rinsed with a HEPES buffer at pH 7.4, and then brought back to pH 3.8.

S4. Schematic collagen cross-linking reactions by (a) genipin and (b) glutaraldehyde.



Scheme S4. Schematic collagen cross-linking reactions by (a) genipin and (b) glutaraldehyde that both covalently binds to amino groups, but can also bind to other crosslinker molecules.

S5. AFM observation of a PEI/(ALG/COL)₃ film cross-linked with (a) genipin at 100 mM, and (b) glutaraldehyde at 50 mM.

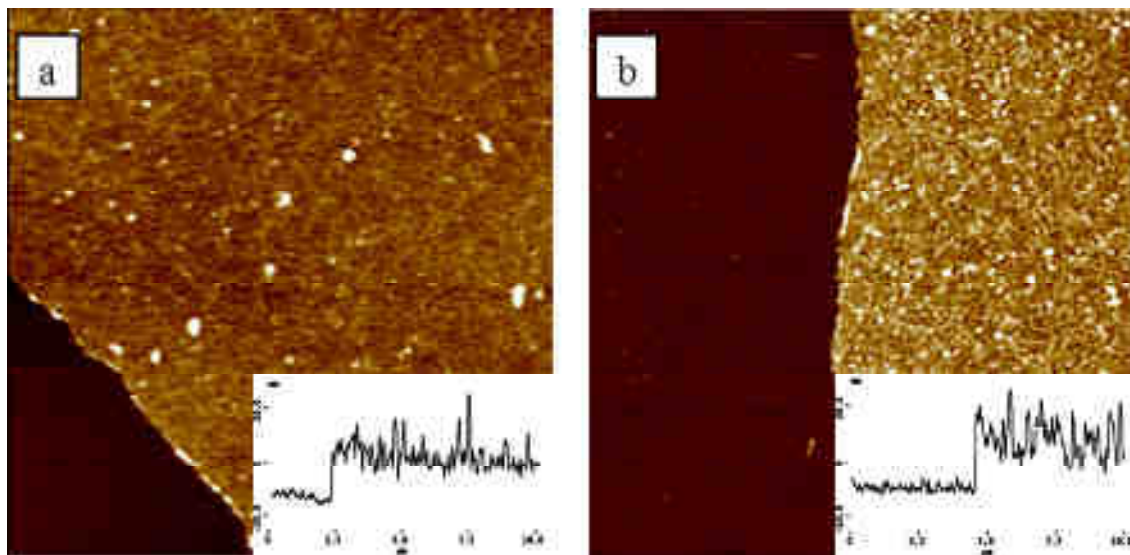


Figure S5. AFM observation of a PEI/(ALG/COL)₃ film cross-linked with (a) genipin at 100 mM, and (b) glutaraldehyde at 50 mM. The buildup was performed at pH 3.8. The cross-linking step was followed by a rinsing step at pH 7.4 after what they were brought back at pH 3.8 before imaging.

3.2 Applications des films multicouches collagène/alginate à la fonctionnalisation de prothèse en titane

3.2.1 Résumé de l'article 2

Lors d'une précédente étude, il a été démontré que des implants en titane macroporeux, colonisés *in vivo* par du tissu épithélial, sont des supports relativement adéquats pour le remplacement de la trachée chez la chèvre (Dupret-Bories *et al.* 2011). Toutefois, il reste à surmonter des problèmes d'inflammation et de non vascularisation des tissus. Dans le but d'améliorer l'intégration de ces implants, nous nous sommes proposés de fonctionnaliser leur surface avec les films multicouches collagène/alginate mis au point dans le cadre de cette thèse (cf. article 1).

Les implants en titane, constitués de billes de 400 à 500 μm de diamètre, ont été préalablement recouverts par un gel microporeux de poly(L-acide lactique) (PLLA). Ce gel permet d'éviter la colonisation intraluminale par les cellules (autres que des cellules épithéliales respiratoires) déposées sur la surface extérieure des implants et qui pourraient migrer vers l'intérieur.

Pour fonctionnaliser la surface intraluminale des implants et ainsi favoriser la reconstruction de tissu épithélial, nous avons utilisé le système multicouche collagène/alginate (cf. 3.1) développé dans le présent travail. Nous avons notamment étudié l'adhésion et la prolifération de cellules épithéliales respiratoires (humaines) sur les supports en titane recouverts par ces films. Les films collagène/alginate (24 paires de couches) ont été construits à pH 3,8, à l'aide d'un robot de trempage. Les conditions de construction sont décrites dans le premier article de ce travail. Comme le montrent les images obtenues en microscopie électronique à balayage environnementale (MEBE), les films collagène/alginate recouvrent la

surface des implants de manière homogène, aussi bien des microbilles en titane, que des microbilles sur lesquelles sont déposés des gels de PLLA poreux. L'étude de l'adhésion et de la prolifération de cellules épithéliales a montré que les implants recouverts avec le gel de PLLA puis fonctionnalisés par les films collagène/alginate réticulés avec la génipine constituent des supports plus favorables pour la culture de ces cellules que les implants uniquement recouverts de gel poreux en PLLA. La fonctionnalisation des implants en titane, recouverts préalablement avec un gel microporeux en PLLA, par les films multicouches collagène/alginate, pourrait constituer une alternative satisfaisante pour la réparation de trachées.

3.2.2 Article 2

ARTICLE

BIOTECHNOLOGY
BIOENGINEERING**Modification of Macroporous Titanium Tracheal Implants With Biodegradable Structures: Tracking In Vivo Integration for Determination of Optimal In Situ Epithelialization Conditions**

Nihal Engin Vrana,¹ Agnes Dupret-Bories,^{1,2} Charlotte Boch,^{1,3}
Christophe Chaubarois,¹ Christelle Coraux,⁴ Dominique Vautier,^{1,3}
Fouzia Bouhadjra,¹ Youssef Haikel,^{1,3} Christian Debry,^{1,2}
Mario-Helene Metz-Boutigue,^{1,3} Philippe Lavalie^{1,3}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM Unité 977,
11 Rue Humann, 67085 Strasbourg, France; telephone: +33-3-68-85-30-61;

fax: +33-3-68-85-33-79; e-mail: philippe.lavalie@inserm.fr

²Hôpital Universitaire de Strasbourg, Service Otorhinolaryngologie,
67098 Strasbourg, France

³Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 1 Place de l'Hôpital,
67000 Strasbourg, France

⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM Unité 903,
51092 Reims, France

⁵Centre National de la Recherche Scientifique, UPR 22, Institut Charles Sadron,
23 rue du Laënn, BP 84037, 67034 Strasbourg Cedex 2, France

ABSTRACT: Previously, we showed that macroporous titanium implants, colonized *in vivo* together with an epithelial graft, are viable options for tracheal replacement in sheep. To decrease the number of operating steps, biomaterial-based replacements for epithelial graft and intramuscular implantation were developed in the present study. Hybrid macroporous PLLA/titanium tracheal implants were designed to decrease initial stenosis and provide a surface for epithelialization. They have been implanted in New Zealand white rabbits as tracheal substitutes and compared to intramuscular implantation samples. Moreover, a basement membrane like coating of the implant surface was also designed by Layer-by-Layer (LbL) method with collagen and alginate. The results showed that the commencement of stenosis can be prevented by the macroporous PLLA. For determination of the optimum time point of epithelialization after implantation, HPLC analysis of blood samples, C-reactive protein (CRP), and Chromogranin A (CGA)

analyses and histology were carried out. Following 3 weeks the implant would be ready for epithelialization with respect to the amount of tissue integration. Calcein-AM labeled epithelial cell seeding showed that after 3 weeks implant surfaces were suitable for their attachment. CRP readings were steady after an initial rise in the first week. Crosslinked collagen/alginate structures show nanofibrillarity and they form uniform films over the implant surfaces without damaging the macroporosity of the PLLA body. Human respiratory epithelial cells proliferated and migrated on these surfaces which provided a better alternative to PLLA film surface. In conclusion, collagen/alginate LbL coated hybrid PLLA/titanium implants are viable options for tracheal replacement, together with *in situ* epithelialization.

Biotchnol. Bioeng. 2012;109: 2134–2146.

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

KEYWORDS: titanium; trachea; implant; epithelialization; porosity; *in vivo*; CGA; collagen

Correspondence to: P. Lavalie

Contract grant sponsor: Région Alsace

Contract grant sponsor: FIMM6 Pôle Médical et Neurosciences d'Alsace

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Received: 10 October 2011; Revision received: 18 January 2012

Accepted: 26 January 2012

Accepted manuscript online 15 February 2012

Article first published online 2 March 2012 in Wiley Online Library

<http://dx.doi.org/10.1002/bt.21456>

DOI: 10.1002/bt.21456

Introduction

Respiratory system diseases are one of the most common causes of death, especially in high income countries. For example, tracheal restenosis might become a problem that

can necessitate surgery. Moreover, tracheal damages due to cancer and congenital diseases are quite common and even though end-to-end anastomosis can solve the problem for short lengths (<5 cm) (Roomans, 2010), implants are necessary if the problem is recurrent or the damaged area is above the limits of end-to-end anastomosis. In recent years several commendable efforts in the area of trachea tissue engineering have given very promising results, especially the systems by Macchiarini et al. (2008) and DeJaere et al. (2010) have shown possible routes to improve the life quality of the patients. However these systems are dependent on allograft availability and long production periods with high level of expertise, which has also been stated by the authors themselves in their recent reviews (Bader and Macchiarini, 2010). It was also discussed widely whether a more in situ approach might be more beneficial, as trachea is surgically accessible. In such a scheme, some elements of the regeneration were either induced within the body or added after the initial implantation. It has been suggested that the in situ epithelialization might be a more attractive option as the survival of the epithelial cells seeded initially is low (Nakamura et al., 2009; Omori et al., 2008). Thus more widespread and easily transferable solutions are still necessary. Current systems available are either dependent on cartilage production for the airway stability and prevention of collapse or in vivo migration of epithelial cells or epithelial graft for remodeling. Porous titanium technology is an interesting venue to provide biointegrable implants without any concerns on mechanical stability. It is composed of titanium microbeads put together with an electrical arc, which provides a macroporous, low density and yet stable implant system, with an easier production procedure compared to most of porous metal implants (Ryun et al., 2006). We have previously utilized the titanium tracheal implants in mice and sheep with success (Schultz et al., 2002, 2004). Other groups also had success with titanium implants in respiratory area (Janssen et al., 2009, 2010). Trachea is an advantageous area for reconstruction as it is a thin tissue with relatively low oxygen requirements (Kalathur et al., 2010). The main problems encountered in the previous studies were the absence of epithelium for large defects for which there is no possibility of epithelium grafting (skin, mouth, etc.) and an extensive risk of restenosis. Grafting can be a viable route but its availability is a difficulty and more importantly the differentiated state of the graft might cause problems in the target area (such as hair growth or excessive keratinization), so a surface that would facilitate epithelial growth is a preferred option. Utilization of the advantageous properties of two material types either as hybrids or composites is generally necessary in the field of biomaterials (Nicole et al., 2010). Thus utilizing a biodegradable structure, such as a polymer foam, within a biocompatible metallic template is feasible to control cellular movement also in vivo. A prerequisite for colonization of a porous tracheal implant is also to prevent restenosis of the lumen. For example, macropores with a microporous body might slow down

cellular movement and prevent restenosis as we have shown previously (Vrana et al., 2011). However, advantages of a single operation procedure can be overshadowed by the extent of immune response. Also the level of epithelial migration might not be enough for full coverage of the implant surface. For this end, a surface coating which would provide a better medium for epithelial movement would be useful. Layer-by-Layer (LbL) film production methodology can be used for this aim with natural molecules such as collagen to make surface properties more basement membrane-like. Lbl films are extremely simple to build up and they are also very versatile, that is, thickness, surface charge, mechanical parameters can be tuned easily by changing the number of deposited layers or the buildup conditions.

In order to decide for the right conditions for in situ epithelialization, monitoring of implant integration is necessary. Also since in trachea, implant failures can be fatal, their strict monitoring is crucial (Grillo, 2002). For this end, rabbits are appropriate models as the shape and relative size of their trachea is a good mimic of that of humans when normalized with respect to their size (ten Haken et al., 2004). Moreover, rabbits are very susceptible to pulmonary infections, as such infections have been cited as one of the most common causes of death in rabbits (Rougier et al., 2006). This is relevant in the sense that, after implantation due to the unsterile environment of the tracheal passage, the implants might be prone to development of infection. This should be taken into account as the products are developed for clinical trials, for example, abrupt loss of animals has regularly been reported during similar interventions (Tatekawa et al., 2010). Due to these problems, detection of infections and removal of pathogens are extremely important. Determination of pathogen related peptides and monitoring of inflammation/immune system response related molecules by HPLC can thus provide crucial information on post-operational care of the implant. It has been utilized in a wide range of in vivo detection problems such as transplant rejection or cytotoxic material presence (Horak et al., 2001; Tseng et al., 2005). C-reactive protein (CRP) is a common marker of inflammation and infection which has found clinical applications. Recently Chromogranin A (CGA, a severity marker) has also been shown to be a potent agent for infection and inflammatory response detection. In this study, a hybrid implant for tracheal implantation was monitored in vivo for its effectiveness in cell movement control and for determination of the right time period for secondary seeding of autologous epithelial cells with respect to animal health and tissue integration. The monitoring of animal condition was done by regular blood tests based on CRP levels and characterization of blood samples by HPLC and subsequent peptide sequencing. Also a surface modification of the implant was done with LbL methodology to provide a more basement membrane like structure for migration of respiratory epithelium cells.

Materials and Methods

Materials

Rabbit CRP ELISA kit was obtained from Helica Biosystems (Fullerton, CA) and Triple Express from Gibco/Life Technologies (Saint Aubin, France). Collagen type I (source: Bovine) was obtained from Symatase (Lyon, France) and alginate from Novamatrix (Promova UPLVG medical grade, FMC Biopolymers AS Novamatrix, Sandvika, Norway). The rest of the products including, poly(L-lactic acid) (PLLA), chloroform, dioxane, and TOX-8 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Animal Model

Adult White New Zealand rabbits ($n=10$) between 14 and 16 weeks of age and weighing an average of 3 kg were used for this study. Each animal received care in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 2010) and were housed in our institution at the Faculty of Medicine of Strasbourg (France). They were fed with a standard laboratory diet and tap water ad libitum.

Methods

Implant Production

Porous titanium implants with an inner diameter of 7 mm and an outer diameter of 10 mm were produced by previously defined electric-arc discharge method by using 400–500 μm diameter beads. The final length of the implants was 2 cm. A circular insert of 6 mm was cut out of the implant body with a laser beam (IREPA Laser, Illkirch, France) for posthumous investigations. The body of the implant was filled with a porous PLLA structure as described previously (Vrana et al., 2011). Briefly a 6% PLLA solution in dioxane/water binary mixture (v/v 87/13%) was heated to 60°C and then poured into a Teflon mold that contains the titanium implant. Then the system was left for gelation at room temperature for 30 min and then frozen at -70°C overnight. The system was rendered porous by freeze extraction with an extraction step in cold 80% ethanol (Goh and Ooi, 2008). The outer element of the mold has been previously removed and only the mandrel was left. This creates an open pore gradient from extraluminal side to intraluminal side. Finally a layer of 1% PLLA film was laid into the lumen and then precipitated with the application of EtOH (Fig. 1). The final structure was washed several times with PBS and then sterilized in an antibiotic/antimicrobial cocktail as suggested previously (Shearer et al., 2006) followed by UV sterilization.

In Vivo Experiments

Anesthesia. All surgeries were performed under general anesthesia. Anesthesia was induced by intramuscular administration of ketamine (30 mg/kg, Ketamine[®] 500; Virbac, Carros, France) in combination with midazolam (0.2 mg/kg, Midazolam[®]; Mylan, Saint Priest, France) and xylazine (3 mg/kg, Rompun[®]; Bayer AG; Leverkusen, Germany) and assisted ventilation (O₂:1 L/min). Postoperative analgesia was maintained by fentanyl patch (3 μg , Fentanyl-Mepha[®]; Mepha Pharma, Aesch, Switzerland) for 6 days.

Surgical technique. All operations were performed under sterile conditions. With the animal in the supine position after a vertical midline cervicotomy, the infrahyoid muscles were separated from the tracheal axis. After dissecting to the level of the thyroid, a tracheal segment of three to four rings (15 mm) was resected. Each tracheal extremity was then inserted into the prosthesis, which replaced the defect. A silicone tube was placed in the titanium prosthesis and sutured to the prosthesis with one proximal stitch (vicryl 4/0). The porous titanium prosthesis and the tracheal extremities were joined by four proximal and distal sutures (vicryl 4/0). Before closing the skin and the subcutaneous layers without drainage, a myoplasty was performed to cover the prosthesis and limit possible peritracheal leakage.

A tracheal segment, silicone tubes (stents) were used for the endoluminal calibration of the porous titanium prostheses for the in vivo experiments. They were 40 mm long with an internal diameter of 5 mm. They protruded from each end of the prosthesis by 10 mm, thus providing protection of the tracheo-prosthetic anastomoses.

Implant Follow-Up

A daily clinical follow-up was performed. Data regarding the general well-being of the animals and their weight were recorded throughout the duration of the experiment.

Implantation period was 6 weeks and regular CRP readings were taken weekly by an ELISA kit to determine the level of inflammation as per the instructions of the manufacturer. Blood was obtained from the auricular veins and centrifuged at 5,000 rpm at 4°C for 20 min, the supernatant was obtained and tested for CRP levels. The rest of the plasma was utilized for further characterization.

Plasma Characterization

Purification of protein material by reverse phase HPLC. Soluble biological material was obtained by acidic extraction with 0.1% of trifluoroacetic acid of rabbit plasma (1/1, v/v). The soluble extract was purified using a Dionex HPLC system (Ultimate 3000; Sunnyvale, CA) on a nucleosil reverse-phase 300-5C18-column (4 mm \times 250 mm; particle size 5 μm ; porosity, 300 Å, Macherey Nagel, Hoerdl, France). Absorbance was monitored at 214 and 280 nm, and the solvent system consisted of 0.1% (v/v)

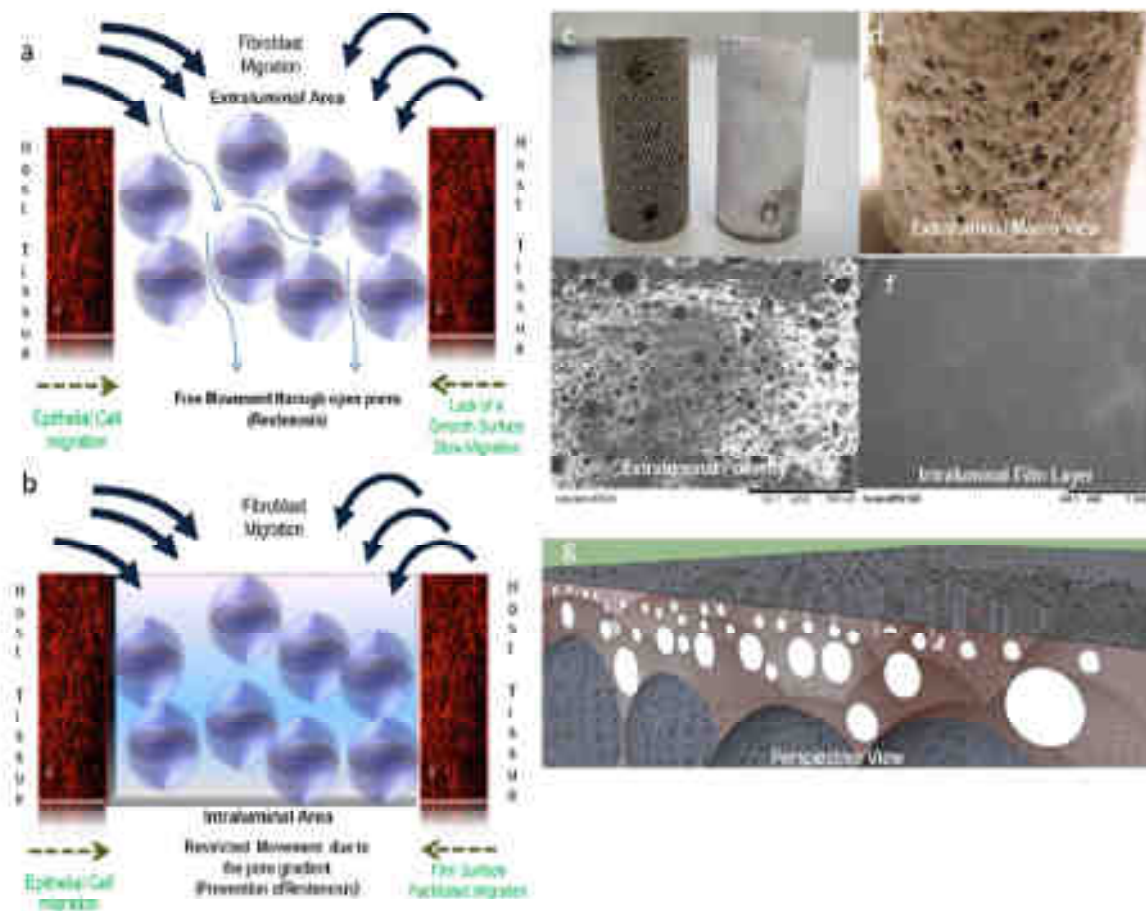


Figure 1. Schematic of the proposed implant, an intraluminal structure of titanium implant (blue net) under cell treatment (a). A hierarchically porous PLLA body with a thin film layer facing the lumens has been introduced (b, c). d. Macroscopic view of titanium mesh and titanium PLLA implant. e. SEM image of the extraluminal surface of the implant (from porous surface to a smooth surface). f. The perspective view of the final implant model, where the titanium mesh is engulfed by the hierarchically porous PLLA body (Color figure can be seen in the online version of this article, available at <http://dx.doi.org/10.1080/17447305.2014.921111>).

trifluoroacetic acid (TFA) in water (solvent A) and 0.09% (v/v) TFA in 70% (v/v) acetonitrile-water (solvent B). Elutions were performed at a flow rate of 700 μ L/min using gradients indicated on chromatograms. Each peak fraction was collected and concentrated by evaporation, but not to dryness with the speed-vac.

Western blotting. Samples were loaded on 15% SDS-PAGE and then transferred to PVDF membrane (HyBondTM-P, GE Healthcare). During migration a voltage of 50 V was applied for the first 10 min and then 120 V till end and during transfer 75 V was used for 90–100 min. For immunodetection Millipore Snap *id*, protein detection system was used using 0.5% of bovine serum albumin as blocking agent. Antibodies used were monoclonal anti-CGA (anti-CGA₄₂₋₄₄). Secondary antibodies used were goat anti-mouse immunolabeled bands were visualized by using the imager system ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Marne-la-Coquette) after addition of ECL reagent (Amersham Bio-Science,

Buckinghamshire, UK). To compare with our previous technique (intramuscular implantation prior to tracheal replacement) (Dupret-Bories et al., 2011), the CGA tests were also done for the samples obtained from animals who received a tracheal titanium implant with or without epithelial cells after 5 weeks of intramuscular implantation. Briefly, the steps were (i) implantation of titanium endoprosthesis tube under the infrahyoid muscles (day 0); (ii) implantation of the prosthesis to replace a resected tracheal segment (day 21). After placing the animal in the supine position, a cervicotomy was performed with a midline vertical incision, allowing access to the infrahyoid muscles, which was separated from the tracheal axis. The prosthesis was placed between the infrahyoid muscles and the trachea. Then a silicon tube was inserted into the porous titanium prosthesis. The skin and subcutaneous layers were then closed with separated stitches of Vicryl 2.0. After 21 days, the cervical cutaneous incision was reopened,

The initial silicon tube was removed from the titanium prosthesis and replaced with a new silicone tube (placed inside the porous titanium prosthesis) that was sutured to the prosthesis with one proximal stitch (Vicryl 4.0). The prosthesis was laterally transposed (with its endoluminal surface covered with epithelium) to replace a 2 cm tracheal segment which was resected during the same operation. The proximal and distal tracheal extremities were inserted into the titanium prosthesis and the junctions of the prosthesis and the tracheal extremities were joined with 6 sutures of vicryl 4.0. Before closing the skin and subcutaneous tissue, a myoplasty was performed to improve coverage and limit future leakage.

Automatic Edman sequencing of peptides derived from the plasma. The N-terminal sequence of purified peptides was determined by automatic Edman degradation on a Procise microsequencer (Applied Biosystems, Courtabouef, France). Samples purified by HPLC were loaded to polybrene-treated glass-fiber filters. Phenylthiohydantoin-amino acids (Pth-Xaa) were identified by chromatography on a C_{18} column (PTH C-18, 2.1 mm \times 200 mm) (Gasnier et al., 2004). For the identification of the sequence SWISS-Prot database was used by Blast software.

Histological Analysis

After an observation period ranging from 1 to 6 weeks, the rabbits were euthanized with an intravenous overdose of sodium pentobarbital (120 mg/kg, CEVA Santé Animale, Libourne, France) after intramuscular administration of anesthesia (the same protocol previously described). A block resection, including surrounding tissues as well as the prosthesis, was performed. After explantation, the inserts were removed and observed with scanning electron microscopy (SEM) and confocal microscopy to check the structure and the presence of PLLA respectively. The implants were explanted at 2nd, 3rd, and 6th weeks of implantation and the histological cuts and hematoxylin and eosin staining was done as reported previously (Schultz et al., 2007). Histological analyses were performed at the IMM (Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France), where the blinded analyses were performed by two pathologists not involved in the project.

Collagen/Alginate Lbl. Production

Collagen type I and Alginate were dissolved at 0.5 mg/mL in 0.15 M NaCl buffer at pH 4. Lbl. films were constructed on PLLA/titanium implants with an automated dipping robot where for each layer a 1:1 ratio of each polyelectrolyte was applied for equal time periods. The duration of dipping was 8 min for each polyelectrolyte with 5 min washing steps in between until 24 bilayers were reached. During the film construction, all the rinsing steps were performed with a 10 mM citrate buffer containing 0.15 M NaCl at pH 4. Cross-linking of the film layers on the implants was achieved by chemical cross-linking via genipin. Genipin solution (20 mg/mL) was prepared by dissolving 20 mg of the genipin

powder in DMSO/buffer (0.15 M NaCl, pH 4) mixture (1:5). The cross-linking agent solution was let in contact with the coated PEM film for 12 h, followed by several rinsing steps. Formed film layers were characterized by atomic force microscopy (AFM) and SEM imaging.

Epithelial Cell Culture

The use of human tissues was authorized by the French committee "Comité de Protection des Personnes" (CPP-Est III, Nancy), statement number DC-2008-374. Nasal polyps were taken with a written consent from the patients. Human respiratory Epithelial cells were obtained from freshly removed nasal polyps as described before (LeSimple et al., 2007). Cells were seeded on collagen/alginate covered hybrid PLLA/titanium implants as 5×10^4 cells/implant. Cell proliferation was observed by a Resazurin-based proliferation assay ($n \geq 6$) and morphology of the cells by fluorescence microscopy (DAPI and ZO-1 immunostaining). Migration of the epithelial cells was quantified by time lapse microscopy and compared to the positive controls, collagen type IV and collagen type I coatings ($n \geq 40$).

Results

Implant Patency and Fibroblast Movement

The developed method produces a PLLA body within the titanium template with a porosity of 40–60 μ m at the extraluminal part to 5–10 μ m intraluminally. This structure enables the entry of fibroblasts and macrophages but prevents their migration into the lumen area (Vrana et al., 2011). The addition of the PLLA film layer in the intraluminal side was necessary to provide a surface for epithelial cells to migrate from anastomosis sites. The film layer was a surface visible on the structure of the implant (Fig. 1c). It has been previously shown that such systems can affect the movement of cells in vitro (Matschegewski et al., 2010).

All animals survived the surgical procedure. Implantations went uneventful except removal of the sutures by two rabbits 1 day after implantation. This rabbits were treated with local antiseptics, but one of them was lost at week 4 due to deep infection of the wound site. Another rabbit was lost due to peri-implantitis. Upon explantation, all implants were in contact with the native trachea wall, both in proximal and distal ends. In histological sections, fibroblasts are observed together with occasional multinucleated cells (Fig. 2). For fibroblast migration a similar behavior to that of in vitro conditions was seen in vivo, as there was a distinct decrease in the fibroblast movement in hybrid implants compared to titanium only implants. In the case of hybrid implants the fibroblast were able to get into the polymer body (cells were visible inside the foam after 2 weeks and their depth of movement gradually increased), but they

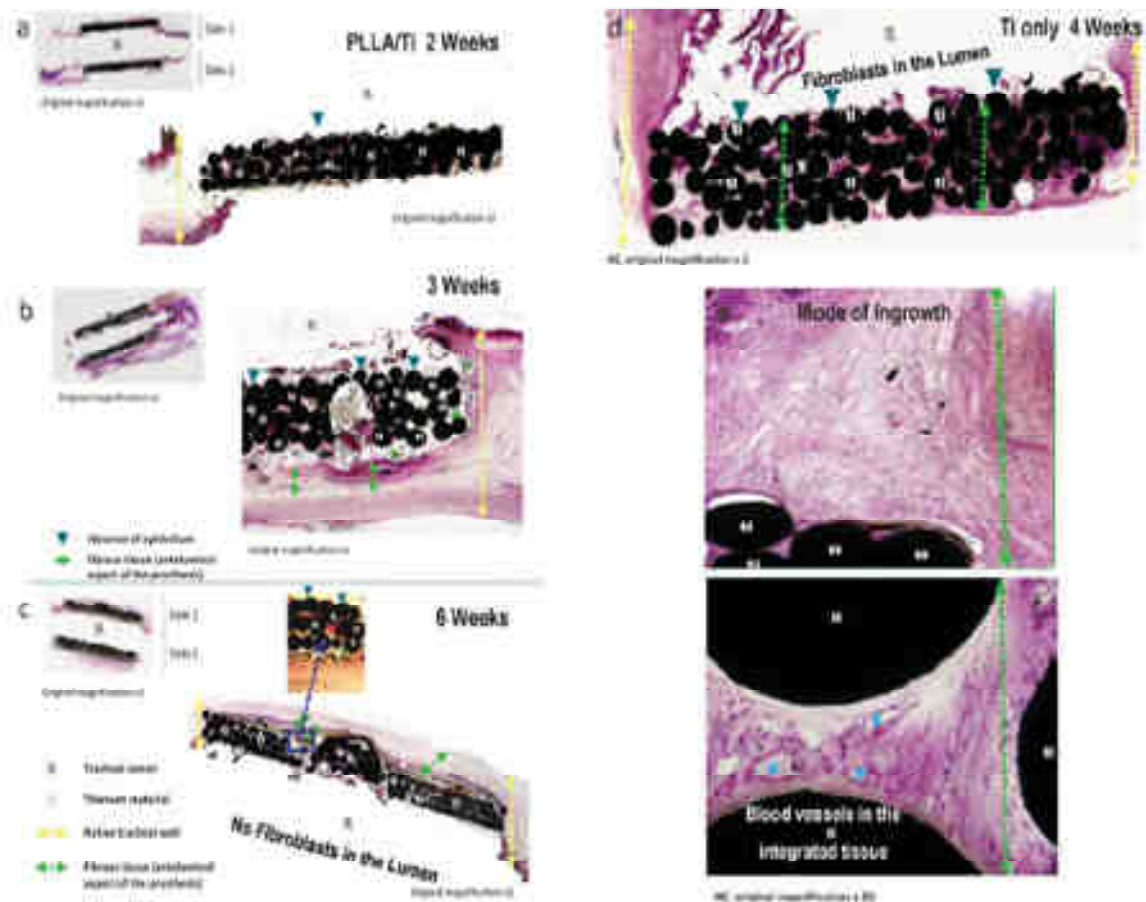


Figure 2. Histology after explantation. For PLLA/Ti anion implants cellular movement was controlled by PLLA presence; fibroblasts were fast to lead to the surrounding area in week 2 (a) then their movement into the implants was more apparent by week 3 (b) and week 4 (c). By week 6 while in place was covered with the fibrous scar tissue with the tissue ingrowth into the implant, without the presence of fibroblasts in the lumen. On the other hand, only the anion implant was infiltrated with fibrous tissue after 1 month (d) but the lumen has been started to be colonized which will end up in restenosis. In the mode of ingrowth was from the external/moral side. The tissue within the implants had distinct blood vessels. Epithelium movement was restricted to the areas closer to the anastomosis sides and even though the amount was higher in PLLA/Ti anion implants, the middle area of the implants lacked epithelial cells. Thus, after initial integration an *in situ* seeding of autologous epithelial cells might be necessary. (Color figure can be seen in the online version of this article, available at <http://wileyonlinelibrary.com/doi>)

have not been able to reach the lumen side over a 6-week period (Fig. 2a–c). During this period, fibrovascular tissue surrounded the implant with noticeable growth into the polymer body, which has reached the middle part of the implant after 6 weeks (Fig. 2c, inset). The only titanium implants were colonized totally in 1 month period (Fig. 2d) and there was no way of keeping cell growth away from the lumen, thus fibroblasts in the lumen area were clearly visible, which suggested that longer periods would result in restenosis. Effectively the hybrid system is a temporary obstacle for the fibrovascular tissue infiltration which prevents the overcome of epithelial growth by fibroblasts. In other words, presence of polymer body kept the growth of the fibrous tissue back to give epithelium enough time to grow.

CRP, CGA, and Blood Protein Levels

The change in rabbit health was monitored by CRP levels. CRP is an acute phase protein and it has been established as a good method to monitor inflammation. In this scheme, inflammation might come from two sources: inflammation due to reaction to the implant and inflammation due to infection. When there is no infection symptoms CRP readings dropped after an initial hike in the first week and stayed only slightly over the baseline of healthy animals over 6 weeks, but they were still below the acceptable limit for CRP in rabbits (5 ng/mL) (Fig. 3a). CRP readings for normal animals were around the levels of previously published reports (below 5 ng/mL) (Alvarez et al., 2008). However, when there was an infection, before the symptoms became

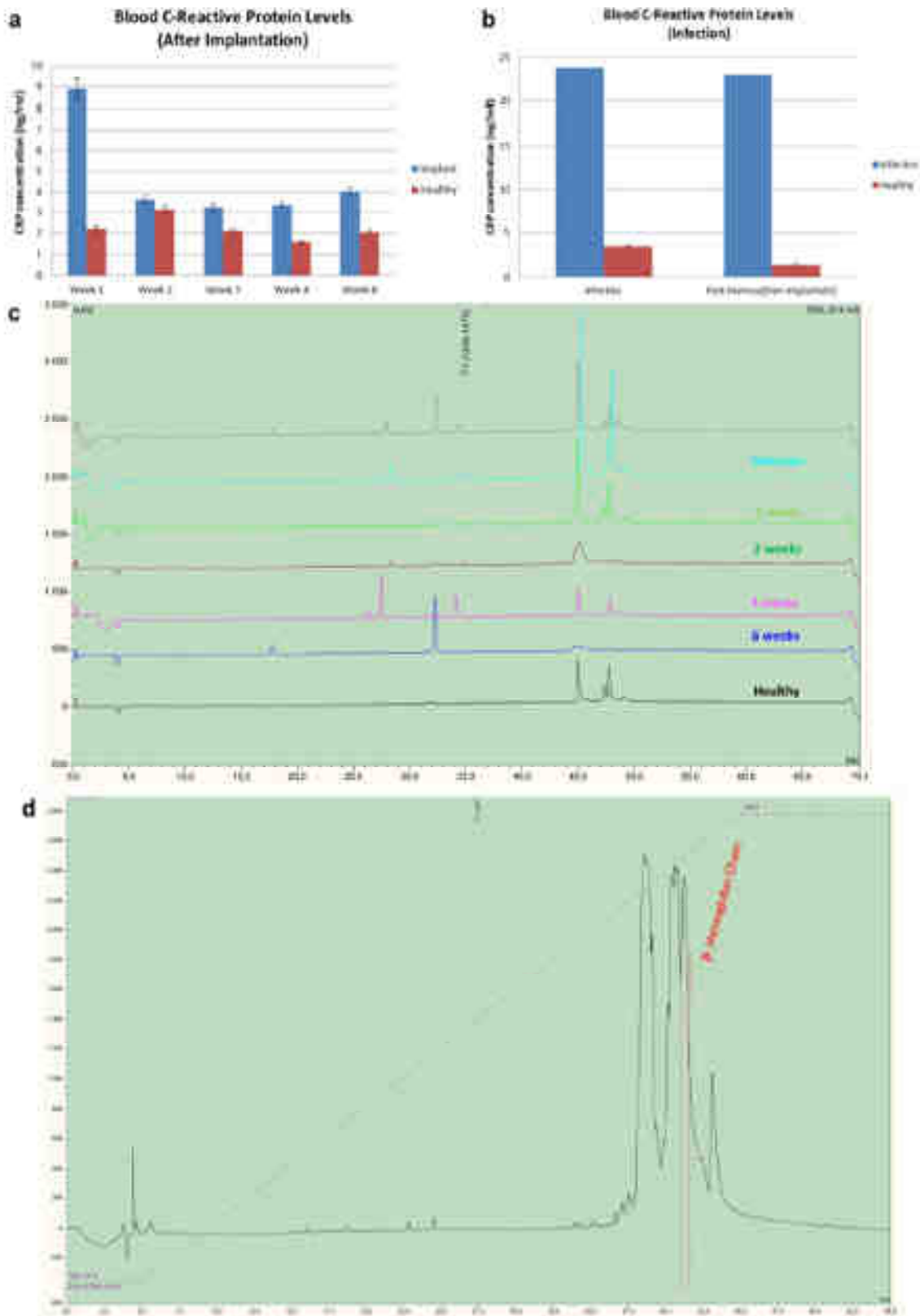


Figure 3.

apparent, CRP levels elevated steeply (Fig. 3b). For example, one of the animals had elevated CRP levels (above 20 ng/mL) and then started to show infection symptoms. This animal's trachea was cleared with a small intervention and animal was healthy afterwards and survived up until the pre-determined sacrifice date. This showed that CRP levels are a good early warning method (Löhler et al., 2002). To further check this trend the proteomic analysis were done in the serum samples over a timeline of 6 weeks, 1 animal who died of a wound site infection was used as negative control and a healthy animal as positive control. The HPLC profile showed distinct peaks corresponding to alpha and beta hemoglobin β as determined by Edman sequencing (Fig. 3c,d). Animals with tracheal implants show an increase in both hemoglobin alpha and beta β amount after 1 week of implantation compared to healthy animals, followed by a progressive decrease in 2, 4, and 6 weeks. Similar to the CRP readings, in case of an infection there was a very strong increase in alpha and beta hemoglobin β readings.

When the levels of CGA was checked at time points 3, 4, and 6 weeks, the level of unprocessed CGA (72 kDa) stayed stable, but an increase in the processed CGA (20 kDa) was observed (Fig. 4a). This processed CGA fragment (20 kDa) is known to be involved in improving cell attachment (Colombo et al., 2002). As CGA has been previously shown to be an even better indicator of stress (Shooshtarizadeh et al., 2010; Zhang et al., 2009), this check would be robust warnings for the set of infection and subsequent treatment. Moreover, they provide a means to compare different

protocols in their influence in body response. When compared to our previous two-step method (intramuscular implantation and after 21 days, tracheal implantation), the PLLA/titanium hybrid system had less complete CGA. Processed CGA levels of two steps method after 1 week of tracheal implantation were at the level of 6 weeks for PLLA/titanium hybrid system (Fig. 4b). This methodology would open up a venue for checking the implantation behavior in a broader sense and specific to each animal, as tracheal replacement is a debilitating process and such methods for patient-based monitoring are necessary. When collaborated with the histology and CRP results, these results suggested that for initial fibrovascular population of the implants, 3 weeks period was necessary, during this period the initial immune response to implantation decreases but also the animals gradually become more prone to respiratory infections, mainly due to the lack of epithelium. Thus, after *in vivo* colonization of implant by the surrounding tissue for 3 weeks, the structure will be ready for local antibiotic treatment and subsequent *in situ* epithelialization.

Epithelialization

The luminal surface of the implant is designed as a smooth film layer to facilitate epithelial cell attachment and migration. SEM imaging of the implant inserts after explantation showed that the film layer was largely intact after 4 weeks of *in vivo* incubation (Fig. 5). This layer has

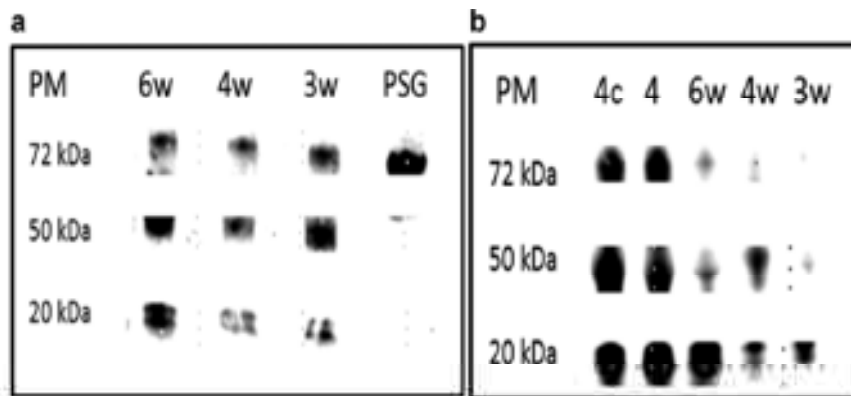


Figure 4. Western blots for determination of complete and/or digested CGA during the course of implantation. **a** Animals which were implanted with PLLA/titanium implants over 6 weeks, complete CGA levels were similar, but the digested CGA (or N-terminal fragment) increased over time. **b** Comparison of PLLA/titanium hybrid implant procedure (3, 4 and 6 weeks denoted 3w, 4w and 6w respectively) with two steps-implantation protocol developed previously (Dasari-Borjak et al., 2011) (intramuscular implantation, followed by tracheal implantation) denoted 4c and 4w, where c corresponds to addition of epithelial cells. PSG stands for Positive control. The CGA levels were significantly higher in the case of two steps-implantation.

Figure 3. Animal health checks. **a** CRP readings on healthy and implanted animals over 6 weeks, CRP levels decrease over implantation period after an initial increase. **b** when there is infection an increase in CRP signal was observed. **c** HPLC separation of plasma samples obtained from the animals over the course of implantation, where the profile of a healthy animal and a sick animal were used as positive and negative controls respectively. **d** a representation of the readings where a distinct peak corresponding to hemoglobin beta β chain is marked, the comparison of the relative size of the peaks at different time points showed a correlation of the peak with implant integration. (Color figure can be seen in the online version of this article, available at <http://dx.doi.org/10.1002/lbm2.1004>).

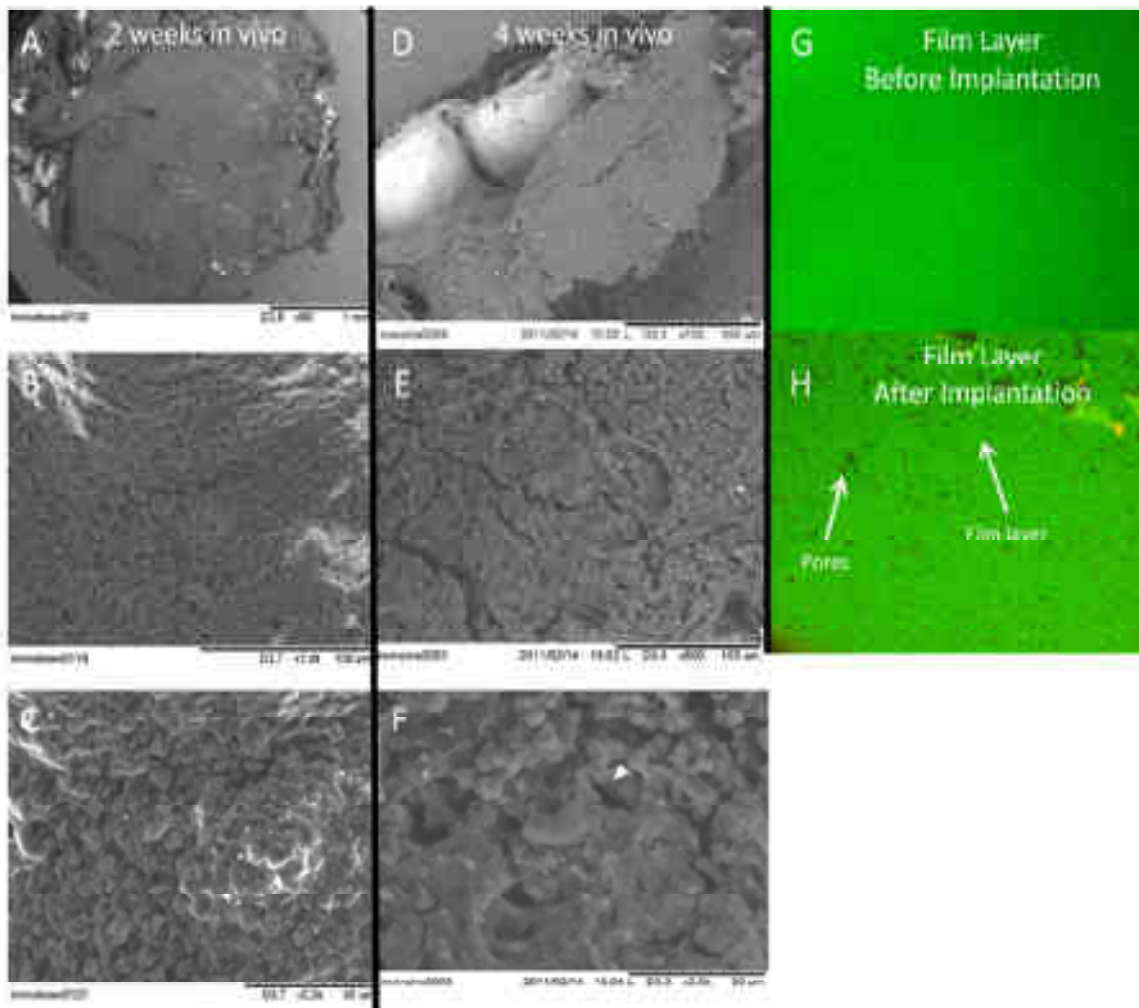


Figure 5. Stability of the film layer. The presence of film layer was monitored (A–C) after 2 weeks, (D–F) after 4 weeks of implantation. The film layer was in place but effects of degraded film were apparent, with occasional cracks and an increase in the surface roughness. Scanning images of the film layer acquired at (G) time 0 and (H) after 4 weeks of in vivo implantation. The film layer was mostly intact, but the formation of further pores on the surface area is visible (image E, patch 30 × 1). Scale figures can be seen in the online version of this article, available at <http://www.intellectus.com/doi>

been previously shown to support human respiratory cell proliferation. However in the view of the histological results, in vivo growth of epithelium was still slow (limited to the close proximity of the anastomosis sites). Epithelialization is generally a long process, basically due to the mode of growth of epithelium (Fong et al., 2010) and can only be overcome by surface treatments with growth factor gradients to a certain extent, as the boundary conditions cannot be changed. However, surface coatings can further improve the outcome. Previously in canine specimens the replacement of epithelium was observed on a polycaprolactone (PCL) based lumen coating of a collagen-based scaffold, but only after 18 months following the surgery (Sato et al., 2010). The authors state that there was a distinct improvement in epithelialization in the presence of the film coating. In this

model, no prior autologous cell seeding was done. When decellularized tracheal scaffolds were used, Go et al. (2010) reported a distinct improvement in the case where autologous cells were seeded. Initial attachment of the cells becomes important, which can be very limited depending on the surface properties of the implant.

To further improve the implant design, we coated the lumen of the implants with collagen/alginate polyelectrolyte multilayers cross-linked with genipin. This cross-linking step was necessary to stabilize the film in physiological conditions (pH 7.4). The cross-linking was effective between collagen chains. Genipin acts on collagen molecules with primary amine groups and has the ability to form both intra and intermolecular cross-links (Hwang et al., 2011). However, we demonstrate that, alginate molecules from

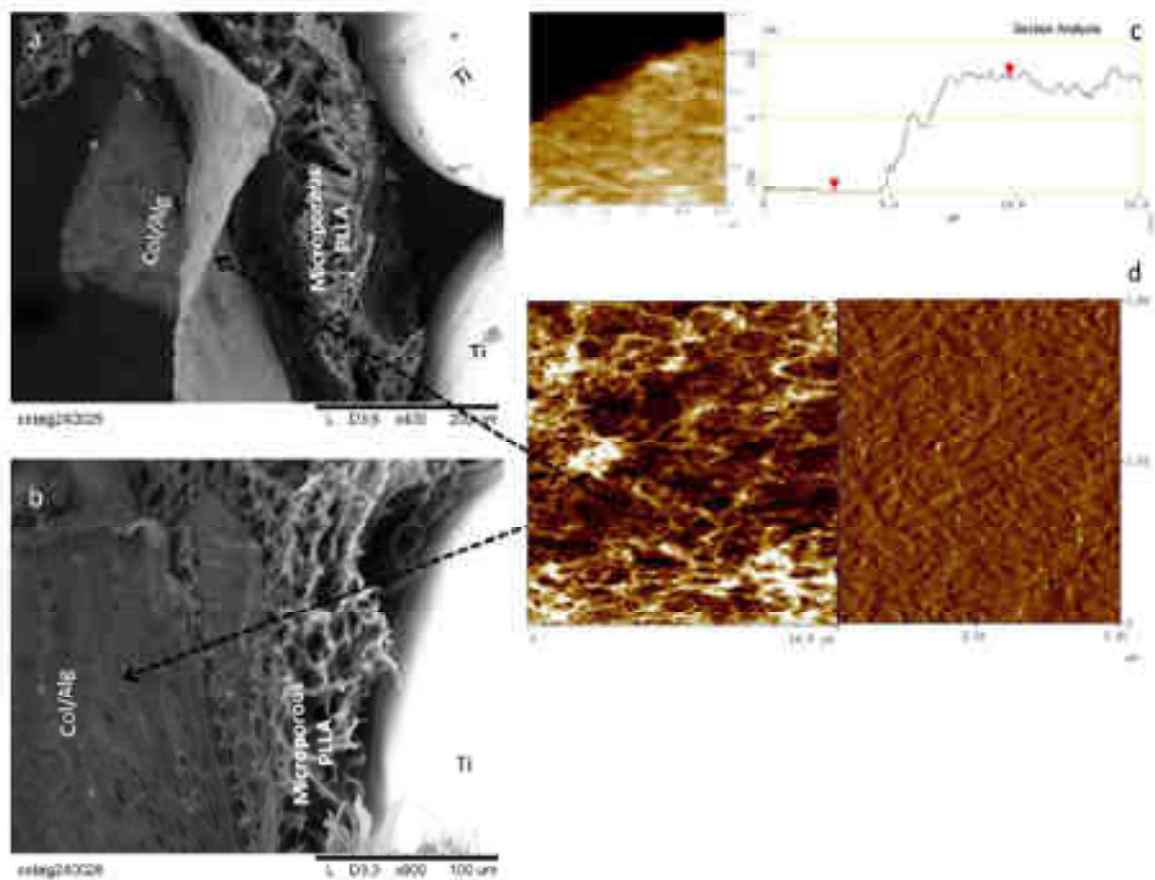


Figure 6. Development of collagen/alginate multilayers on the implant surface. (a) Thin layer of the collagen/alginate film covers the surface of the implant over the titanium beads and porous PLLA body after 24 layers were deposited (b) which showed a strong attachment to the implant body as films have on average a thickness around 400 nm as determined by scratch tests (c) and they depicted a highly nanofibrillar structure. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at <http://dx.doi.org/10.1080/17513758.2013.821011>]

the cross-linked film were maintained in physiological conditions (Fig. 51). The exact mechanism of cross-linking is not fully described, even though a mechanism based on nitrogen-iodine formation between CS of genipin and the primary amines of lysine, hydroxylysine and arginine (Sundararaghavan et al., 2008) could be considered. When these layer were built at high bilayer numbers (24), a thick layer of film on top of the porous PLLA/titanium hybrid can be obtained (Fig. 6a,b). When the titanium samples are dipped into the polyelectrolyte solutions, the solutions cannot flow into the pore areas and they form thin films even in the absence of PLLA, but these films have wrinkled surface features compared to the smooth surface obtained in the case of PLLA/titanium. The thickness of this film layer determined by AFM was around 400 nm and the components of the film layer had a nanofibrillar structure which is known to improve the cell attachment due to its similarity to basement membrane. This structure had a surface roughness of 20 nm which is also appropriate for epithelial cell culture (Fig. 6c,d).

Human respiratory epithelial cells attached and proliferated on these structures, with near confluent layers obtained by 10 days (Fig. 7a–c). Cells proliferated faster on these structure compared to standard epithelial cell culture on Transwell inserts and also the cell numbers were higher compared to our previous results with PLLA films (Vrana et al., 2011). Transwell inserts were selected as control since they are widely used for in vitro differentiation of epithelial cells to ciliated epithelium by air-liquid interface culture method, which is crucial for respiratory epithelium. Moreover, in long term culture periods which are necessary for differentiation, long-term viability of epithelial cells was higher on collagen/alginate multilayers compared to Transwell. Cells stayed on the implant surface even after 19 days of culture (Fig. 7d), whereas in the case of Transwell and PLLA films, cell numbers saw a decrease after 13 days. To check the rate of migration, epithelial cells were observed with time lapse microscopy and their migration rates were calculated. In general cells migrated slower on collagen type IV than on multilayer counterparts ($P < 0.05$), whereas pure

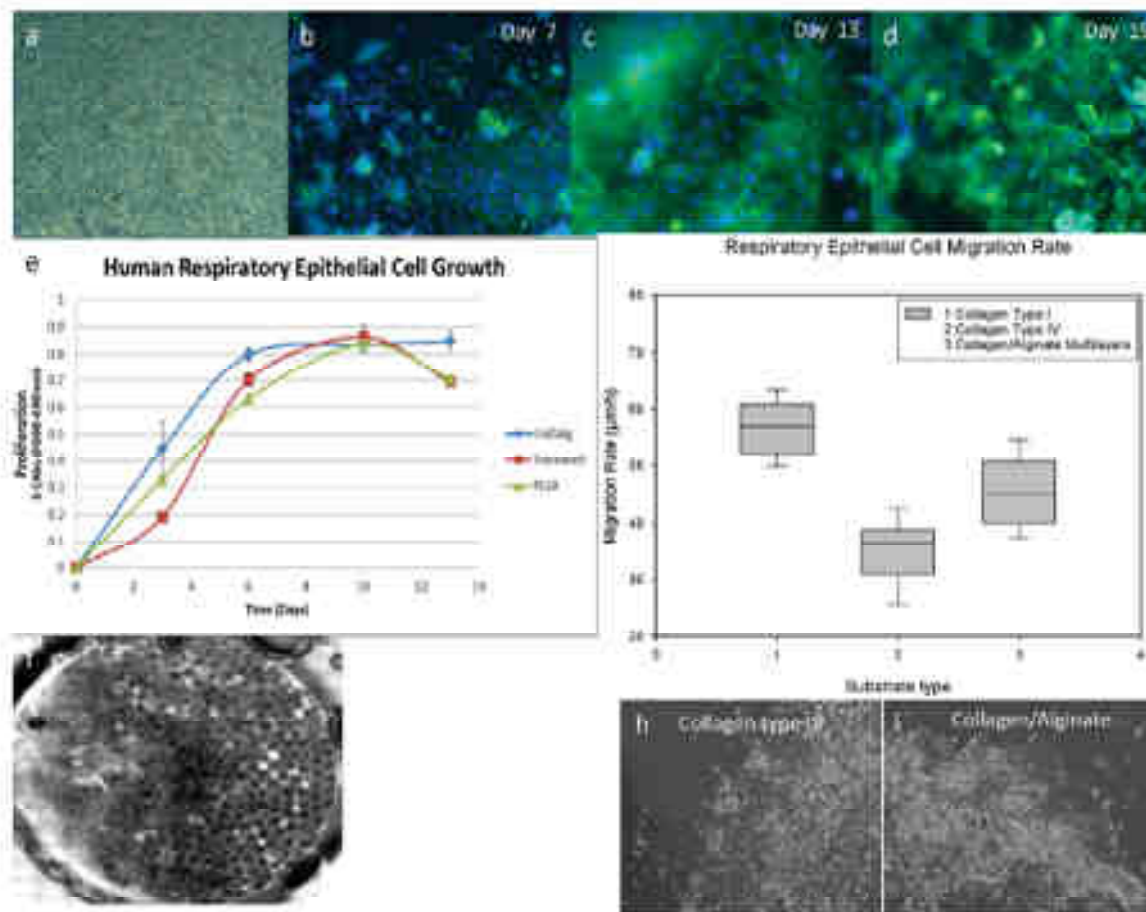


Figure 7. Human respiratory epithelial cell growth and migration on collagen/alginate coated implants. Collagen/alginate multilayers provided a better surface for cell growth than Therwell. Cell numbers were significantly higher than our previous system with PLLA film (a). Phase-contrast micrographs of confluent respiratory epithelial cells. b–d DAPI/2D-1 staining of the cells on the implants after days 2, 13, and 19 in magnification 10×. e. Epithelial cell proliferation curve on collagen/alginate multilayers versus Therwell and PLLA systems. Cell numbers were significantly higher on collagen/alginate multilayers at days 2, 6, and 13. f. Macroscopic view of the coated cell seeded implant. g. Rate of migration (µm/h) of respiratory epithelial cells on three substrates: collagen type I, collagen type IV, and collagen/alginate multilayer (n = 40). h. Representative images of migration beds. (Color figure can be seen in the online version of this article, available at <http://www.intellectjournals.com>.)

collagen type I coating was a better surface for migration. However, collagen type I by itself is not a good substrate for respiratory epithelium proliferation, thus by using the 1H1 technology a surface that behaves better than pure collagen can be created. An additional coating of a collagen/alginate multilayer would help the epithelialization of implants, however with an average migration rate of 45.6 µm/h, a 2 cm defect can only be covered in about 10 days, if the movement is unidirectional from the both anastomosis sites.

Thus our next step was to seed the epithelial cells to an implant that has already been integrated with the body (after 3 weeks of implantation). This can be done endoscopically with the modification of already available endoscopic intervention equipment. A possible option would be a tubing system that will provide the airflow together with

a cartridge facing the lumen of the surface that needs to be epithelialized filled with freshly isolated autologous epithelium in autologous serum. This might provide an "on-site" method for the epithelialization of the implant. In such a method, the epithelium would not need to deal with the initial inflammation and it can grow on an integrated structure thus the delay in vascularization can be eliminated. As a proof of concept, Calcein-AM labeled respiratory epithelial cells have been seeded on implants just after explantation. These implants were previously remodeled for 3 weeks between the infrahyoid muscles and the trachea. The epithelial cells have attached and spread on these surfaces in an hour (Fig. 8), which indicates that in situ epithelialization is an achievable goal in a clinical setting.

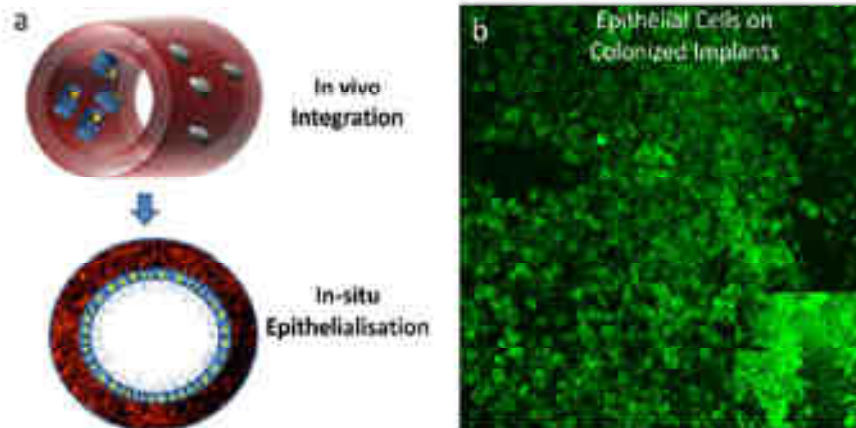


Figure 8. a. Proposed in situ epithelialization system, where the implant was left for integration in vivo and then epithelial cells were seeded in vitro to obtain a functional epithelium. b. Seeding of Dlx5::AM labeled respiratory epithelial cells on implant surfaces after 3 weeks of in vivo incubation; the surface created via colonization provided a suitable substrate for epithelial cell attachment and spreading (after 1 day of in vitro incubation). (Color figure can be seen in the online version of this article, available at <http://dx.doi.org/10.1002/lbm.20130>).

Conclusion

The hybrid PLLA/titanium tracheal implants can stop the initial ingrowth of the fibroblasts into the lumen. The histology and blood characterization results showed that the 3 weeks time-point is the optimal time delay for in situ seeding of epithelial cells. Analysis of CRP and CGA levels are viable methods to check the process of implant integration. A further modification of inner surface of the implants with collagen/alginate multilayers resulted in a 400 nm thick fibrillar film which can support epithelial cell growth and migration. As the next step, these implants will be used for in situ epithelialization experiments.

Authors would like to thank Dr. A. Walder for providing titanium samples. We thank K. Bunnikh for the build up of the Teflon molds and Dr. G. Pevoni for his help with animal experimentation. We acknowledge the Region Alsace and PMNA (IVV Matériaux et Nanosciences d'Alsace) for financial contribution.

References

- Alvarez H, Castro C, Mingos L, Pérez A, Delgado A, Soriano I, Esmo C, Sanchez E. 2005. Efficacy of ciprofloxacin implants in treating experimental otomastoiditis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 75B(1): 93–104.
- Bader A, Macchiarelli P. 2010. Moving towards in situ tracheal regeneration: The bionic tissue engineered transplantation approach. *J Cell Mol Med* 14(7):1077–1089.
- Colombo B, Longhi R, Meroni C, Magni F, Cattaneo A, Yoo SH, Corti F, Corti A. 2002. Cleavage of chondrograin A N-terminal domain by plasmin provides a new mechanism for regulating cell adhesion. *J Biol Chem* 277(40):42911–42919.
- Delbecq P, Vierendeel I, Verleden G, De Leyn P, Van Raemdonck D, Leuven Tracheal Transplant Group. 2010. Tracheal allotransplantation after withdrawal of immunosuppressive therapy. *N Engl J Med* 362(2):138–143.
- Diquet-Bories A, Vrana NE, Laville P, Vactier D, Delbecq P. 2011. Development of surgical protocol for implantation of tracheal protheses in sheep. *J Rehabil Res Dev* 48(7):781–804.
- Feng F, Taji A, Taroff DA. 2011. Boundary crossing in epithelial wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(45):19302–19307.
- Gomez C, Lugardon K, Rah O, Stroh SM, Anton D, Metz-Brutigues MH. 2004. Characterization and location of post-translational modifications on chromogranin B from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *Proteomics* 4(6):1789–1801.
- Gu T, Jungbluth P, Baiguero S, Avagniti A, Manóvil J, Owerlag HC, Mantoux S, Bickel M, Bader A, Macchiarelli P. 2010. Both epithelial cells and mesenchymal stem cell derived chondrocytes contribute to the survival of tissue-engineered airway transplants in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 139(2):437–443.
- Guh YQ, Ooi CP. 2008. Fabrication and characterization of porous poly(L-lactide) scaffolds using solid-liquid phase separation. *J Mater Sci Mater Med* 19(6):2445–2452.
- Guille HC. 2002. Tracheal replacement: A critical review. *Ann Thorac Surg* 73(6):1995–2004.
- Horak B, Sharkey S, Ng HP, May K, Bauman EG, Islam I, Ghannam A, Buckman B, Wu GP, Xu W, Liang M, Roser M, Dunning L, Hradetzka J, Smider BM, Murray MM, Perez HD, Green C. 2001. CCR2-specific non-peptide antagonist: Efficacy in a rabbit allograft rejection model. *Immunol Lett* 76(3):193–201.
- Hwang Y-I, Larsen J, Kravets TB, Lyubovitsky IG. 2011. Effect of genipin crosslinking on the optical spectral properties and structures of collagen hydrogels. *ACS Appl Mater Interfaces* 3(7):2579–2584.
- Jansen LM, van Ooch G, Li JP, Kops N, de Groot K, Van den Hoff JWV, Ferruta L, Hardillo JAU. 2009. Tracheal reconstruction: mucosal survival on porous titanium. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 135(5):422–428.
- Jansen LM, van Ooch G, Li JP, Kops N, de Groot K, Ferruta L, Hardillo JAU. 2010. Laryngotracheal reconstruction with porous titanium in rabbits: Are vascular cartilage and mucosal grafts really necessary? *J Tissue Eng Regen Med* 4(3):393–403.
- Kalisher M, Baiguero S, Macchiarelli P. 2010. Translating tissue-engineered tracheal replacement from bench to bedside. *Cell Mol Life Sci* 672(4): 4135–4136.
- LeSimples P, van Seuringen L, Beauvais MP, Copin MC, Hain M, Hoffmann W, Hajj R, Brody H, Curran C, Puchelle E. 2007. Tisulfo factor family 3

- peptide promotes human airway epithelial ciliated cell differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30(3):296-303.
- Lodha M, Soli M, Kurose C, Schmitt K-P, Hoop UT. 2002. Biomaterial implants induce the inflammation marker CCRP at the site of implantation. *J Biomed Mater Res* 61(1):165-167.
- Mauchiarini P, Inagakihata P, Go T, Aizumi MA, Rhee EE, Cogan TA, Dodson A, Martonelli J, Bellini S, Parronchi IV, Dickinson SC, Hollander AP, Matsumi S, Conconi MT, Birchall MA. 2008. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 372(9633):2025-2030.
- Matsubayashi C, Maehike S, Loschler R, Lange R, Chen F, Kern DP, Beck U, Nobe H. 2010. Cell architecture-cell function dependencies on titanium arrays with regular geometry. *Biomaterials* 31(22):5729-5740.
- Nakamura T, Sato T, Arai M, Ishihara S, Nakada A, Yoshitani M, Ito Y, Yamashita M, Kamemaru S, Otsu K, Hori Y, Endo K, Ikada Y, Hayakawa K. 2009. In situ tissue engineering for tracheal reconstruction using a luminal remodeling type of artificial trachea. *J Thorac Cardiovasc Surg* 138(4):811-819.
- National Research Council. 2010. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, DC: National Academies Press.
- Nicole L, Barri L, Sanchez C. 2010. Integrative approaches to hybrid multifunctional materials: From multidisciplinary research to applied technologies. *Adv Mater* 22(29):3210-3214.
- Omine K, Tada Y, Suzuki T, Nomoto Y, Matsumoto T, Kobayashi K, Nakamura T, Kamemaru S, Yamashita M, Arai R. 2008. Clinical application of in situ tissue engineering using a scaffolding technique for reconstruction of the larynx and trachea. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 117(9):673-678.
- Roosmans GM. 2010. Tissue engineering and the use of stem/progenitor cells for airway epithelium repair. *Eur Cell Mater* 19:264-299.
- Rouquier S, Giffard D, Bouchet S, Boucraie D, Ville M. 2006. Epidemiology and susceptibility of pathogenic bacteria responsible for upper respiratory tract infections in pet rabbits. *Vet Microbiol* 115(1-3):182-198.
- Ryan G, Pandit A, Apostolis DP. 2008. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. *Biomaterials* 27(17):2611-2620.
- Sato T, Arai M, Nakajima N, Otsu K, Nakamura T. 2010. Biodegradable polymer coating promotes the epithelization of tissue-engineered airway prostheses. *J Thorac Cardiovasc Surg* 139(1):26-31.
- Schultz P, Vautier D, Oridis I, Marcellin L, Debry C. 2002. Survival analysis of rats implanted with porous titanium tracheal prosthesis. *Ann Thorac Surg* 73(6):1737-1751.
- Schultz P, Vautier D, Egles C, Debry C. 2004. Experimental study of a porous rat tracheal prosthesis made of Ti60: Long term survival analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 261(9):804-808.
- Schultz P, Vautier D, Charpent A, Lavalle P, Debry C. 2007. Development of tracheal prostheses made of porous titanium: A study on sheep. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 264(4):433-438.
- Shawer H, Ellis MJ, Peters SP, Chaudhron JB. 2006. Effects of common fermentation methods on the structure and properties of poly(DL-lactide-co-glycolic acid) scaffolds. *Tissue Eng* 12(10):2717-2727.
- Shrivastavadeh P, Zhang D, Chieh JF, Gaurier C, Schneider F, Häkkl Y, Aunis D, Metz-Boutigue MH. 2010. The antimicrobial peptide derived from chromogranin A (chromogranin family, new class of innate immunity). *Regul Pept* 160(1):102-110.
- Sundararajagopal HG, Monteiro GA, Lapin NR, Chahal YJ, Mikkan JB, Sankar DL. 2008. Genipin-induced changes in collagen gels: Correlation of mechanical properties to fluorescence. *J Biomed Mater Res A* 87A(2):308-320.
- Tatekawa Y, Ikada Y, Komuro H, Kaneko M. 2010. Experimental repair of tracheal defect using a biodegradable copolymer. *J Surg Res* 186(1):114-121.
- ten Hiltten EJ, Balhoveit G, Marres HA, Jansen JA, van Kesteren TGI, Schutte HB, van Loon JJ, van der Houten EB, Verkerke GJ. 2004. Animal models for tracheal research. *Biomaterials* 25(9):1533-1543.
- Tsang WC, Cheng GW, Lee CJ, Wu HL, Huang YL. 2005. On-line coupling of microdialysis sampling with high performance liquid chromatography and hydride generation atomic absorption spectrometry for continuous in vivo monitoring of arsenic species in the blood of living rabbits. *Anal Chim Acta* 543(1-2):38-45.
- Vranas NE, Dupont A, Géraux C, Vautier D, Debry C, Lavalle P. 2011. Hybrid titanium/biodegradable polymer implants with an hierarchical pore structure as a means to control selective cell movement. *PLoS ONE* 6(3):e20480. DOI: 10.1371/journal.pone.0020480.
- Zhang D, Lavrus T, Sapin B, Lavigne T, Candiani V, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Schneider F. 2008. Serum concentration of chromogranin A at admission: An early biomarker of severity in critically ill patients. *Ann Med* 40(1):38-44.

3.3 Article 3

3.3.1 Résumé de l'article 3

Cet article paru dans Journal Of Visualized Experiments montre en vidéo les matériels, techniques et protocoles utilisés pour les articles 1 et 2 (cf. Chapitre 3; 3.1 et 3.2). La fabrication des films multicouches collagène/alginate à l'aide d'un robot de trempage et le recouvrement d'implants en microbilles de titane y sont décrits. L'article permet également d'observer la méthode employée par microscopie à force atomique pour déterminer les épaisseurs des films (Vrana *et al.* 2013).

3.3.2 Article 3

Video Article

Multi-Scale Modification of Metallic Implants With Pore Gradients, Polyelectrolytes and Their Indirect Monitoring *In vivo*

Nihal E. Vrana¹, Agnes Dupret-Bories^{1,2}, Christophe Chabroux¹, Elisabeth Rieger^{1,2}, Christian Debry^{1,2}, Dominique Vautier^{1,3}, Marie-Hélène Metz-Boutigue^{1,3}, Philippe Lavalle^{1,3}

¹Biomatériaux et Biogénierie, INSERM

²Service Oto-Rhino-Laryngologie, Hôpital Universitaire de Strasbourg

³Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg

Correspondence to: Nihal E. Vrana at evrana@jove.com

URL: <http://www.jove.com/video/50533>

DOI: [doi:10.3791/50533](https://doi.org/10.3791/50533)

Keywords: Biomedical Engineering, Issue 77, Bioengineering, Medicine, Anatomy, Physiology, Biophysics, Cellular Biology, Molecular Biology, Materials Science, Biomedical and Dental Materials, Composite Materials, Metals and Metallic Materials, Engineering (General), Titanium, pore gradient, implant, *in vivo*, blood analysis, freeze-extraction, foams, implants, transplantation, clinical applications

Date Published: 7/11/2013

Citation: Vrana, N.E., Dupret-Bories, A., Chabroux, C., Rieger, E., Debry, C., Vautier, D., Metz-Boutigue, M.H., Lavalle, P. Multi-Scale Modification of Metallic Implants With Pore Gradients, Polyelectrolytes and Their Indirect Monitoring *In vivo*. *J. Vis. Exp.* (77), e50533. doi:10.3791/50533 (2013)

Abstract

Metallic implants, especially titanium implants, are widely used in clinical applications. Tissue in-growth and integration to these implants in the tissues are important parameters for successful clinical outcomes. In order to improve tissue integration, porous metallic implants have been developed. Open porosity of metallic foams is very advantageous, since the pore areas can be functionalized without compromising the mechanical properties of the whole structure. Here we describe such modifications using porous titanium implants based on titanium microbeads. By using inherent physical properties such as hydrophobicity of titanium, it is possible to obtain hydrophobic pore gradients within microbead-based metallic implants, and at the same time to have a basement membrane mimic based on hydrophilic, natural polymers. 3D pore gradients are formed by synthetic polymers such as Poly-L-lactic acid (PLLA) by freeze-extraction method. 2D nanofibrillar surfaces are formed by using collagen/alginate followed by a crosslinking step with a natural crosslinker (genipin). This nanofibrillar film was built up by layer by layer (LbL) deposition method of the two oppositely charged molecules, collagen and alginate. Finally, an implant where different areas can accommodate different cell types, as this is necessary for many multicellular tissues, can be obtained. By this way cellular movement in different directions by different cell types can be controlled. Such a system is described for the specific case of trachea regeneration, but it can be modified for other target organs. Analysis of cell migration and the possible methods for creating different pore gradients are elaborated. The next step in the analysis of such implants is their characterization after implantation. However, histological analysis of metallic implants is a long and cumbersome process, thus for monitoring host reaction to metallic implants *in vivo* an alternative method based on monitoring CO₂ and oxygen pores profiles is also described. These methods can be used for developing *in vivo* custom-made migration and colonization tests and also be used for analysis of functionalized metallic implants *in vivo* without histology.

Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/50533/>

Introduction

Currently available metallic implants are suitable for load-bearing applications, but their non-degradability necessitates designs which ensure a strong interface with the tissue surrounding them¹. By providing structures that facilitate cellular in-growth and colonization *in vivo*, the lifetime of metallic implants can be prolonged². Openly porous metallic implants are promising materials for tissue interface engineering and also for ensuring good colonization of the implants. They have been actively used as orthopedic implants and also as tracheal implants^{3,4}. However, there are still problems that need to be solved such as the precise control over cell movement in the pore areas. Failure to control this process might lead to incomplete colonization in one end and necrosis in the other. Also further functionalization of these implants is necessary for achieving higher functions such as delivery of growth factors, directed vascularization and simultaneous movement of different cell types^{5,6}. For tracheal implants, this is crucial as the colonization of the implant by a vascularized tissue is desirable. However, the uncontrolled tissue in-growth to the lumen of trachea is undesirable because it decreases implant patency.

One possibility to control cell movement is size exclusion. By knowing the size of the target cells and their ability to interact with a given synthetic polymer it is possible to develop gradients of pores which can effectively determine the depth of cell movement. For example by creating a pore architecture that is large enough for the entry of connective tissue cells such as fibroblasts extracellularly but small enough (less than 10 µm) to prevent their movement intraluminally an effective control over colonization of a tubular implant can be achieved.

From available pore creation methods such as freeze-drying, particle leaching, gas foaming¹², the easiest to adapt method for fast formation of pore gradients with minimal amount of necessary equipments is freeze-extraction¹¹. In this method, a polymer solution is frozen in a binary mixture of an organic solvent and water. Afterwards, the solvent is exchanged via extraction by a miscible pre-chilled liquid such as ethanol. Freezing and extraction conditions determine the shape and size of the pores and if the extraction is done in a way where the movement of the extraction solution can be controlled, pore size and shape can be directionally modulated.

Second step for multicellular tissues is the formation of porous barriers between different cell types to control their interaction. This is also necessary for the availability of different microenvironments for different cell types depending on their requirements^{13,14}. Trachea is a tubular organ that connects larynx with bronchi. It has an inner pseudostratified ciliary epithelium lining with interspersed goblet cells which produce mucus. The 3D structure and stability of trachea is maintained by cartilage in the shape of C-rings. Thus, in an artificial trachea there should be a defined junction between the connective tissue and the ciliary epithelial layer. While a 3D structure is necessary for the connective tissue part, the migration of epithelial cells requires a basement membrane-like surface to achieve directional movement and closure of the wound. Polyelectrolyte multilayer films (PEM)s are one possible option to obtain basement membrane mimics. Layer-by-layer method (LbL) is a versatile process to obtain thin and functional surface coatings. It is based on electrostatic interactions of two oppositely charged polyelectrolytes and their build-up in a sequential manner to obtain nanoscale surface coatings whose properties can be varied by simply changing variables such as polyelectrolyte species, pH, layer number, addition of a capping layer, crosslinking etc. One of the main advantages of the LbL method is its ability to conform to the topography of the underlying substrate. Thus, under controlled conditions this method can also be used for obtaining surface coverage of porous structures. If collagen is used as one of the polyelectrolytes it is possible to obtain nanofibrous structures that can mimic the surface of basement membrane. The hydrophobicity of titanium enables development of such structures and fibrillarity can be preserved in thick coatings¹⁵. This way attachment and movement of cell on the surface can also be controlled. By using freeze-extraction and LbL film coating sequentially, a structure where cell movement can be controlled laterally, longitudinally and circumferentially can be obtained¹⁶.

Here we describe two novel modification methods for titanium implants by using their hydrophobic behavior which can be extended to modification of various porous implants: i) formation of gradients of micropores within the macroporous titanium implants with hydrophobic, synthetic polymers ii) formation of a thick polymeric film layer on the implant surface that supports cell growth and lining formation by polyelectrolyte multilayers. These methods can be used sequentially or separately. They provide structures that ensure controlled migration and spatial organization of different cell types in multicellular tissues^{16,17}. For the specific case of trachea, the desired outcome for the implant would be the colonization by fibrovascular tissue within the micropore gradients without restenosis and the formation of the inner lining of ciliated epithelial cells on the polyelectrolyte multilayers.

One way of controlling integration of implants is to do small surgical interventions during the period of their integration with the host *in situ*. In order to be able to decide on the timing of the interventions, it is important to have information on the systemic effects of the implant. C-Reactive Protein (CRP) has been used for monitoring of infection and inflammatory response in clinical settings. Chromogranin A (CGA) can also be used in a similar manner and might provide more accurate results to observe the level of inflammation¹⁸. As a possible way of observing metallic implant integration *in vivo*, we present a continuous monitoring procedure of implant systemic effects by characterization of animal blood samples with High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) and subsequent protein sequencing. Elaboration of this method can be used to evade regular end-point histological analysis. Histological cutting of metallic implants is a long, cumbersome and expensive process and can be only undertaken at specific time points. Because of this reason, well-designed blood tests providing robust information about the implant health would be possible routes to decrease animal experiments as mandated by the recent EU rules concerning animal experiments.

The methods presented here can be used to improve the performance of metallic implants via functionalization or to have an alternative way of monitoring the existing implants.

Protocol

1. Preparation of Micropore Gradients in Macroporous Metallic Implants

1. Clean the implants (such as implants made of medical grade titanium beads with a size range of 400-500 µm, Nitpor SAG, France) with ethanol and then sonicate in acetone for 15 min.
2. Design and manufacture Teflon molds according to the implant size and shape (For standard experiments, cylindrical molds of 1.5 cm diameter with a height of 2 cm are used). Molds should be modular, so that the certain parts can be removed during extraction. Such a mold design ensures the control over the extraction process by tapering the movement of the extraction fluid in a directed manner.
3. For tubular implants designed to replace trachea, the structure should be composed of three pieces: i) a bottom part to determine the size of the implant, ii) a mahotel and iii) an outer core which is removable. This way, the pore size gradient can be formed from outside towards inside.
4. Prepare the synthetic polymer (PLLA) solution: For freeze-extraction PLLA solution needs to be prepared in a binary mixture of dioxane and water (87:13% v/v).
5. Heat the mixture to 60 °C in order to obtain a homogenous solution. 60 °C selected as it is the higher limit of the temperature resistance for the precision glass syringes that has to be used for the introduction of the solution into the implants.
6. If high concentration (20%), high molecular weight PLLA solutions are used, introduce the solution into the implant after heating immediately. Otherwise gelation of the solution occurs without full immersion.
7. Calculate the volume of the necessary polymer solution with respect to the porosity of the implant, for accuracy change in the volume of the frozen solution can be taken into account.
8. Introduce the solution into the implants with precision glass syringes with 0.1 µl accuracy. The lower limit for the polymer concentration is 3% for reproducible pore gradient formation whereas it becomes hard to obtain homogenous distribution in the thick samples above 5%. However, for specific applications other concentrations can be used.

9. Freeze the samples either directly at -80°C or with a prior incubation period of 30 min at room temperature. Freezing conditions determine partially the pore formation, thus the freezing conditions can be adjusted according to the porosity aimed. Keep the samples overnight at -80°C .
10. Extraction: Immerse the implants in 30% pre-chilled EtOH. Carry out the extraction at -20°C overnight. To obtain porosity gradients, remove all the mold parts except the mandrel for the tubular implants and all the parts except the bottom part for disk shaped implants. Use a pre-chilled scalpel for easier separation of the mold.
11. After extraction at -20°C overnight¹⁹, remove the remaining mold parts and air dry the implants. For characterization of the overall porosity of the structure mercury porosimeter analysis is necessary. Mercury Porosimeter measurements showed distinct peaks that correspond to the pores on the both sides of the implant and the smaller interdispersed pores. However the more crucial data is the difference between the porosities of intraluminal and extraluminal surfaces, which can be analyzed by Image J for pore size distribution with a scanning electron microscope (SEM)²². For verification of the pore gradient, freeze-fracture the samples and observe the cross-section with SEM.
12. Due to the open porous nature of the implants used, and the light reflecting capacity of Titanium, it is possible to do z-stacks of labeled cells within the porous implants. Label the cells with PKH26 or Calcein-AM and visualize the implants with confocal laser microscopy.

2. Surface Coating of Porous Metallic Implants with Collagen/Alginate Multilayers

1. For build-up of multilayers, highest reproducibility is obtained with dipping robots. However, if a dipping robot is not available these steps can be done manually.
2. Use medical grade collagen type I and sodium alginate. The optimized concentrations are 0.5 g/L for each in 150 mM NaCl in citrate buffer at pH 3.8.
3. Dissolve the collagen solution overnight to ensure the homogeneity of the solution. Acidic pH of 3.8 is necessary for stable build-up of the layers as the structure is unstable before crosslinking in neutral pH.
4. Deposit the layers by a dipping robot system by immersing the implants into collagen and Alginate solutions alternatively. Deposition time is 15 min for each subsequent layer. Rinse the structure in between deposition steps with 150 mM NaCl at pH 3.8 for 5 min.
5. Design specific holder for utilization of the implants with dipping robots used in polyelectrolyte multilayer production. Deposit the layers on the surface of either titanium only implants or implants modified as described in section 1.
6. Stabilization of the basement membrane mimic with genipin: Prepare the crosslinking solution in a Dimethylsulfoxide (DMSO) citrate buffer (150 mM NaCl, pH 3.8) at 1:4 v/v ratio. A wide range of concentrations can be used and 100 mM is adequate for crosslinking. Dissolve genipin first in the DMSO component and add the water component later to avoid clumping.
7. Crosslink the samples by the immersion in the crosslinking solution between 12-24 hr. Afterwards rinse with copious amount of citrate buffer (pH 3.8).
8. After washing steps, sterilize the samples either with UV treatment (30 min) or an antibiotic/antifungal bath (Penicillin/Streptomycin/Fungizone).
9. The main parameters that determine the quality of the basement membrane mimic are its thickness and the diameter of the fibers. Calculate the fiber diameters using Atomic Force Microscopy (AFM) images obtained in contact mode. Dry the samples with a nitrogen flow before imaging. Quantify the thickness of at least 10 fibers per image to determine the average fibril thickness with Image J software.
10. The thickness of the films can be determined by scratch tests using AFM. Dry (COLL/ALG)_n / COL multilayer films. Use a syringe needle to scratch the film. After localization of the scratch with a light microscope, obtain images with AFM on $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ surfaces at the boundary of the scratch. Calculate the heights from the profiles obtained with the AFM software, which provides the thickness of the film layer.

3. Indirect Monitoring of Implant Integration *In vivo* by Analysis of Blood Plasma

1. All the necessary committee approvals should be taken for animal experimentation according to the governing rules for each country²¹. In our case the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 2010) is followed and the approval of the University of Strasbourg ethics committee is obtained.
2. Carry out the implantation at the target site. The blood monitoring protocol given here was used for tracheal replacement in New Zealand white rabbits of a 15 mm tracheal resection.
3. Following implantation a daily follow-up is necessary such as monitoring the general well-being of the animals (healing around the surgical sites, rate of breathing) and recording of their weight.
4. To validate the blood test, use a well-established method such as ELISA tests for blood CRP levels. CRP tests for many animals are available and the specific test used for rabbits is listed in Table 1. Similarly, use western blotting for the determination of CGA levels. Monoclonal anti-CGA antibodies (anti-CGA₁₁₉₄) were used in this protocol.
5. For plasma characterization, obtain blood samples from the auricular veins of the rabbits. Centrifuge at 5,000 rpm for 20 min at 4°C . Use the supernatant obtained for analysis. In our procedure, these tests are done on a weekly basis, but more frequent tests are also possible.
6. Reverse phase HPLC purification of the Plasma protein content: Extract the rabbit plasma with 0.1% of trifluoroacetic acid (1:1; v/v). Purify the extract by using a Dionex HPLC system (Ultimate 3000; Sunnyvale, CA USA) on a nucleosil reverse-phase 300-5C18-column (4×250 mm; particle size 5 μm ; porosity 300 Å).
7. Record the absorbance at 214 and 280 nm. The solvent system used is i) Solvent A: 0.1% (v/v) Trifluoroacetic acid (TFA) in water and ii) Solvent B: 0.09% (v/v) TFA in 70% (v/v) acetonitrile-water.
8. Use a flow rate of 700 $\mu\text{l}/\text{min}$ using gradients for elutions. Collect the peak fractions. Concentrate the fractions by evaporation by speed-vacuum application. It is important to stop the speed-vacuum before complete dryness.
9. Correlate the peaks obtained at different time-points over the course of the implantation period. Use the purified peptides that are showing consistent trends during the course of implantation for identification by automatic Edman sequencing.
10. Automatic Edman sequencing of the peptides: Determine the N-terminal sequence of the purified peptides by automatic Edman degradation using a Procise microsequencer. Load the sample to polystyrene-treated glass-fiber fibers. Next step is the identification of

Phenylthiohydantoin-amino acids (PTH-Iaa) by chromatography on a C_{18} column (PTH C-18, $2.1 \times 200 \text{ mm}$)²². After the sequence is obtained, it can be identified by Blast software using SWISS-Prot database.

Representative Results

Formation of pore gradients

By changing the concentration of the PLLA solution, it is possible to control the size of the pores on the extraluminal side of the implants. Pore size and shape was significantly affected by the presence of titanium implants (Figures 1a and 1b). Pore sizes ranged from 40-100 μm and utilization of lower concentrations resulted in smaller pores. Whereas, in the intraluminal side pore size was governed by the restricted extraction and was around 9 μm ²³, less than the average size of fibroblasts. By adding an incubation step at room temperature a double porous structure, where the pore walls of the bigger pores have their own porosity can be obtained. This feature is important for thick implants, as it would facilitate the gas and nutrient movement (Figure 1c).

Nanofibrillar basement membrane-mimic formation

After the pore gradient was formed, it is possible to add the Collagen/Alginate film layer on top of the structure (Figure 2). This film layer is stable on top of the PLLA foam and it can also be maintained on the surface in the absence of the foam (Figures 3a and 3b). Nanoscale collagen fibers form as the film layer grows (Figure 3c). The growth of the film is exponential, thus a thick film of several hundred nanometers can be obtained (Figure 3d).

Analysis of blood plasma with HPLC and subsequent sequencing after implantation

Porous titanium implants integrate with the host tissue and are completely filled between 4-5 weeks *in vivo* (Figure 4). However, continuation of this process can lead to restenosis and in the presence of the pore gradient due to the PLLA structure, no fibroblast presence was observed after 8 weeks of implantation²⁴. During this period HPLC analysis showed distinct peaks that fluctuate during the time course of implantation. The peak fractions of interest are sequenced and determined to be alpha and beta haemoglobin γ chains (Figure 5), which had shown a similar trend with CRP readings.

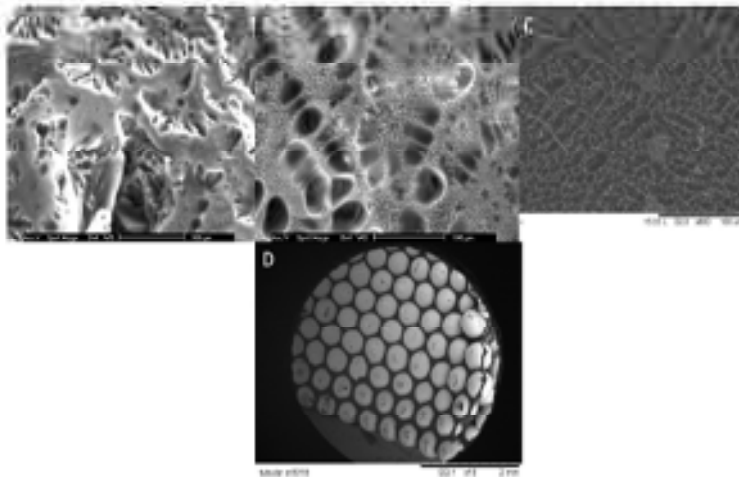


Figure 1. Method of pore gradient formation. Preparation of porous PLLA foams via freeze-extraction method. SEM micrographs (A) without macroporous titanium implants (outer); (B) with macroporous titanium implants (outer); (C) with macroporous titanium implants (inner). Presence of the implants changed the pore morphology. (C, D) Some process can be applied to tubular structures to obtain pore gradients in tubular implants. [Click here to view larger figure.](#)

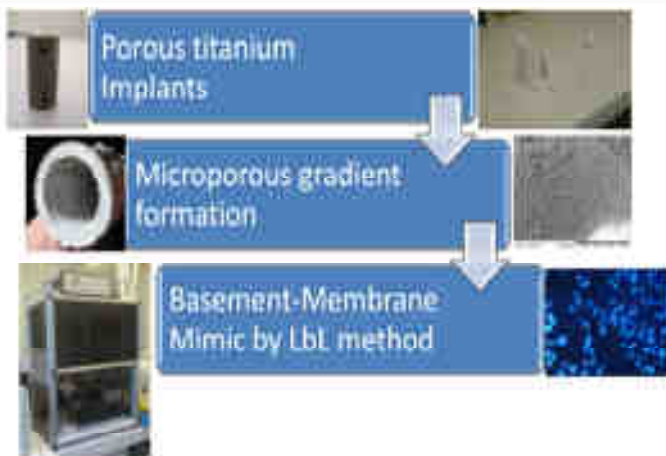


Figure 2. Scheme of the Multifunctional implant development. Starting from microbead based porous implants, by addition of a synthetic polymer based foam a pore size gradient can be obtained. Shape of the pore gradient is partially controlled by the structure of the molds. On top of this structure a basement membrane-like structure can be added, which would provide a suitable surface for cell attachment and lining formation in 2D.

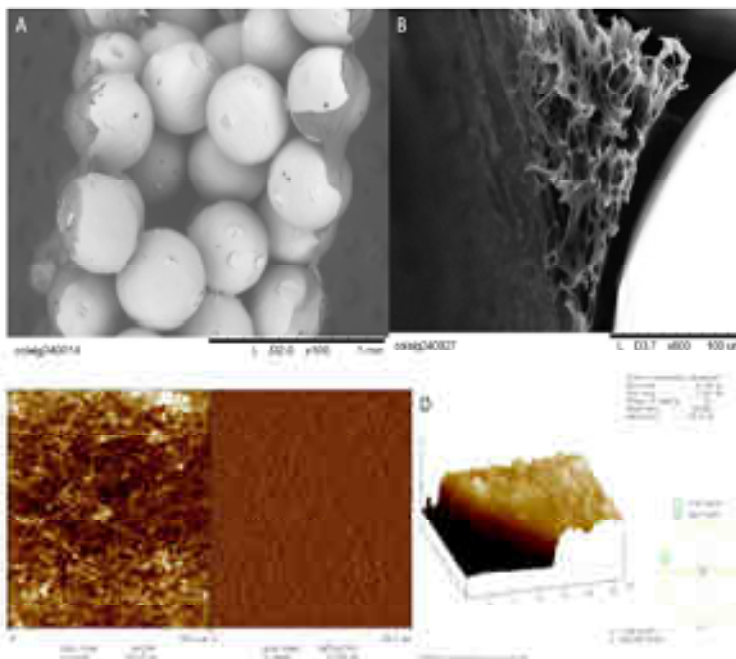


Figure 3. Nanofibrillar Multilayer formation on titanium implants as a basement membrane mimick. Thick Collagen/Alginate multilayers can be formed specifically on the surface of (A) Titanium only implants (with an average bead size of 400-500 µm) (B) Titanium/PLLA foam hybrids. This surface (~1 µm thick) provides a substrate for the attachment and proliferation of the endothelial cells (C) The nanofibrillar nature of the multilayers is characterized by AFM analysis (Scan area: 30 µm x 30 µm) (D) thickness of the multilayers is determined by scratch test. [Click here to view larger figure.](#)

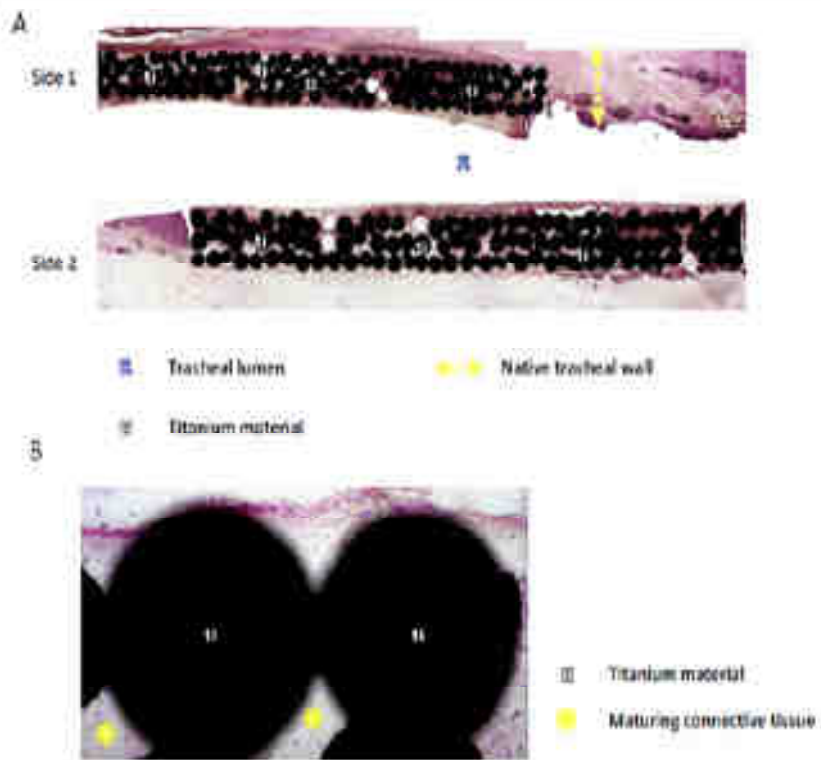


Figure 4. Integration of porous titanium implants *in-vivo* in rabbits. Haematoxylin & Eosin staining of the explanted implant cross-sections (A) The porous areas can be completely filled within a period of 4-6 weeks *in vivo* (B) The tissue within the pores is a mature connective tissue with a good level of vascularization.

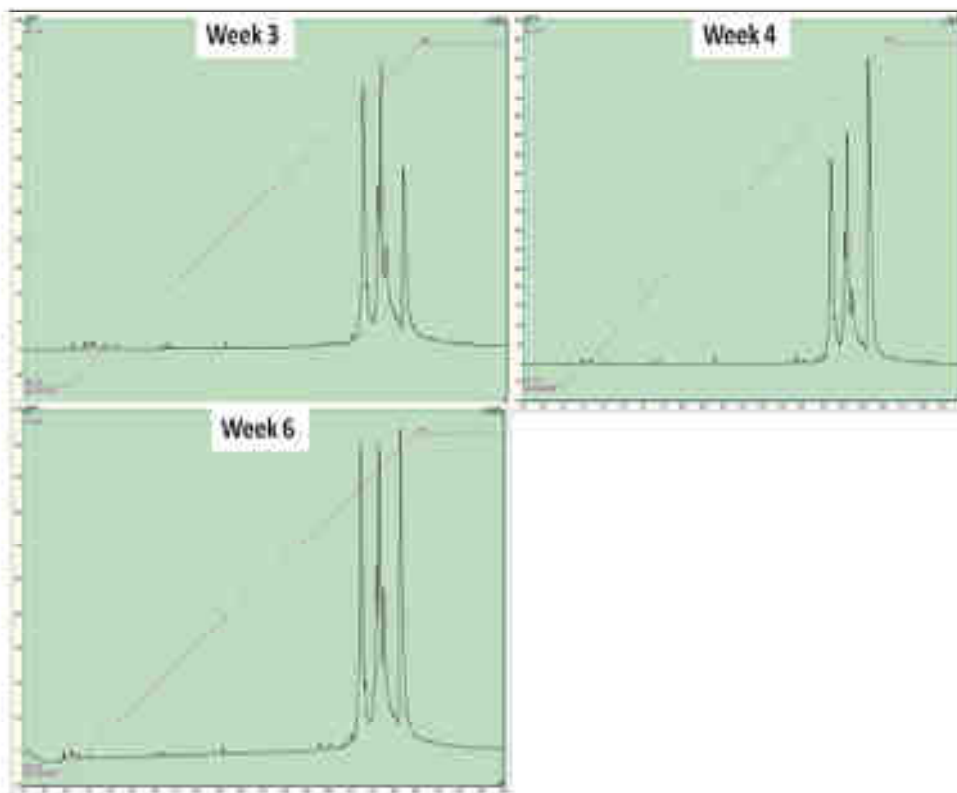


Figure 5. Monitoring of protein content of plasma over the course of an implantation by HPLC and subsequent sequencing. The representative HPLC curves show the peaks obtained from blood samples of animals after 3, 4 and 6 weeks of implantation respectively (top left, top right, bottom left). Each peak corresponds to a specific protein. The differences in the peak correspond to relative abundance of a given protein, which can be determined by sequencing (such as α and β -hemoglobin γ chains). [Click here to view larger figure.](#)

Discussion

Flow gradients are important tools in interface tissue engineering and the system described here can be used alone or in conjunction with metallic implants to form pore gradient to study cell migration. The system does not necessitate any extra setting or extra equipment except a chemical fume hood to handle organic solvents, thus it can be applied in biology laboratories. Similar polymers such as Poly(glycolic acid) (PGA), Poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) and Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) can be used with slight modifications. Other macroporous structures that would not dissolve in organic solvents can also be used. For obtaining smaller pore sizes (at nanoscale) on one surface, an additional thin nanoporous film layer formation is also possible. This can be obtained by first putting a dilute solution (1%) of the polymer on the top of the structure in a highly volatile solvent (such as chloroform) and then immediately causing phase separation by immersing in a pure ethanol solution. This way a co-culture system which is based only one material can be obtained.

The teflon mold design is crucial for the control of the pore size as the movement of the extraction fluid is determined by this. The movement of the extraction fluid and the rate of exchange between the extraction fluid and the solvent affect the formation of pores. The control can be further improved by application of laminar flow of the extraction fluid through the implant. The amount of extraction liquid is an important parameter and it should be arranged with respect to the amount of polymer used and also with respect to the size of the implant. For cylindrical implants with 2mm thickness and 11 mm diameter formed of 500 μ m medical grade titanium beads an extraction bath of 200 ml is necessary. For studying cell migration, P4H20 is a better option for long term migration studies whereas Collagen-AM provides a better observation of cell morphology. Quantification of cell movement in z-direction is an indirect *in vitro* measurement of the control over cellular movement. Also this system can be used with endothelial cells for quantification of *in vitro* vascularization of the implants, either by direct seeding or using standard angiogenesis assays using gel encapsulation²⁶.

There are several available nanofiber formation methods such as electrospinning or phase separation, but electrospinning of collagen is generally considered to denature collagen fibrils. Utilization of a polyelectrolyte based structure ensures the prevention of denaturation while providing the necessary fibrillar structure with high level of precision. Also LBL methods are easier to adapt for complex implant shapes. Film layers on porous structures are simple methods to develop transwell-like assays with more control over the interactions between the cellular components. It is possible to observe with confocal microscopy the top layer on the implant. This can be used to observe the interaction of relevant primary cells with the multilayers in contact with the implant such as epithelial cells or endothelial cells. Either isolated²⁷ or commercially

available cells can be used. This film layer provides a surface where an inner lining for a tubular organ can be developed. For example, in this specific case the aim was to develop an artificial membrane for trachea, and this structure was shown to be suitable for respiratory epithelium²².

Thickness of the layer is set at a level where the film is thick enough to act as a barrier (24 bi-layers). In both titanium only and titanium/PLLA implants, due to the hydrophobicity of the substrate a relatively flat film layer can be formed on the implants, where the pores contribute to the stability of the interface between the structure and the newly formed film layer. Among the available crosslinking methods, genipin crosslinking is the most suitable for animal experimentations. Other crosslinking methods such as glutaraldehyde, EDC/NHS can also be used, but they generally result in less cell attachment. Another possibility is to use photocrosslinkable collagen²³.

Protein sequencing is a promising method for implant monitoring, as it might provide more in-depth understanding. According to the nature of the proteins obtained, it is possible to infer the systemic effects of the implantation and also closely monitor possible infections which are especially important for cases where the implant is not in a sealed area, such as in the case of tracheal implants. Early detection of infections can lead to prevention of infection-related complications in a timely manner. The HPLC profile can provide more information compared to single characterization of a given protein such as CRP or DGA as several peaks with several proteins of interest can be obtained with this method. For example, alpha and beta haemoglobin H chains for rabbits with tracheal implants have shown similar trends with CRP readings in our full tracheal replacement model. Such versatility would provide a venue for determination of minute systemic effect with great accuracy with the improvement of the techniques described.

Disclosures

NE Vrana is an employee of Protop SAS.

Acknowledgements

Authors would like to thank Dr. Andre Walder and Nicolas Ferni for manufacturing titanium implants, K. Bernihi for the build-up of the Teflon molds and Dr. G. Prevost for his help with animal experiments. We also acknowledge the Region Alsace and PMNA (Pôle Matériaux et Nanosciences d'Alsace) for financial contribution.

References

- Hollister, S.J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat. Mater.* **4**, 518-524, doi:10.1038/nmat1421 (2005).
- Ryan, G., Pandit, A., & Apatsidis, D.P. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. *Biomaterials* **27**, 2051-2070, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.12.002 (2006).
- Schultz, P., Vautier, D., Charpiot, A., Lavalle, P., & Deby, C. Development of tracheal prostheses made of porous titanium: a study on sheep. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* **264**, 433-438, doi:10.1007/s00405-006-0165-7 (2007).
- Janssen, L.M., et al. Laryngotracheal reconstruction with porous titanium in rabbits: are vascular cankers and mucosal grafts really necessary? *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **4**, 395-403, doi:10.1002/term.254 (2010).
- Li, J.P., et al. Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition. *Biomaterials* **28**, 2819-2820, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.02.020 (2007).
- Schultz, P., et al. Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, alpha-MSH, for coating a tracheal prosthesis. *Biomaterials* **26**, 2921-2930, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.06.049 (2005).
- Müller, S., et al. VEGF-Functionalized Polyelectrolyte Multilayers as Proangiogenic Prosthesis Coatings. *Advanced Functional Materials* **18**, 1767-1775, doi:10.1002/adfm.200701233 (2008).
- Mills, R.J., Frith, J.E., Hutson, J.E., & Cooper-White, J.J. Effect of Geometric Challenges on Cell Migration. *Tissue Engineering Part C-Methode* **17**, 999-1010, doi:10.1089/ten.tec.2011.0138 (2011).
- O'Brien, F.J., Harley, B.A., Yannar, I.V., & Gibson, L.J. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* **26**, 433-441, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.052 (2005).
- Karageorgov, V. & Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **26**, 5474-5491, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.002 (2005).
- Budyanto, L., Goh, Y.Q., & Ooi, C.P. Fabrication of porous poly(L-lactide) (PLLA) scaffolds for tissue engineering using liquid-liquid phase separation and freeze extraction. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **20**, 105-111, doi:10.1007/s10856-008-3545-8 (2009).
- Kim, H.J., Huh, D., Hamilton, G., & Ingber, D.E. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip* **12**, 2165-2174, doi:10.1039/c2lc00074g (2012).
- Huh, D., et al. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science* **328**, 1562-1568, doi:10.1126/science.1188302 (2010).
- Chaubardoc, C., et al. Collagen-Based Fibrillar Multilayer Films Cross-Linked by a Natural Agent. *Biomacromolecules* **13**, 2128-2135, doi:10.1021/bm300529a (2012).
- Huang, Y., Sless, M., & Majumdar, S.V. Effect of spatial architecture on cellular colonization. *Biotechnology and Bioengineering* **93**, 54-75, doi:10.1002/bit.20703 (2006).
- Kirkpatrick, C.J., Fuchs, S., & Unger, R.E. Co-culture systems for vascularization - Learning from nature. *Advanced Drug Delivery Reviews* **63**, 291-299, doi:10.1016/j.addr.2011.01.009 (2011).
- Lavalle, P., et al. Dynamic Aspects of Films Prepared by a Sequential Deposition of Species: Perspectives for Smart and Responsive Materials. *Advanced Materials* **23**, 1191-1221, doi:10.1002/adma.201003309 (2011).
- Zhang, D., et al. Serum concentration of chromogranin A at admission: An early biomarker of severity in critically ill patients. *Annals of Medicine* **41**, 39-44, doi:10.1080/07853890802199791 (2009).
- Goh, Y. & Ooi, C. Fabrication and characterization of porous poly(L-lactide) scaffolds using solid-liquid phase separation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **19**, 2445-2452 (2008).

20. Vrana, N.E., et al. Modification of macroporous titanium tracheal implants with biodegradable structures: Tracking in vivo integration for determination of optimal in situ epithelialization conditions. *Biochemistry and Biengineering*, **109**, 2134-2140, doi:10.1002/bt.24455 (2012).
21. Dupret-Bones, A., et al. Development of surgical protocol for implantation of tracheal prostheses in sheep. *J. Rehabil. Res. Dev.* **48**, 851-854 (2011).
22. Geisler, C., et al. Characterization and location of post-translational modifications on chromogranin B from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *Proteomics*, **4**, 1799-1801 (2004).
23. Vrana, N.E., et al. Hybrid Titanium/Biodegradable Polymer Implants with an Hierarchical Pore Structure as a Means to Control Selective Cell Movement. *PLoS ONE*, **6**, e20480, doi:10.1371/journal.pone.0020480 (2011).
24. Nakatsu, M.N., Davis, J., & Hughes, D.C.W. Optimized Fibrin Gel Bead Assay for the Study of Angiogenesis. *J. Vis. Exp.* (9), e188, doi:doi:10.3791/156 (2007).
25. Ganguly, A., Zhang, H., Sharma, R., Parsons, S., & Patel, K.D. Isolation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Their Use in the Study of Neutrophil Transmigration Under Flow Conditions. *J. Vis. Exp.* (56), e4032, doi:doi:10.3791/4032 (2012).
26. Dong, C.-M., et al. Photomediated crosslinking of C6-cinnamate derivatized type I collagen. *Biomaterials*, **26**, 4041-4049, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.10.017 (2005).

4 Chapitre 4 : étirement mécanique pour l'alignement modulable de cellules

4.1 Résumé de l'article 4

4.2 Article 4

4.2.1. Abstract

4.2.2. Introduction

4.2.3. Materials and methods

4.2.4. Results and discussion

4.2.5. Conclusions

4.2.6. References

4.1 Résumé de l'article 4

Nous avons précédemment étudié un nouveau système multicouche à base de collagène (COL) et d'alginate (ALG). Nous avons stabilisé ce matériau par réticulation chimique avec la génipine pour le rendre utilisable en conditions physiologiques (pH 7,4). Nous avons montré qu'il était possible de déposer un tel type de matériau sur des surfaces poreuses en titane pour les fonctionnaliser. Il a aussi été démontré que des cellules adhèrent et prolifèrent très bien sur ce type de support.

Le sujet de la présente étude porte sur l'alignement de cellules sur des films multicouches collagène/alginate. Pour ce faire, des films multicouches collagène/alginate (15 à 60 paires de couches) précédemment décrits sont déposés par trempage sur des supports en PDMS. Ces supports sont alors étirés à un certain taux d'étirement (variant de 0 % à 150 %), afin d'aligner les fibres de collagène qui sont à la base de la structure fibrillaire des revêtements collagène/alginate. La topographie des films non-étirés et étirés a été étudié par deux types de microscopie (AFM et MEB).

Nous avons ainsi démontré et étudié l'influence du taux d'étirement sur l'alignement des fibres de collagène. On note que les fibres s'alignent de plus en plus avec le taux d'étirement jusqu'à un taux d'étirement optimal de 100 %. Au-delà, à 150 % par exemple, le revêtement se détache du substrat en PDMS et l'alignement des fibres est perdu.

Afin de vérifier la compatibilité des films avec un environnement biologique, des fibroblastes murins et humains, ainsi que des astrocytes provenant du rat ont été cultivés sur ceux-ci. La morphologie et le comportement des cellules sont remarquablement modifiés lorsqu'ils sont cultivés sur des supports collagène/alginate étirés. En effet, les 3 types cellulaires étudiés s'alignent selon l'axe d'alignement des fibres de collagène.

En vue d'utiliser de tels films *in vivo* pour des applications biomédicales, des membranes auto-portées ont été développées. Le défi consistait à déterminer l'architecture (l'épaisseur) optimale du film collagène/alginate et du mode de détachement. Par simple pelage d'un revêtement collagène/alginate suffisamment épais (60 paires de couches par exemple, 1 à quelques micromètres), il est possible d'obtenir de telles membranes que l'on peut ensuite re-déposer sur une autre surface (implant en titane, verre). Des fibroblastes ont été cultivés sur ces surfaces et nous avons pu vérifier que l'effet d'alignement des cellules est conservé. Ce qui est hautement intéressant et prometteur pour des applications en ingénierie tissulaire.

Nous avons étudié une nouvelle méthode simple et efficace pour aligner les fibres de collagène dans un film multicouche. Nous avons cultivé différents types cellulaires sur ces surfaces et avons démontré que l'alignement des fibres induit un alignement des cellules. Nous avons également montré la possibilité de fabriquer des membranes auto-portées pourvues d'une organisation fibrillaire (collagène) aléatoire ou ordonnée, que l'on peut déposer sur tout type de biomatériau, tel que du titane par exemple.

4.2 Article 4

Mechanically tuned alignment of cells growing on self-standing collagen-based membranes

Christophe Chaubaroux^{1,2}, Fabienne Perrin-Schmitt^{1,2}, Bernard Senger^{1,2}, Frank W. Pfrieder³,
Youssef Haikel^{1,2}, Jean-Claude Voegel^{1,2}, Philippe Laval^{1,2}, Pierre Schaaf^{1,2}, Fouzia
Boulmedais⁴, Joseph Hemmerlé^{1,2,*}

*Corresponding author. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM UMR-S 1121, "Biomaterials and Bioengineering" 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex (France).

Tel: +33.3.68.85.33.77

E-mail address: ((joseph.hemmerle@inserm.fr))

1) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM Unité 1121, "Biomaterials and Bioengineering", 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France

2) Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 1 Place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France

3) Centre National de la Recherche Scientifique, UPR 3212, Université de Strasbourg, 5 rue Blaise Pascal, BP 84047, 67084 Strasbourg, Cedex, France

4) Centre National de la Recherche Scientifique, UPR 22, Institut Charles Sadron, 23 rue du Loess, BP 84047, 67034 Strasbourg, Cedex 2, France

4.2.1 Abstract

Creating biomaterials to mimic natural tissues of the mammalian body has been a major challenge for years. To favor healing processes after tendon, cornea, muscle or brain injuries, highly aligned collagen-based systems such as scaffolds, gels or membranes are needed. In this study, we define a novel nanoscale highly aligned coating obtained by the deposition of collagen/alginate multilayer film on a surface. It shows a distinct nanofibrillar structure, and was cross-linked for stability with genipin. A versatile method to align collagen fibrils which consists in stretching collagen/alginate-coated polydimethylsilyloxane substrates was thus developed. To study the biocompatibility of these films, assays on cell morphology and alignment were performed. Cells highly align on stretched samples along the collagen fibrils. These coatings could be of great interest as a model to study the cell behavior on aligned surface structures as well as in tissue engineering strategies which need substrates that mimic naturally aligned tissues for the reconstruction of tendons, muscles or cornea.

Keywords: collagen, multilayer, stretch, membrane, alignment

4.2.2 Introduction

Mimicking natural collagen-based architectures of the mammalian body has been a major challenge for years. Collagen (COL), the most abundant protein in the mammalian body, involved in the mechanical support of tissues, has been used under many forms, mainly as hydrogels (Kopecek 2007; Slaughter *et al.* 2009), foams and scaffolds (Glowacki and Mizuno 2008; Oh *et al.* 2012). The layer-by-layer assembly of polyelectrolyte multilayer (PEM) films (Tang *et al.* 2006) is another strategy to build innovative COL-based architectures that mimic ECM components where the fibrillar texture of collagen is of physiological importance (Grant *et al.* 2001; Johansson *et al.* 2005a; Mhanna *et al.* 2011; Chaubaroux *et al.* 2012).

In order to build highly aligned structures made of polymer fibers, several strategies have been developed: alignment within a magnetic field,(Kotani *et al.* 2000; Dubey *et al.* 2001; Kaufman and Guo 2007; Builles *et al.* 2010) electro-spinning,(Yang *et al.* 2005; Baker *et al.* 2006; Huang *et al.* 2006; Liu *et al.* 2010; Subramony *et al.* 2013) micro-patterning of surfaces,(Vernon *et al.* 2005; Chen *et al.* 2011) use of microfluidic devices,(Lee *et al.* 2006) flow processing (Tanaka *et al.* 2011) or even combined techniques such as electro-spinning associated to a magnetic field (Kaufman and Guo 2007). These techniques have been used to induce the alignment of cells (Teixeira *et al.* 2003; Schnell *et al.* 2007). However, the implementation of these techniques may be tedious, or implies very tough conditions (strong magnetic field), and thus may lead to COL denaturation (Zeugolis *et al.* 2008).

The aim of this work was to design, by a simple and versatile technique, innovative, biocompatible and implantable coatings or membranes able to induce, by contact guidance, (Weiss 1934; Sutherland *et al.* 2005) the alignment of cells along collagen fibrils. To this end,

collagen/alginate (COL/ALG) multilayer films were deposited on polydimethylsiloxane (PDMS) substrates. COL/ALG-coated PDMS substrates were uniaxially stretched to align the collagen fibrils and peeled off from the substrate to obtain self-standing membranes. Biocompatibility, cell morphology and cell alignment were investigated by seeding three different cell types on the films to show the potential applications of such architectures in regenerative medicine.

4.2.3 Materials and Methods

4.2.3.1 Materials

Lyophilized collagen (COL, Type I from bovine, medical grade, Symatase, Lyon, France) and sodium alginate (ALG, Pronova UPLVG medical grade, FMC Biopolymers AS Novamatrix, Sandvika, Norway) were dissolved at a concentration of 0.5 g/L in 150 mM NaCl buffer at pH 3.8 (citrate buffer). Genipin was purchased from Wako Chemicals (Richmond, USA) and used without purification. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Sigma Aldrich. All solutions were prepared using ultrapure water (resistivity of 18.2 M Ω .cm obtained by a Milli-Q water purification system, Millipore).

4.2.3.2 Preparation of the samples

COL and ALG solutions were deposited alternatively on a polydimethylsiloxane (PDMS, Statrice, France, 18 x 25 mm²) substrate with deposition times of 8 min each before rinsing, using a dipping robot (Riegler & Kirstein GmbH, Germany). During film construction, all the rinsing steps were performed with an aqueous NaCl solution (150 mM) at pH 3.8 for 5 min.

In order to align the collagen fibrils, a home-made manual stretching device was used. COL/ALG-coated PDMS substrates were stretched at defined stretching rates ($\alpha = (l-l_0)/l_0$ where l is the substrate length after stretching and l_0 is the rest length). Metallic rings to grip the coated PDMS substrates were also designed to keep the films under stretching during cell culture experiments. Cross-linking was performed on both unstretched and stretched COL/ALG films deposited on PDMS substrates. It may be useful to notice that the cross-linking step of the stretched films was performed after stretching. The genipin solution (100 mM) was incubated for cross-linking with the multilayer films for 24h at room temperature.

4.2.3.3 AFM imaging

AFM measurements using a Multimode Nanoscope IV from Bruker (Palaiseau, France) were carried out in contact mode. All images of the COL/ALG films were acquired after a rinsing step with water and air-dried. Silicon nitride probes (MSCT model, Bruker) with a spring constant of 0.03 N.m^{-1} were used for imaging. Fibrils thicknesses were determined by measuring the diameter of 10 individual fibrils in a given image using the ImageJ software and calculating the average thickness and standard deviation (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2011).

4.2.3.4 ESEM imaging

ESEM images were performed using a FEI Quanta 400 (FEI, Hillsboro, Oregon, USA) Films are previously abundantly washed with milli-Q water and air-dried.

4.2.3.5 Cell culture

All samples were sterilized with UV, 30 min exposure, before seeding of cells. To study the influence of our coatings on cell compatibility and alignment, cells were seeded onto the films with a number density of 10^4 per cm^2 and cultivated at 37°C under a 5% CO_2 humidified atmosphere for 5 days. NIH 3T3 mouse fibroblasts and primary rat astrocytes were cultivated in DMEM (PromoCell) containing 4.5 g/L of glucose and supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% Penicillin/Streptomycin. Human gingival fibroblasts (HGFs) were grown in DMEM containing 1g/L of glucose and supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. To visualize their morphology, cells were stained after 5 days of incubation with 4', 6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI 1/100, nuclear dye), with vinculin antibody (Sigma Aldrich) and a secondary fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled antibody. Cells were observed with a fluorescence microscope Nikon Ellipse TE200 (objective lens 10×1.4 NA), and with a Nikon Digital Camera (DXM 1200 or DS-Qi1Mc with ATC-1 or NIS-Elements software).

4.2.3.6 Quantification of alignment

Distributions of fibril angle were determined using OrientationJ (Rezakhaniha *et al.* 2011), a plug-in of the ImageJ software. Briefly, 64 even square marks are drawn on threshold AFM images and the plug-in determines the average orientation of the fibrils inside these marks. Distribution of fibril angle (with a bin of 5°) is then plotted. Distributions of nucleus and cell divisions angles were determined using the ImageJ software. First, a threshold is done on fluorescence microscope images and angles are obtained by using the “analyze particles” command. Concerning cell divisions, angles of orientation are defined by drawing a

line along the direction of the cell division and measuring its angle with respect to a reference axis.

4.2.4 Results and Discussions

4.2.4.1 Characterization of the COL/ALG coatings alignment

Collagen (COL) is the most abundant extracellular matrix (ECM) protein present in the mammalian body. Besides the interaction of its amino acid sequences with cell adhesion receptors, physical properties of collagen have also been shown to play a main role in cellular activities. Collagen, when organized in fibrils, provides an important structural and mechanical support. One of the advantages to use the layer-by-layer technique to prepare collagen-based architectures is that it is possible to build such structures, comparable to those found *in vivo*, with no denaturation of the components. A previous study on polyelectrolyte multilayer films composed of collagen and alginate, cross-linked for stability with genipin, demonstrated that those films were suitable for biological studies (Chaubaroux *et al.* 2012).

In the present study, the number of COL/ALG pairs of layers was raised up to 15 and COL was chosen as the outer layer. Recent works demonstrated that cells adhere better on a positively charged surface rather than on a negatively charged one (Zhang *et al.* 2005). In order to align the COL/ALG films, the coated-PDMS substrates were stretched at a defined stretching rate, prior to cross-linking with genipin for stability in physiological conditions (pH 7.4).

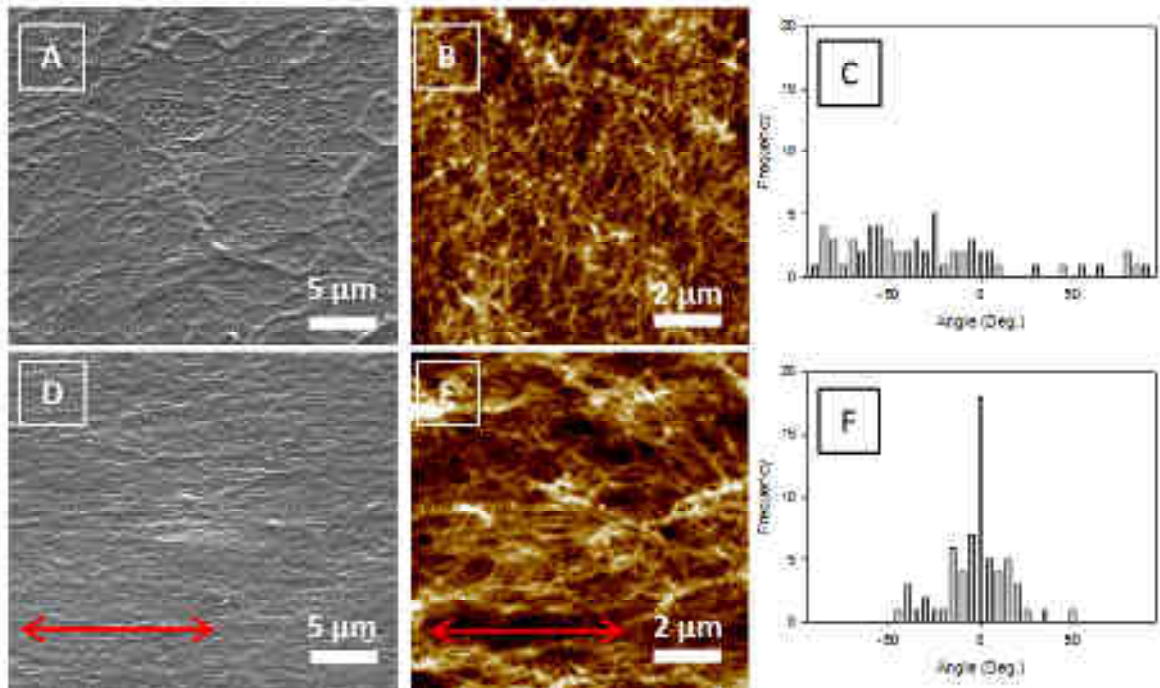


Fig. 1. Topography of collagen/alginate S_x films. SEM images of A) S_0 , D) S_{100} . AFM images of B) S_0 , E) S_{100} ; Distribution of the fibril angle for C) S_0 and F) S_{100} . Fibril angles were obtained from images B) and E). Arrows show the direction of stretching and fibril alignment.

Figure 1A shows a SEM image representing the topography of a non-stretched cross-linked S_0 film, (where S_0 stands for a stretching rate α of 0%), which demonstrates the fibrillar structure of the coating. Collagen fibrils are randomly and uniformly distributed all over the surface. On the contrary, the topography of a S_{100} film (where S_{100} stands for a stretching rate α of 100%) is remarkably modified after stretching (Fig. 1D). Collagen fibrils are clearly oriented in the stretching direction. This alignment is also observed, at a higher magnification, on AFM images (Figs. 1B and E). To confirm this observation, quantification of the COL fibrils orientation was performed (Figs. 1C and F). The distribution of the fibril angle for a S_0 film is quite wide with a standard deviation of about 60° (Fig. 1C), whereas for a S_{100} film, the distribution is fairly narrow with a standard deviation of only about 20° (Fig. 1F). This emphasizes the microscopic observations of the topography of both non-stretched and stretched films. The mean diameters of the collagen fibrils are 57 ± 9 nm (S_0) and 57 ± 7 nm (S_{100}). Analysis of the COL fibrils dimensions show that there is no alteration of the fibril

diameter after stretching. The described method is ideal to prepare aligned COL-based surfaces with no applications of any electric or magnetic field that could damage the polyelectrolyte structures.

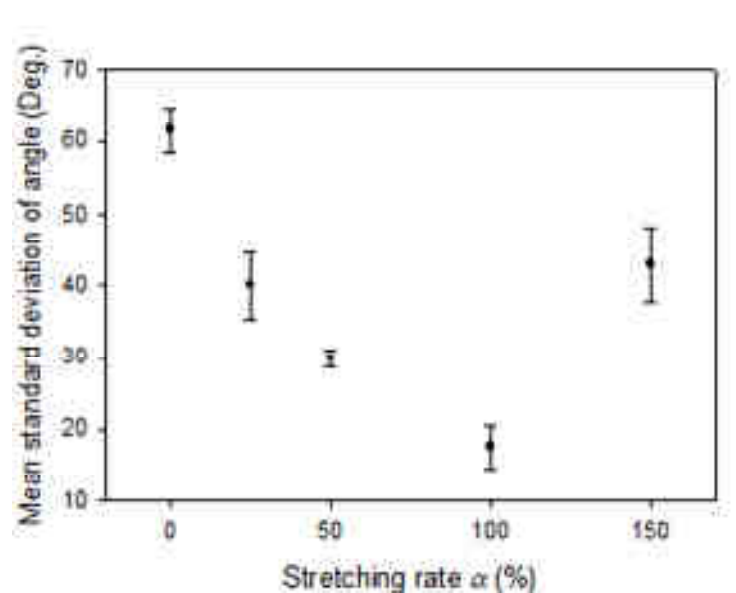


Fig. 2. Influence of the stretching rate on the alignment of collagen fibrils. Mean standard deviations were obtained from 6 images. Error bars correspond to the standard deviations of the 6 individual standard deviations taken from the 6 images.

The influence of the stretching rate ($\alpha =$ from 0% up to 150%) on the COL fibril angle distribution was investigated to determine at which stretching condition the highest alignment occurred (Fig. 2). The smallest mean standard deviation of the fibril angle corresponds to S_{100} films. Above $\alpha = 100\%$, the structure of the films breaks, holes appear all over the surface, and COL fibrils are hardly aligned. These results show that it is possible to tune the alignment of the COL fibrils simply by increasing the stretching rate up to 100%, which is the optimal stretching condition to favor COL fibrils alignment.

4.2.4.2 Cell compatibility and alignment

Cell compatibility, morphology and alignment onto both non-stretched and stretched films were investigated using three types of cells: murine and human fibroblasts as well as astrocytes. Figure 3 shows the morphology of cells cultured either on S_0 or S_{100} films.

Fibroblasts, the most common cells of connective tissue, play an important role in wound healing. They are also involved in the synthesis of the extracellular matrix (ECM). This type of cell has often been investigated as a model for cell alignment (Loesberg *et al.* 2007).

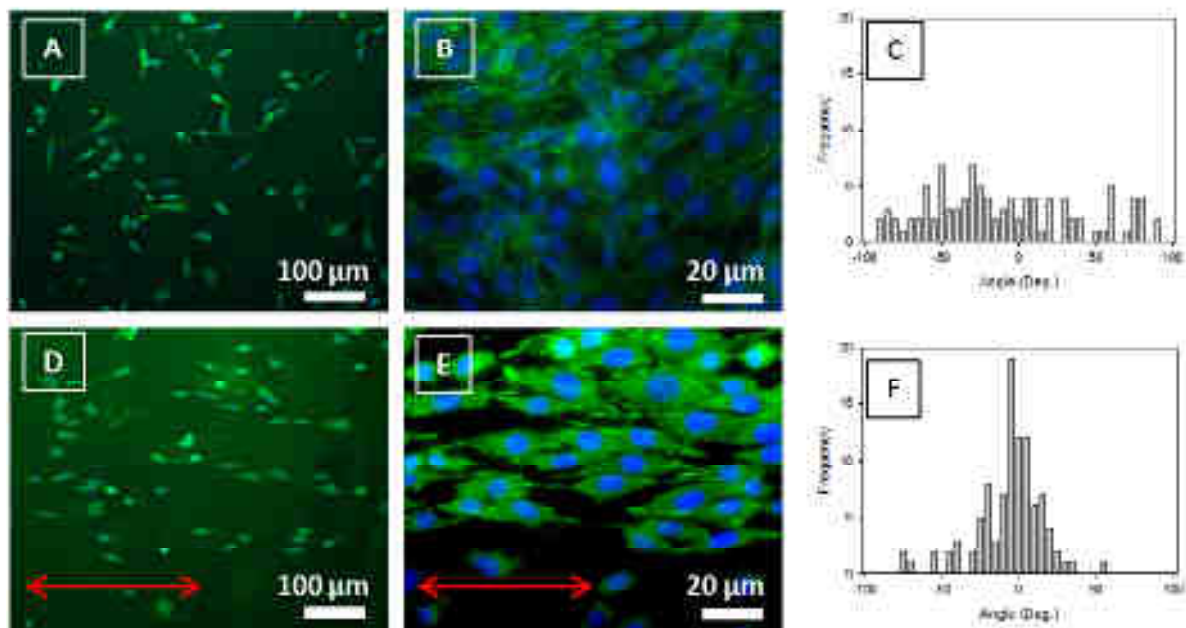


Fig. 3. Cell morphology observed with a fluorescence microscope. NIH 3T3 fibroblasts cultured on A) S_0 and D) S_{100} . Fluorescence microscopy images at a higher magnification of NIH 3T3 fibroblasts cultured on B) S_0 and E) S_{100} . Cells were stained after 5 days of incubation with DAPI (blue) and vinculin (green). Distribution of the 3T3 fibroblasts nucleus angle for C) S_0 , F) S_{100} . These results were obtained from images A and B. Arrows show the direction of fibril alignment.

NIH 3T3 murine fibroblasts, seeded on both S_0 and S_{100} films, adhere, spread and proliferate well after 5 days of incubation (Figs. 3A and D). Obviously, fibroblasts cultured on

S_0 films do not have any preferential orientation, whereas on S_{100} films, cells have a nearly uniaxial orientation. The same observations are visualized concerning the focal contacts of the cells. Changes concerning the shape of the cells also occur. On S_0 films, cells spread in an isotropic way (triangle-like shape), while cells on S_{100} spread in a spindle-like shape and are aligned along the direction of the COL fibrils. Quantification of cell alignment was performed by determining the distribution of the nucleus angle (100 cells/condition) (Dalby *et al.* 2003). The standard deviation of the nucleus angle corresponding to S_0 films is of about 52° (Fig. 3C), whereas that corresponding to S_{100} films is of about 22° (Fig. 3F).

Human gingival fibroblasts (HGFs) are the major constituents of gingival tissue and play a key role in its health maintenance. HGFs have, intrinsically, a spindle-like shape. This leads to spontaneous alignment of these cells in a short range order. HGFs adhere and spread well onto both S_0 and S_{100} films (Figs. 4A and D). The alignment of HGFs on S_{100} films along the COL fibrils is also observed, which means that it is possible to align HGFs in a chosen direction, which is the direction of the fibrils alignment. To confirm this observation, the HGFs nucleus angle (20 cells per condition) was measured on both non-stretched and 100% stretched films. The standard deviation of the nucleus angle corresponding to S_0 films is of about 56° , whereas that corresponding to S_{100} films is of only about 13° . These results indicate that HGFs align along the COL fibrils in a long range order on S_{100} films.

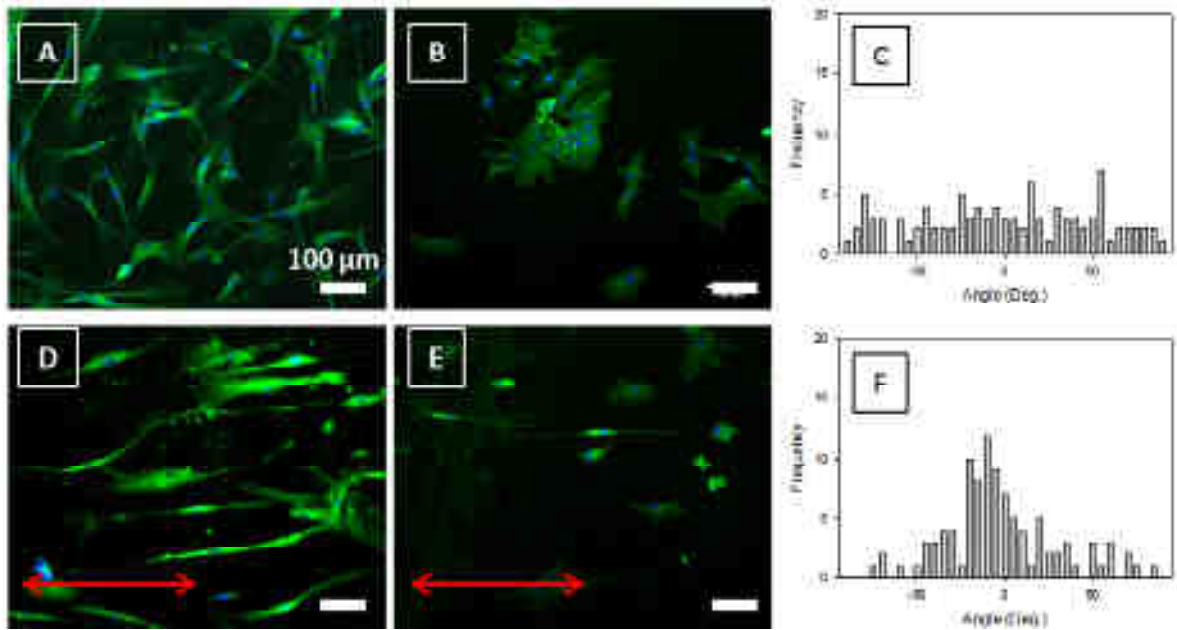


Fig. 4. Fluorescence microscopy images of HGFs cultured for 5 days on A) S₀ and D) S₁₀₀. Fluorescence microscopy images of astrocytes cultured for 5 days on B) S₀ and E) S₁₀₀. Cells were stained for DAPI (nuclear dye) and vinculin (green dye). Distribution of the astrocytes nucleus angle on C) S₀, and F) S₁₀₀ films. The double arrows show the fibril alignment.

Primary astrocytes from rat, the most abundant cells in the brain, play a major role in the repair and scarring process of the brain and spinal cord (Renault-Mihara *et al.* 2008). These cells adhere and spread well on both S₀, with their characteristic shape, and S₁₀₀ films (Figs. 4B and E). However, on S₁₀₀ films, the shape of the cells is remarkably modified (Fig. 4E). Cells align along the direction of the COL fibrils, with a very elongated shape. Moreover, the standard deviation of the astrocyte nucleus angle corresponding to S₀ films is of about 53° (Fig. 4C), whereas that corresponding to S₁₀₀ films is reduced to about 32° (Fig. 4F). These results emphasize the fact that cells sense the alignment of COL fibrils and that they align nicely along them. Schnell *et al.* investigated the benefit of incorporating collagen in poly-ε-caprolactone electrospun nanofibers on the behavior of fibroblasts and Schwann cells (Schnell *et al.* 2007), in contrast to another work showing that collagen was not suitable for cell proliferation (Vleggeert-Lankamp *et al.* 2004). Inducing by contact guidance alignment and

uniaxial migration of astrocytes has been a key challenge to favor healing after a lesion of the brain or spinal cord. These COL-based coatings could thus be used as suitable substrates to this end.

4.2.4.3 Tunable alignment of NIH 3T3 fibroblasts

Cell alignment was quantified by determining the distribution of the nucleus angle (Dalby *et al.* 2003), as a function of the stretching rate (Fig. 5). A hundred cells were analyzed for each stretching rate investigated ($\alpha = 0, 25, 50, 100$ and 150%). The largest standard deviation of the nucleus angle of about 52° corresponds to S_0 films, whereas the smallest (about 22°) corresponds to S_{100} films.

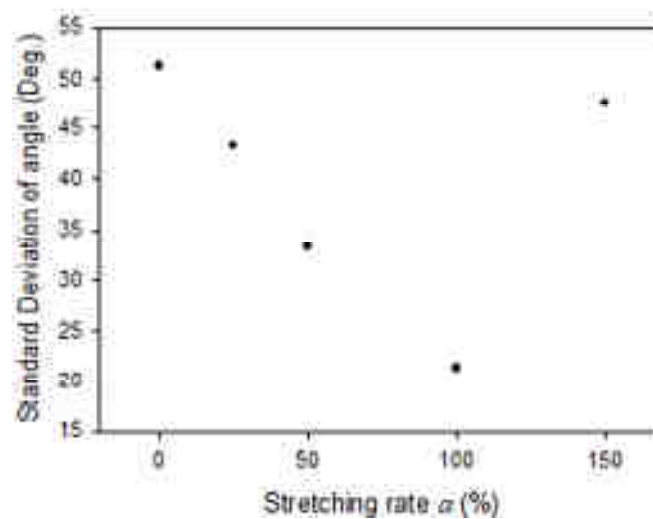


Fig. 5. Influence of the stretching rate on the alignment of cell nucleus. Standard deviations were obtained from 100 nuclei/condition.

These results indicate, as for the study of the COL fibril orientation (Fig. 2), that the higher the stretching rate, the better the alignment of the cells along the COL fibrils, until $\alpha = 100\%$ is reached. This means that there is a correlation between the degree of orientation of

the COL fibrils and the alignment of cells along them. Cell alignment can thus be tuned as desired simply by choosing the stretching rate of the films. However, at $\alpha = 150\%$, cells do not align well probably because the integrity of the films (S_{150}) is altered, as mentioned above.

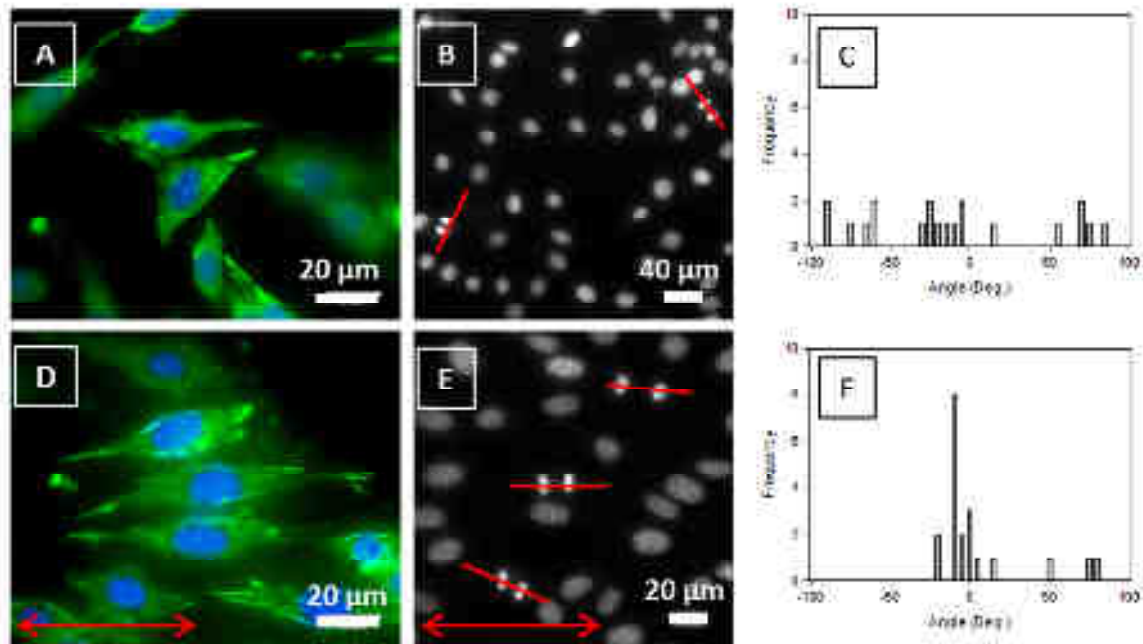


Fig. 6. Fluorescence microscopy images of NIH 3T3 fibroblasts cultured for 5 days on A) S_0 and D) S_{100} . Cells were stained for DAPI (nuclear dye) and vinculin (green dye). Fluorescence microscopy images of NIH 3T3 fibroblasts nuclei cultured for 5 days on B) S_0 and E) S_{100} . Distribution of the cell division angle on C) S_0 , and F) S_{100} films. The lines show the orientation of cell divisions. The arrows show the fibril alignment.

The alignment of COL fibrils also effects the orientation of cell divisions, as previously reported by Wang *et al.* (Wang *et al.* 2008). Cell divisions are randomly oriented on S_0 films (Fig. 6B) with a standard deviation of angle of about 53° (Fig. 6C). On the contrary, the standard deviation of the cell division angle on S_{100} films drops to about 29° indicating that cell divisions are nicely oriented (Figs. 6E and F). In fact, cells divide preferentially along the direction of the COL fibrils.

4.2.4.4 Self-standing COL/ALG membranes

The films described above are built on PDMS substrates. This means that if one wants to use these coatings, one has to keep the PDMS substrates in a stretched state, which may be not very convenient for *in vivo* experiments. In order to overcome this issue, the films need to be deposited onto another substrate or even to be substrate free. To this end, the films prepared on PDMS substrates (60 pairs of layers) were first dried, then peeled from these substrates and deposited again onto either titanium or glass slides. NIH 3T3 fibroblasts were cultured on those membranes to verify whether the alignment of the collagen fibrils was preserved and could still induce the alignment of cells.

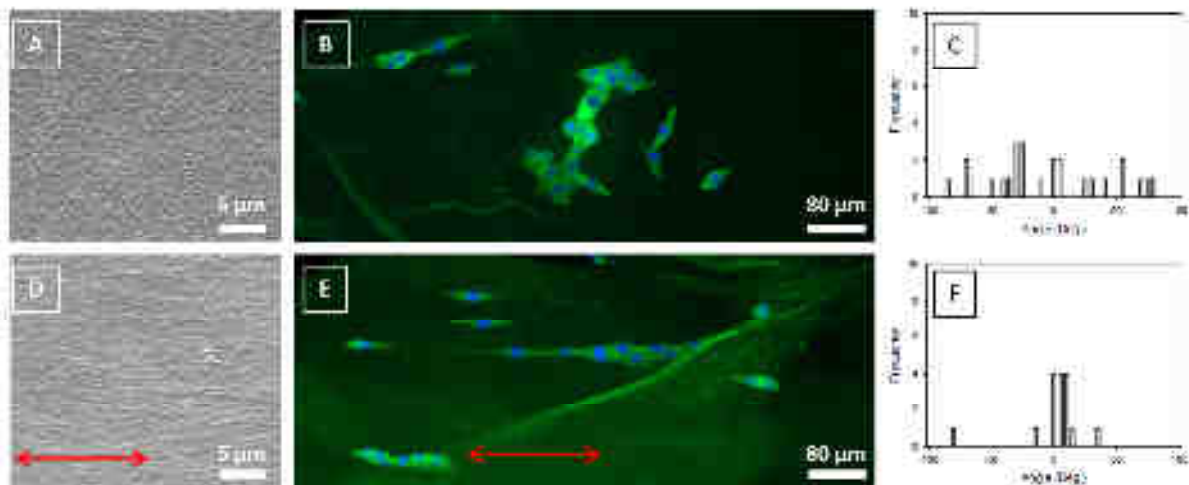


Fig. 7. SEM images of A) S_0 , D) S_{100} COL/ALG membranes. Membranes (60 pairs of layers) were peeled from PDMS substrates and deposited onto glass slides. Fluorescence microscopy images of NIH 3T3 fibroblasts cultured for 5 days on B) S_0 and E) S_{100} membranes. Membranes were peeled from PDMS substrates and deposited onto glass slides for cell culture. A) Cells were stained after 5 days of incubation with DAPI (blue) and vinculin (green). Distribution of the nuclei angles: C) corresponding to image B and F) to image E. Arrows mark the direction of stretching.

Figures 7A and D show SEM images representing the topography of S_0 and S_{100} membranes, (peeled off and then deposited onto a glass slide), which demonstrates the fibrillar structure of the coatings. Collagen fibrils in S_0 membranes are randomly and uniformly distributed all over the surface (Fig. 7A). On the contrary, the topography of a S_{100}

membrane is remarkably modified after stretching (Fig. 7D). Collagen fibrils are clearly oriented in the stretching direction. Figures 6B and E show fluorescence microscopy images of cells cultured on either S_0 or S_{100} COL/ALG peeled membranes deposited on glass slides after 5 days. Cells deposited on aligned membranes are well spread and are very well aligned along the collagen fibrils as indicated by the distribution of the nucleus angle (Fig. 7F). This indicates that the aligned structure of the films is not altered during the peeling and re-deposition steps. These results demonstrate that the described COL-based membranes may be suitable implantable devices for applications in the biomedical field.

4.2.5 Conclusions

Innovative collagen-based multilayer coatings were investigated throughout this study. Highly aligned collagen-based coatings were manufactured by stretching COL/ALG-coated PDMS substrates. Both non-aligned and aligned COL/ALG films favor cell adhesion and proliferation. However, aligned COL/ALG coatings permit the controlled degree of alignment of murine fibroblasts and the alignment of both human fibroblasts and astrocytes along the aligned COL fibrils.

These findings suggest also the existence of strong biochemical interactions between cells and the collagen, the outer layer of the film. Since COL fibrils are aligned, focal contacts may preferentially align along the COL fibrils. This process may lead to the alignment of cells, which sense this alignment and may move along the fibrils by contact guidance.

These coatings could be used to study the migration of cells by contact guidance and also as surface coatings for tissue engineering strategies to repair tissues such as cornea, tendons, muscles and ligaments.

Acknowledgements

We acknowledge the Région Alsace and the Pôle Matériaux et Nanosciences d'Alsace (PMNA) for financial contribution. We thank K. Benmlih for the buildup of the stretching devices.

4.2.6 References

- Baker, S. C., N. Atkin, P. A. Gunning, N. Granville, K. Wilson, D. Wilson and J. Southgate (2006). "Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional in vitro biological studies." Biomaterials **27**(16): 3136-3146.
- Builles, N., H. Janin-Manificat, M. Malbouyres, V. Justin, M. R. Rovere, G. Pellegrini, J. Torbet, D. J. S. Hulmes, C. Burillon, O. Damour and F. Ruggiero (2010). "Use of magnetically oriented orthogonal collagen scaffolds for hemi-corneal reconstruction and regeneration." Biomaterials **31**(32): 8313-8322.
- Chaubaroux, C., E. Vrana, C. Debry, P. Schaaf, B. Senger, J.-C. Voegel, Y. Haikel, C. Ringwald, J. Hemmerlé, P. Lavallo and F. Boulmedais (2012). "Collagen-Based Fibrillar Multilayer Films Cross-Linked by a Natural Agent." Biomacromolecules **13**(7): 2128-2135.
- Chen, A., D. K. Lieu, L. Freschauf, V. Lew, H. Sharma, J. X. Wang, D. Nguyen, I. Karakikes, R. J. Hajjar, A. Gopinathan, E. Botvinick, C. C. Fowlkes, R. A. Li and M. Khine (2011). "Shrink-Film Configurable Multiscale Wrinkles for Functional Alignment of Human Embryonic Stem Cells and their Cardiac Derivatives." Advanced Materials **23**(48): 5785-+.
- Dalby, M. J., M. O. Riehle, S. J. Yarwood, C. D. W. Wilkinson and A. S. G. Curtis (2003). "Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: response to a micro-grooved topography." Experimental Cell Research **284**(2): 272-280.

- Dubey, N., P. C. Letourneau and R. T. Tranquillo (2001). "Neuronal contact guidance in magnetically aligned fibrin gels: effect of variation in gel mechano-structural properties." Biomaterials **22**(10): 1065-1075.
- Glowacki, J. and S. Mizuno (2008). "Collagen scaffolds for tissue engineering." Biopolymers **89**(5): 338-344.
- Grant, G. G. S., D. S. Koktysh, B. Yun, R. L. Matts and N. A. Kotov (2001). "Layer-By-Layer Assembly of Collagen Thin Films: Controlled Thickness and Biocompatibility." Biomedical Microdevices **3**(4): 301-306.
- Huang, N. F., S. Patel, R. G. Thakar, J. Wu, B. S. Hsiao, B. Chu, R. J. Lee and S. Li (2006). "Myotube assembly on nanofibrous and micropatterned polymers." Nano Letters **6**(3): 537-542.
- Johansson, J. A., T. Halthur, M. Herranen, L. Söderberg, U. Elofsson and J. Hilborn (2005). "Build-up of collagen and hyaluronic acid polyelectrolyte multilayers." Biomacromolecules **6**(3): 1353-1359.
- Kaufman, L. J. and C. Guo (2007). "Flow and magnetic field induced collagen alignment." Biomaterials **28**(6): 1105-1114.
- Kopecek, J. (2007). "Hydrogel biomaterials: A smart future?" Biomaterials **28**(34): 5185-5192.
- Kotani, H., M. Iwasaka, S. Ueno and A. Curtis (2000). "Magnetic orientation of collagen and bone mixture." Journal of Applied Physics **87**(9): 6191-6193.
- Lee, P., R. Lin, J. Moon and L. P. Lee (2006). "Microfluidic alignment of collagen fibers for in vitro cell culture." Biomedical Microdevices **8**(1): 35-41.
- Liu, Y. Q., X. P. Zhang, Y. N. Xia and H. Yang (2010). "Magnetic-Field-Assisted Electrospinning of Aligned Straight and Wavy Polymeric Nanofibers." Advanced Materials **22**(22): 2454-+.
- Loesberg, W. A., J. te Riet, F. C. M. J. M. van Delft, P. Schön, C. G. Figdor, S. Speller, J. J. W. A. van Loon, X. F. Walboomers and J. A. Jansen (2007). "The threshold at which substrate nanogroove dimensions may influence fibroblast alignment and adhesion." Biomaterials **28**(27): 3944-3951.

- Mhanna, R. F., J. Vörös and M. Zenobi-Wong (2011). "Layer-by-Layer Films Made from Extracellular Matrix Macromolecules on Silicone Substrates." Biomacromolecules **12**(3): 609-616.
- Oh, H. H., Y.-G. Ko, H. Lu, N. Kawazoe and G. Chen (2012). "Preparation of Porous Collagen Scaffolds with Micropatterned Structures." Advanced Materials **24**(31): 4311-4316.
- Renault-Mihara, F., S. Okada, S. Shibata, M. Nakamura, Y. Toyama and H. Okano (2008). "Spinal cord injury: Emerging beneficial role of reactive astrocytes' migration." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **40**(9): 1649-1653.
- Rezakhaniha, R., A. Agianniotis, J. T. C. Schrauwen, A. Griffa, D. Sage, C. V. C. Bouten, F. N. Vosse, M. Unser and N. Stergiopoulos (2011). "Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy." Biomechanics and Modeling in Mechanobiology **11**(3-4): 461-473.
- Schnell, E., K. Klinkhammer, S. Balzer, G. Brook, D. Klee, P. Dalton and J. Mey (2007). "Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly- ϵ -caprolactone and a collagen/poly- ϵ -caprolactone blend." Biomaterials **28**(19): 3012-3025.
- Slaughter, B. V., S. S. Khurshid, O. Z. Fisher, A. Khademhosseini and N. A. Peppas (2009). "Hydrogels in Regenerative Medicine." Advanced Materials **21**(32-33): 3307-3329.
- Subramony, S. D., B. R. Dargis, M. Castillo, E. U. Azeloglu, M. S. Tracey, A. Su and H. H. Lu (2013). "The guidance of stem cell differentiation by substrate alignment and mechanical stimulation." Biomaterials **34**(8): 1942-1953.
- Sutherland, J., M. Denyer and S. Britland (2005). "Contact guidance in human dermal fibroblasts is modulated by population pressure." Journal of Anatomy **206**(6): 581-587.
- Tanaka, Y., K. Baba, T. J. Duncan, A. Kubota, T. Asahi, A. J. Quantock, M. Yamato, T. Okano and K. Nishida (2011). "Transparent, tough collagen laminates prepared by oriented flow casting, multi-cyclic vitrification and chemical cross-linking." Biomaterials **32**(13): 3358-3366.

- Tang, Z. Y., Y. Wang, P. Podsiadlo and N. A. Kotov (2006). "Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering." Advanced Materials **18**(24): 3203-3224.
- Teixeira, A. I., G. A. Abrams, P. J. Bertics, C. J. Murphy and P. F. Nealey (2003). "Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates." Journal of Cell Science **116**(10): 1881-1892.
- Vernon, R. B., M. D. Gooden, S. L. Lara and T. N. Wight (2005). "Microgrooved fibrillar collagen membranes as scaffolds for cell support and alignment." Biomaterials **26**(16): 3131-3140.
- Vleggeert-Lankamp, C. L. A. M., A. P. Pego, E. A. J. F. Lakke, M. Deenen, E. Marani and R. T. W. M. Thomeer (2004). "Adhesion and proliferation of human Schwann cells on adhesive coatings." Biomaterials **25**(14): 2741-2751.
- Wang, X., C. A. Ohlin, Q. Lu and J. Hu (2008). "Cell directional migration and oriented division on three-dimensional laser-induced periodic surface structures on polystyrene." Biomaterials **29**(13): 2049-2059.
- Weiss, P. (1934). "In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber." Journal of Experimental Zoology **68**(3): 393-448.
- Yang, F., R. Murugan, S. Wang and S. Ramakrishna (2005). "Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering." Biomaterials **26**(15): 2603-2610.
- Zeugolis, D. I., S. T. Khew, E. S. Y. Yew, A. K. Ekaputra, Y. W. Tong, L. Y. L. Yung, D. W. Hutmacher, C. Sheppard and M. Raghunath (2008). "Electro-spinning of pure collagen nano-fibres - Just an expensive way to make gelatin?" Biomaterials **29**(15): 2293-2305.
- Zhang, J., B. Senger, D. Vautier, C. Picart, P. Schaaf, J. C. Voegel and P. Lavalley (2005). "Natural polyelectrolyte films based on layer-by layer deposition of collagen and hyaluronic acid." Biomaterials **26**(16): 3353-3361.

Conclusions et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse a été d'élaborer des revêtements pour la fonctionnalisation de biomatériaux. Les revêtements multicouches de polyélectrolytes présentent de nombreux avantages pour accomplir cette fonction, tels que les nombreux paramètres de construction (pH, épaisseur, propriétés physico-chimiques, nature des polyélectrolytes, etc.) et la possibilité de recouvrir facilement les surfaces. Notre stratégie a consisté à développer un nouveau système multicouche, entièrement naturel, biocompatible, capable de recouvrir des prothèses ou implants et de guider l'adhésion, la prolifération ou la migration de différents types cellulaires.

Dans la première partie de l'étude (Chapitre 3), nous décrivons le nouveau système de films multicouches à base de collagène et d'alginate. Nous avons suivi la construction de ces films, aussi bien en milieu sec qu'en milieu liquide, à l'aide de différentes méthodes (microbalance à cristal de quartz, spectroscopie infrarouge, ellipsométrie). Cependant, ces films qui se construisent à pH 3,8, pH nécessaire à la solubilisation du collagène, sont instables et se détruisent en conditions physiologiques (pH 7,4). Nous avons donc entrepris de stabiliser ces films par une étape de réticulation chimique. Pour ce faire, nous avons employé la génipine, un agent réticulant naturel d'origine végétale (*Gardenia Jasminoïde*). Les résultats montrent que les films ainsi réticulés sont stables en conditions physiologiques. Nous avons également caractérisé la topographie de ces films par différentes techniques de microscopie (électronique à balayage, confocale ou à force atomique). Nous avons observé une structure fibrillaire, due aux fibrilles de collagène, qui reste intacte après l'étape de réticulation avec la génipine. La culture de cellules endothéliales humaines nous a permis de démontrer que ces films sont de très bons supports pour la prolifération de telles cellules.

Le dépôt couche par couche de films multicouches est une technique simple qui convient au recouvrement de surfaces de formes variées. Nous avons ainsi étudié le recouvrement de prothèses à base de microbilles de titane par les films multicouches collagène/alginate réticulés. Les films déposés recouvrent entièrement les billes de titane. Nous avons ensuite étudié l'adhésion et la prolifération de cellules épithéliales déposées sur ces surfaces. Les cellules adhèrent mieux et prolifèrent plus vite sur les implants recouverts avec les films collagène/alginate que sur les implants sans revêtement. Cela démontre qu'il est possible de fonctionnaliser des implants avec les films multicouches collagène/alginate.

Dans la deuxième partie (Chapitre 4), nous avons étudié l'effet d'un étirement uniaxial sur des films multicouches collagène/alginate déposés sur des substrats en poly(diméthylsiloxane) (PDMS). Cette étude a été complétée par une investigation de l'effet de la modification topographique de ces films sur l'adhésion et la prolifération de différents types cellulaires. Les modifications topographiques ont été observées par microscopie électronique à balayage et microscopie à force atomique. Nous avons notamment pu démontrer que les fibrilles de collagène s'alignent le long de l'axe d'étirement des films. Nous avons noté que cet alignement des fibres est modulable. De plus, le degré d'alignement varie avec le taux d'étirement. Un taux d'étirement optimal a pu être établi à 100% (la longueur du substrat en PDMS étiré à 100 % est égale à deux fois la longueur d'origine de ce substrat). Nous avons également développé une méthode informatique à partir du logiciel ImageJ afin de confirmer et de quantifier l'alignement des fibrilles de collagène, des cellules ou des noyaux. Dans l'optique de pouvoir appliquer ces revêtements au recouvrement de biomatériaux, nous avons étudié les comportements d'adhésion et de prolifération de fibroblastes murins et humains ainsi que de cellules gliales provenant du rat. Nous avons particulièrement étudié l'influence de l'alignement des fibres de collagène sur le comportement des différents types cellulaires. Il apparaît que dans tous les cas de figure, les

cellules s'alignent selon l'axe d'orientation des fibrilles de collagène. Enfin, nous avons développé des membranes auto-portées de collagène/alginate réticulées dans le but de pouvoir les déposer sur des implants et fonctionnaliser leurs surfaces. Pour cela, les films collagène/alginate étirés et réticulés sont pelés, à sec, du support en PDMS puis transférés sur le support d'une application. L'étude de l'adhésion et de la prolifération de différents types cellulaires sur des membranes transférées sur des lamelles en verre montre que les cellules s'alignent le long des fibrilles de collagène.

Un certain nombre d'investigations pourraient être conduites pour compléter ce travail de thèse. Dans cette perspective, il serait pertinent d'étudier les lois qui régissent la construction des films que nous avons mis au point. En effet, le mécanisme de construction de films multicouches à base de polysaccharides (alginate de sodium dans cette étude), n'est pas encore bien déterminé. Il semble effectivement que l'utilisation d'un polysaccharide conduise à des modes de construction de type non-linéaire (exponentiel). Or la raison de ce comportement de construction n'est pas encore élucidée. La réaction chimique de réticulation avec la génipine, très récemment développée, reste aussi à définir. La connaissance précise de cette réaction permettrait d'optimiser la réticulation (pH, cinétique, température, quantités de produit). On pourrait aussi envisager de faire varier le module d'Young des films, car le module d'Young, au même titre que la topographie en surface, conditionne l'adhésion et la prolifération cellulaire (Discher *et al.* 2005). Cela permettrait de mieux comprendre le comportement des cellules sur ces surfaces et d'agrandir le champ d'application. Enfin, des études *in vivo* pourraient être menées pour confirmer l'impact (intégration, guidage cellulaire voire tissulaire) des films collagène/alginate sur l'environnement biologique.

Références bibliographiques

Aita, H., N. Hori, M. Takeuchi, T. Suzuki, M. Yamada, M. Anpo and T. Ogawa (2009).

"The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone." Biomaterials **30**(6): 1015-1025.

Anselme, K. and M. Bigerelle (2006a). "Effect of a gold-palladium coating on the long-term adhesion of human osteoblasts on biocompatible metallic materials." Surface & Coatings Technology **200**(22-23): 6325-6330.

Anselme, K. and M. Bigerelle (2006b). "Statistical demonstration of the relative effect of surface chemistry and roughness on human osteoblast short-term adhesion." Journal of Materials Science-Materials in Medicine **17**(5): 471-479.

Arm, D. M. and A. F. Tencer (1997). "Effects of cyclical mechanical stress on the controlled release of proteins from a biodegradable polymer implant." Journal of Biomedical Materials Research **35**(4): 433-441.

Baker, S. C., N. Atkin, P. A. Gunning, N. Granville, K. Wilson, D. Wilson and J. Southgate

(2006). "Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional in vitro biological studies." Biomaterials **27**(16): 3136-3146.

Barthès, J., D. Mertz, C. Bach, M. H. Metz-Boutigue, B. Senger, J. C. Voegel, P. Schaaf and P. Lavallo (2012). "Stretch-Induced Biodegradation of Polyelectrolyte Multilayer Films for Drug Release." Langmuir **28**(38): 13550-13554.

Bashur, C. A. and A. Ramamurthi (2012). "Aligned electrospun scaffolds and elastogenic factors for vascular cell-mediated elastic matrix assembly." Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine **6**(9): 673-686.

Bhattacharai, S. R., N. Bhattacharai, H. K. Yi, P. H. Hwang, D. I. Cha and H. Y. Kim (2004). "Novel biodegradable electrospun membrane: scaffold for tissue engineering." Biomaterials **25**(13): 2595-2602.

- Bigerelle, M. and K. Anselme (2005). "Statistical correlation between cell adhesion and proliferation on biocompatible metallic materials." Journal of Biomedical Materials Research Part A **72A**(1): 36-46.
- Bigerelle, M., K. Anselme, B. Noel, I. Ruderman, P. Hardouin and A. Iost (2002). "Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to increase in vitro human osteoblast response." Biomaterials **23**(7): 1563-1577.
- Binnig, G., C. F. Quate and C. Gerber (1986). "Atomic Force Microscope." Physical Review Letters **56**(9): 930-933.
- Binnig, G. and H. Rohrer (1982). "Scanning Tunneling Microscopy." Helvetica Physica Acta **55**(6): 726-735.
- Blodgett, K. B. and I. Langmuir (1937). "Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties." Physical Review **51**(11): 964-982.
- Bobyn, J. D., R. M. Pilliar, H. U. Cameron and G. C. Weatherly (1980). "The Optimum Pore-Size for the Fixation of Porous-Surfaced Metal Implants by the Ingrowth of Bone." Clinical Orthopaedics and Related Research(150): 263-270.
- Boudou, T., T. Crouzier, K. Ren, G. Blin and C. Picart (2010). "Multiple Functionalities of Polyelectrolyte Multilayer Films: New Biomedical Applications." Advanced Materials **22**(4): 441-467.
- Boulmedais, F., B. Frisch, O. Etienne, P. Lavalley, C. Picart, J. Ogier, J. C. Voegel, P. Schaaf and C. Egles (2004). "Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials." Biomaterials **25**(11): 2003-2011.
- Britland, S., H. Morgan, B. Wojniak-Stodart, M. Riehle, A. Curtis and C. Wilkinson (1996). "Synergistic and hierarchical adhesive and topographic guidance of BHK cells." Experimental Cell Research **228**(2): 313-325.
- Brown, A. E. X., R. I. Litvinov, D. E. Discher, P. K. Purohit and J. W. Weisel (2009). "Multiscale Mechanics of Fibrin Polymer: Gel Stretching with Protein Unfolding and Loss of Water." Science **325**(5941): 741-744.

- Builles, N., H. Janin-Manificat, M. Malbouyres, V. Justin, M. R. Rovere, G. Pellegrini, J. Torbet, D. J. S. Hulmes, C. Burillon, O. Damour and F. Ruggiero (2010). "Use of magnetically oriented orthogonal collagen scaffolds for hemi-corneal reconstruction and regeneration." Biomaterials **31**(32): 8313-8322.
- Burnham, N. A., D. D. Dominguez, R. L. Mowery and R. J. Colton (1990). "Probing the Surface Forces of Monolayer Films with an Atomic-Force Microscope." Physical Review Letters **64**(16): 1931-1934.
- Cai, G., W. Lee, S. K. Min, G. Koo, B. W. Cho, S. H. Lee and S. H. Han (2009). "Modification of ion permeability utilizing pH-dependent selective swelling of polyelectrolyte multilayer films." J Nanosci Nanotechnol **9**(12): 7209-7214.
- Cai, K., A. Rechtenbach, J. Hao, J. Bossert and K. D. Jandt (2005). "Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: Characterization and cell behaviour aspects." Biomaterials **26**(30): 5960-5971.
- Chan, C. E. and D. J. Odde (2008). "Traction Dynamics of Filopodia on Compliant Substrates." Science **322**(5908): 1687-1691.
- Chaubaroux, C., E. Vrana, C. Debry, P. Schaaf, B. Senger, J.-C. Voegel, Y. Haikel, C. Ringwald, J. Hemmerlé, P. Lavalley and F. Boulmedais (2012). "Collagen-Based Fibrillar Multilayer Films Cross-Linked by a Natural Agent." Biomacromolecules **13**(7): 2128-2135.
- Chen, A., D. K. Lieu, L. Freschauf, V. Lew, H. Sharma, J. X. Wang, D. Nguyen, I. Karakikes, R. J. Hajjar, A. Gopinathan, E. Botvinick, C. C. Fowlkes, R. A. Li and M. Khine (2011). "Shrink-Film Configurable Multiscale Wrinkles for Functional Alignment of Human Embryonic Stem Cells and their Cardiac Derivatives." Advanced Materials **23**(48): 5785-+.
- Chen, J. Y., L. Huang, L. M. Ying, G. B. Luo, X. S. Zhao and W. X. Cao (1999). "Self-assembly ultrathin films based on diazoresins." Langmuir **15**(21): 7208-7212.
- Corey, J. M., D. Y. Lin, K. B. Mycek, Q. Chen, S. Samuel, E. L. Feldman and D. C. Martin (2007). "Aligned electrospun nanofibers specify the direction of dorsal root ganglia neurite growth." Journal of Biomedical Materials Research Part A **83A**(3): 636-645.

- Crouzier, T., A. Szarpak, T. Boudou, R. Auzely-Velty and C. Picart (2010). "Polysaccharide-Blend Multi layers Containing Hyaluronan and Heparin as a Delivery System for rhBMP-2." Small **6**(5): 651-662.
- Curtis, A. and C. Wilkinson (1997). "Topographical control of cells." Biomaterials **18**(24): 1573-1583.
- Curtis, A. S. G., N. Gadegaard, M. J. Dalby, M. O. Riehle, C. D. W. Wilkinson and G. Aitchison (2004). "Cells react to nanoscale order and symmetry in their surroundings." Ieee Transactions on Nanobioscience **3**(1): 61-65.
- Dado, D. and S. Levenberg (2009). "Cell-scaffold mechanical interplay within engineered tissue." Seminars in Cell & Developmental Biology **20**(6): 656-664.
- Dai, Z. F. and H. Möhwald (2002). "Highly stable and Biocompatible Nafion-based capsules with controlled permeability for low-molecular-weight species." Chemistry-a European Journal **8**(20): 4751-4755.
- Dalby, M. J., M. O. Riehle, H. J. H. Johnstone, S. Affrossman and A. S. G. Curtis (2002). "Polymer-demixed nanotopography: Control of fibroblast spreading and proliferation." Tissue Engineering **8**(6): 1099-1108.
- Dalby, M. J., M. O. Riehle, S. J. Yarwood, C. D. W. Wilkinson and A. S. G. Curtis (2003). "Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: response to a micro-grooved topography." Experimental Cell Research **284**(2): 272-280.
- Davison, P. F. (1969). "Treatise on Collagen. Vol. 1, Chemistry of Collagen. G. N. Ramachandran. Vols. 2 and 3, Biology of Collagen, Parts A and B. Bernard S. Gould. Academic Press, New York, 1967-68." Science **164**(3876): 172.
- Decher, G. (1997). "Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites." Science **277**(5330): 1232-1237.
- Decher, G. and J. D. Hong (1991). "Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process .2. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles and Polyelectrolytes on Charged Surfaces." Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics **95**(11): 1430-1434.

- Decher, G., J. D. Hong and J. Schmitt (1992a). "Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process .3. Consecutively Alternating Adsorption of Anionic and Cationic Polyelectrolytes on Charged Surfaces." Thin Solid Films **210**(1-2): 831-835.
- Decher, G., Y. Lvov and J. Schmitt (1994). "Proof of Multilayer Structural Organization in Self-Assembled Polycation Polyanion Molecular Films." Thin Solid Films **244**(1-2): 772-777.
- Decher, G., J. MacLennan, U. Sohling and J. Reibel (1992b). "Creation and Structural Comparison of Ultrathin Film Assemblies - Transferred Freely Suspended Films and Langmuir-Blodgett-Films of Liquid-Crystals." Thin Solid Films **210**(1-2): 504-507.
- Decher, G., J. Schmitt, F. Brand, B. Lehr, R. Oeser, M. Losche, W. Bouwman, K. Kjaer, J. Calvert, R. Geer, W. Dressik and R. Shashidhar (1997). "Layered multicomposite films by consecutive adsorption from solution: From structure to new nanomaterials." Abstracts of Papers of the American Chemical Society **214**: 42-Mtls.
- den Braber, E. T., J. E. de Ruijter, L. A. Ginsel, A. F. von Recum and J. A. Jansen (1998). "Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces." Journal of Biomedical Materials Research **40**(2): 291-300.
- Discher, D. E., P. Janmey and Y. L. Wang (2005). "Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate." Science **310**(5751): 1139-1143.
- Dubey, N., P. C. Letourneau and R. T. Tranquillo (2001). "Neuronal contact guidance in magnetically aligned fibrin gels: effect of variation in gel mechano-structural properties." Biomaterials **22**(10): 1065-1075.
- Dunn, G. A. and T. Ebendal (1978). "Some Aspects of Contact Guidance." Zoon **6**: 65-68.
- Dupret-Bories, A., P. Schultz, N. E. Vrana, P. Lavalley, D. Vautier and C. Debry (2011). "Development of surgical protocol for implantation of tracheal prostheses in sheep." Journal of Rehabilitation Research and Development **48**(7): 851-863.

Elbert, D. L., C. B. Herbert and J. A. Hubbell (1999). "Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces." Langmuir **15**(16): 5355-5362.

Elçin, Y. M. (1995). "Encapsulation of urease enzyme in xanthan-alginate spheres." Biomaterials **16**(15): 1157-1161.

Flemming, R. G., C. J. Murphy, G. A. Abrams, S. L. Goodman and P. F. Nealey (1999). "Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior." Biomaterials **20**(6): 573-588.

Francius, G., J. Hemmerlé, J. Ohayon, P. Schaaf, J. C. Voegel, C. Picart and B. Senger (2006). "Effect of crosslinking on the elasticity of polyelectrolyte multilayer films measured by colloidal probe AFM." Microscopy Research and Technique **69**(2): 84-92.

Fringeli, U. P. and H. H. Günthard (1981). Membrane spectroscopy. E. Grell. Berlin, Springer.

Fromherz, P. and W. Arden (1980). "Ph-Modulated Pigment Antenna in Lipid Bilayer on Photosensitized Semiconductor Electrode." Journal of the American Chemical Society **102**(20): 6211-6218.

Ghosh, K., Z. Pan, E. Guan, S. R. Ge, Y. J. Liu, T. Nakamura, X. D. Ren, M. Rafailovich and R. A. F. Clark (2007). "Cell adaptation to a physiologically relevant ECM mimic with different viscoelastic properties." Biomaterials **28**(4): 671-679.

Glowacki, J. and S. Mizuno (2008). "Collagen scaffolds for tissue engineering." Biopolymers **89**(5): 338-344.

Gobin, A. S., C. E. Butler and A. B. Mathur (2006). "Repair and regeneration of the abdominal wall musculofascial defect using silk fibroin-chitosan blend." Tissue Engineering **12**(12): 3383-3394.

- Golander, C. G., H. Arwin, J. C. Eriksson, I. Lundstrom and R. Larsson (1982). "Heparin Surface-Film Formation through Adsorption of Colloidal Particles Studied by Ellipsometry and Scanning Electron-Microscopy." Colloids and Surfaces **5**(1): 1-16.
- Grant, G. G. S., D. S. Koktysh, B. Yun, R. L. Matts and N. A. Kotov (2001). "Layer-By-Layer Assembly of Collagen Thin Films: Controlled Thickness and Biocompatibility." Biomedical Microdevices **3**(4): 301-306.
- Gray, D. S., J. Tien and C. S. Chen (2003). "Repositioning of cells by mechanotaxis on surfaces with micropatterned Young's modulus." Journal of Biomedical Materials Research Part A **66A**(3): 605-614.
- Guang, C., H. G. Hong and T. E. Mallouk (1992). "Layered Metal Phosphates and Phosphonates - from Crystals to Monolayers." Accounts of Chemical Research **25**(9): 420-427.
- H**arrick, N. J. (1967). Internal reflection spectroscopy. New-York, Wiley-Interscience.
- Harris, J. J., P. M. DeRose and M. L. Bruening (1999). "Synthesis of passivating, nylon-like coatings through cross-linking of ultrathin polyelectrolyte films." Journal of the American Chemical Society **121**(9): 1978-1979.
- Hemmerlé, J., V. Roucoules, G. Fleith, M. Nardin, V. Ball, P. Lavalle, P. Marie, J. C. Voegel and P. Schaaf (2005). "Mechanically responsive films of variable hydrophobicity made of polyelectrolyte multilayers." Langmuir **21**(23): 10328-10331.
- Hillberg, A. L., C. A. Holmes and M. Tabrizian (2009). "Effect of genipin cross-linking on the cellular adhesion properties of layer-by-layer assembled polyelectrolyte films." Biomaterials **30**(27): 4463-4470.
- Houtchens, G. R., M. D. Foster, T. A. Desai, E. F. Morgan and J. Y. Wong (2008). "Combined effects of microtopography and cyclic strain on vascular smooth muscle cell orientation." Journal of Biomechanics **41**(4): 762-769.
- Huang, N. F., S. Patel, R. G. Thakar, J. Wu, B. S. Hsiao, B. Chu, R. J. Lee and S. Li (2006). "Myotube assembly on nanofibrous and micropatterned polymers." Nano Letters **6**(3): 537-542.

Hulmes, D. J. S., A. Miller, D. A. D. Parry, K. A. Piez and J. Woodhead-Galloway (1973). "Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing." Journal of Molecular Biology **79**(1): 137-148.

Iler, R. K. (1966). "Multilayers of colloidal particles." Journal of Colloid and Interface Science **21**(6): 569-594.

Johansson, F., P. Carlberg, N. Danielsen, L. Montelius and M. Kanje (2006). "Axonal outgrowth on nano-imprinted patterns." Biomaterials **27**(8): 1251-1258.

Johansson, J. A., T. Halthur, M. Herranen, L. Söderberg, U. Elofsson and J. Hilborn (2005a). "Build-up of collagen and hyaluronic acid polyelectrolyte multilayers." Biomacromolecules **6**(3): 1353-1359.

Johansson, J. Å., T. Halthur, M. Herranen, L. Söderberg, U. Elofsson and J. Hilborn (2005b). "Build-up of Collagen and Hyaluronic Acid Polyelectrolyte Multilayers." Biomacromolecules **6**(3): 1353-1359.

Karamichos, D., R. A. Brown and V. Mudera (2006). "Complex dependence of substrate stiffness and serum concentration on cell-force generation." Journal of Biomedical Materials Research Part A **78A**(2): 407-415.

Katz, M. J. and R. J. Lasek (1980). "Invited Review - Guidance Cue Patterns and Cell-Migration in Multicellular Organisms." Cell Motility and the Cytoskeleton **1**(1): 141-157.

Kaufman, L. J. and C. Guo (2007). "Flow and magnetic field induced collagen alignment." Biomaterials **28**(6): 1105-1114.

Kopecek, J. (2007). "Hydrogel biomaterials: A smart future?" Biomaterials **28**(34): 5185-5192.

Kotani, H., M. Iwasaka, S. Ueno and A. Curtis (2000). "Magnetic orientation of collagen and bone mixture." Journal of Applied Physics **87**(9): 6191-6193.

- Lackie, J. M. and A. J. Lawrence (1986). "Signal Transduction in Neutrophil Leukocytes - Modulation by Exogenous Phospholipase-A2." European Journal of Cell Biology **40**: 11-11.
- Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue Engineering." Science **260**(5110): 920-926.
- Lavalle, P., C. Gergely, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J. C. Voegel and C. Picart (2002). "Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: An in situ atomic force microscopy study." Macromolecules **35**(11): 4458-4465.
- Lee, B. J. and T. Kunitake (1994). "2-Dimensional Polymer Networks of Maleic-Acid Copolymers and Poly(Allylamine) by the Langmuir-Blodgett Technique." Langmuir **10**(2): 557-562.
- Lee, P., R. Lin, J. Moon and L. P. Lee (2006). "Microfluidic alignment of collagen fibers for in vitro cell culture." Biomedical Microdevices **8**(1): 35-41.
- Lee, S. S., J. D. Hong, C. H. Kim, K. Kim, J. P. Koo and K. B. Lee (2001). "Layer-by-layer deposited multilayer assemblies of ionene-type polyelectrolytes based on the spin-coating method." Macromolecules **34**(16): 5358-5360.
- Levesque, M. J., D. Liepsch, S. Moravec and R. M. Nerem (1986). "Correlation of Endothelial-Cell Shape and Wall Shear-Stress in a Stenosed Dog Aorta." Arteriosclerosis **6**(2): 220-229.
- Lim, J. Y. and H. J. Donahue (2007). "Cell sensing and response to micro- and nanostructured surfaces produced by chemical and topographic patterning." Tissue Engineering **13**(8): 1879-1891.
- Liu, Y. Q., X. P. Zhang, Y. N. Xia and H. Yang (2010). "Magnetic-Field-Assisted Electrospinning of Aligned Straight and Wavy Polymeric Nanofibers." Advanced Materials **22**(22): 2454-+.
- Lo, C. M., H. B. Wang, M. Dembo and Y. L. Wang (2000). "Cell movement is guided by the rigidity of the substrate." Biophysical Journal **79**(1): 144-152.

Loesberg, W. A., J. te Riet, F. C. M. J. M. van Delft, P. Schön, C. G. Figdor, S. Speller, J. J. W. A. van Loon, X. F. Walboomers and J. A. Jansen (2007). "The threshold at which substrate nanogroove dimensions may influence fibroblast alignment and adhesion." Biomaterials **28**(27): 3944-3951.

Marenzana, M., D. J. Kelly, P. J. Prendergast and R. A. Brown (2007). "A collagen-based interface construct for the assessment of cell-dependent mechanical integration of tissue surfaces." Cell and Tissue Research **327**(2): 293-300.

Mark, D., S. Haeberle, G. Roth, F. von Stetten and R. Zengerle (2010). "Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications." Chemical Society Reviews **39**(3): 1153-1182.

Martin, Y., D. Rugar and H. K. Wickramasinghe (1988). "High-Resolution Magnetic Imaging of Domains in Tbfe by Force Microscopy." Applied Physics Letters **52**(3): 244-246.

McAloney, R. A., M. Sinyor, V. Dudnik and M. C. Goh (2001). "Atomic force microscopy studies of salt effects on polyelectrolyte multilayer film morphology." Langmuir **17**(21): 6655-6663.

Mertz, D., J. Hemmerle, F. Boulmedais, J. C. Voegel, P. Lavallo and P. Schaaf (2007). "Polyelectrolyte multilayer films under mechanical stretch." Soft Matter **3**(11): 1413-1420.

Mhanna, R. F., J. Vörös and M. Zenobi-Wong (2011). "Layer-by-Layer Films Made from Extracellular Matrix Macromolecules on Silicone Substrates." Biomacromolecules **12**(3): 609-616.

Mi, F. L., S. S. Shyu and C. K. Peng (2005). "Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin." Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry **43**(10): 1985-2000.

Mills, I., C. R. Cohen, K. Kamal, G. Li, T. Shin, W. Du and B. E. Sumpio (1997). "Strain activation of bovine aortic smooth muscle cell proliferation and alignment: Study of strain dependency and the role of protein kinase A and C signaling pathways." Journal of Cellular Physiology **170**(3): 228-234.

- Morra, M., C. Cassinelli, G. Cascardo, P. Cahalan, L. Cahalan, M. Fini and R. Giardino (2003). "Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies." Biomaterials **24**(25): 4639-4654.
- Mueller, R., K. Kohler, R. Weinkamer, G. Sukhorukov and A. Fery (2005). "Melting of PDADMAC/PSS capsules investigated with AFM force spectroscopy." Macromolecules **38**(23): 9766-9771.
- Netzer, L. and J. Sagiv (1983). "A New Approach to Construction of Artificial Monolayer Assemblies." Journal of the American Chemical Society **105**(3): 674-676.
- Noden, D. M. (1991). "Cell movements and control of patterned tissue assembly during craniofacial development." J Craniofac Genet Dev Biol **11**(4): 192-213.
- Noort, R. (1987). "Titanium: The implant material of today." Journal of Materials Science **22**(11): 3801-3811.
- Norton, E. K. and C. S. Izzard (1981). "The Role of Fibronectin and Other Cell-Surface Glycoproteins in the Formation of Close and Focal Contacts." Journal of Cell Biology **91**(2): A110-A110.
- Nöth, U., L. Rackwitz, A. F. Steinert and R. S. Tuan (2010). "Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration." Advanced Drug Delivery Reviews **62**(7-8): 765-783.
- Oakley, C. and D. M. Brunette (1993). "The Sequence of Alignment of Microtubules, Focal Contacts and Actin-Filaments in Fibroblasts Spreading on Smooth and Grooved Titanium Substrata." Journal of Cell Science **106**: 343-354.
- Obradovic, B., I. Martin, R. F. Padera, S. Treppo, L. E. Freed and G. Vunjak-Novakovic (2001). "Integration of engineered cartilage." Journal of Orthopaedic Research **19**(6): 1089-1097.
- Oh, H. H., Y.-G. Ko, H. Lu, N. Kawazoe and G. Chen (2012). "Preparation of Porous Collagen Scaffolds with Micropatterned Structures." Advanced Materials **24**(31): 4311-4316.

Okazaki, Y., S. Rao, T. Tateishi and Y. Ito (1998). "Cytocompatibility of various metal and development of new titanium alloys for medical implants." Materials Science and Engineering a-Structural Materials Properties Microstructure and Processing **243**(1-2): 250-256.

Pease, R. F. and S. Y. Chou (2008). "Lithography and other patterning techniques for future electronics." Proceedings of the Ieee **96**(2): 248-270.

Pedicini, A. and R. J. Farris (2003). "Mechanical behavior of electrospun polyurethane." Polymer **44**(22): 6857-6862.

Picart, C., P. Lavalle, P. Hubert, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf and J. C. Voegel (2001). "Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface." Langmuir **17**(23): 7414-7424.

Pins, G. D., E. K. Huang, D. L. Christiansen and F. H. Silver (1997). "Effects of static axial strain on the tensile properties and failure mechanisms of self-assembled collagen fibers." Journal of Applied Polymer Science **63**(11): 1429-1440.

Qiu, J., J. Li, G. Wang, L. Zheng, N. Ren, H. Liu, W. Tang, H. Jiang and Y. Wang (2012). "In vitro Investigation on the Biodegradability and Biocompatibility of Genipin Cross-linked Porcine Acellular Dermal Matrix with Intrinsic Fluorescence." ACS Applied Materials & Interfaces **5**(2): 344-350.

Rajnicek, A. M., L. E. Foubister and C. D. McCaig (2007). "Prioritising guidance cues: Directional migration induced by substratum contours and electrical gradients is controlled by a rho/cdc42 switch." Developmental Biology **312**(1): 448-460.

Rajnicek, A. M., L. E. Foubister and C. D. McCaig (2008). "Alignment of corneal and lens epithelial cells by co-operative effects of substratum topography and DC electric fields." Biomaterials **29**(13): 2082-2095.

Ramachandran, G. N. (1956). "Structure of Collagen." Nature **177**(4511): 710-711.

- Reisch, A., J. Hemmerlé, J. C. Voegel, E. Gonthier, G. Decher, N. Benkirane-Jessel, A. Chassepot, D. Mertz, P. Lavalle, P. Mesini and P. Schaaf (2008). "Polyelectrolyte multilayer coatings that resist protein adsorption at rest and under stretching." Journal of Materials Chemistry **18**(36): 4242-4245.
- Renault-Mihara, F., S. Okada, S. Shibata, M. Nakamura, Y. Toyama and H. Okano (2008). "Spinal cord injury: Emerging beneficial role of reactive astrocytes' migration." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **40**(9): 1649-1653.
- Reneker, D. H., A. L. Yarin, H. Fong and S. Koombhongse (2000). "Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning." Journal of Applied Physics **87**(9): 4531-4547.
- Rezakhaniha, R., A. Agianniotis, J. T. C. Schrauwen, A. Griffa, D. Sage, C. V. C. Bouten, F. N. Vosse, M. Unser and N. Stergiopoulos (2011). "Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy." Biomechanics and Modeling in Mechanobiology **11**(3-4): 461-473.
- Rich, A. and F. H. C. Crick (1955). "The Structure of Collagen." Nature **176**(4489): 915-916.
- Richert, L., F. Boulmedais, P. Lavalle, J. Mutterer, E. Ferreux, G. Decher, P. Schaaf, J. C. Voegel and C. Picart (2004). "Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking." Biomacromolecules **5**(2): 284-294.
- Rodahl, M. and B. Kasemo (1996). "On the measurement of thin liquid overlayers with the quartz-crystal microbalance." Sensors and Actuators a-Physical **54**(1-3): 448-456.
- Ruths, J., F. Essler, G. Decher and H. Riegler (2000). "Polyelectrolytes I: Polyanion/polycation multilayers at the air/monolayer/water interface as elements for quantitative polymer adsorption studies and preparation of hetero-superlattices on solid surfaces." Langmuir **16**(23): 8871-8878.
- Sanes, J. R., E. Engvall, R. Butkowski and D. D. Hunter (1990). "Molecular Heterogeneity of Basal Laminae - Isoforms of Laminin and Collagen-IV at the Neuromuscular-Junction and Elsewhere." Journal of Cell Biology **111**(4): 1685-1699.

- Sauerbrey, G. (1959). "Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung." Zeitschrift für Physik **155**(2): 206-222.
- Schlenoff, J. B., S. T. Dubas and T. Farhat (2000). "Sprayed polyelectrolyte multilayers." Langmuir **16**(26): 9968-9969.
- Schmitt, J., T. Grunewald, G. Decher, P. S. Pershan, K. Kjaer and M. Losche (1993). "Internal Structure of Layer-by-Layer Adsorbed Polyelectrolyte Films - a Neutron and X-Ray Reflectivity Study." Macromolecules **26**(25): 7058-7063.
- Schnell, E., K. Klinkhammer, S. Balzer, G. Brook, D. Klee, P. Dalton and J. Mey (2007). "Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly- ϵ -caprolactone and a collagen/poly- ϵ -caprolactone blend." Biomaterials **28**(19): 3012-3025.
- Schuetz, P. and F. Caruso (2003). "Copper-assisted weak polyelectrolyte multilayer formation on microspheres and subsequent film crosslinking." Advanced Functional Materials **13**(12): 929-937.
- Scotti, C., M. S. Buragas, L. Mangiavini, C. Sosio, A. Di Giancamillo, C. Domeneghini, G. Fraschini and G. M. Peretti (2007). "A tissue engineered osteochondral plug: an in vitro morphological evaluation." Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy **15**(11): 1363-1369.
- Sechler, J. L., S. A. Corbett, M. B. Wenk and J. E. Schwarzbauer (1998). "Modulation of cell-extracellular matrix interactions." Morphogenesis: Cellular Interactions **857**: 143-154.
- Serpe, M. J., K. A. Yarmey, C. M. Nolan and L. A. Lyon (2005). "Doxorubicin uptake and release from microgel thin films." Biomacromolecules **6**(1): 408-413.
- Simone, R. P. (2010). Epithelial morphogenesis and cell polarity in the drosophila embryo and larva. Ann Arbor, University of Pennsylvania. **3447171**: 110.
- Slaughter, B. V., S. S. Khurshid, O. Z. Fisher, A. Khademhosseini and N. A. Peppas (2009). "Hydrogels in Regenerative Medicine." Advanced Materials **21**(32-33): 3307-3329.

- Spalazzi, J. P., S. B. Doty, K. L. Moffat, W. N. Levine and H. H. Lu (2006). "Development of controlled matrix heterogeneity on a triphasic scaffold for orthopedic interface tissue engineering." Tissue Engineering **12**(12): 3497-3508.
- Stopak, D. and A. K. Harris (1982). "Measurement of the Strain Induced in Collagen Gels by Fibroblast Explants." Journal of Cell Biology **95**(2): A137-A137.
- Subramony, S. D., B. R. Dargis, M. Castillo, E. U. Azeloglu, M. S. Tracey, A. Su and H. H. Lu (2013). "The guidance of stem cell differentiation by substrate alignment and mechanical stimulation." Biomaterials **34**(8): 1942-1953.
- Sutherland, J., M. Denyer and S. Britland (2005). "Contact guidance in human dermal fibroblasts is modulated by population pressure." Journal of Anatomy **206**(6): 581-587.
- Tanaka, Y., K. Baba, T. J. Duncan, A. Kubota, T. Asahi, A. J. Quantock, M. Yamato, T. Okano and K. Nishida (2011). "Transparent, tough collagen laminates prepared by oriented flow casting, multi-cyclic vitrification and chemical cross-linking." Biomaterials **32**(13): 3358-3366.
- Tang, Z. Y., Y. Wang, P. Podsiadlo and N. A. Kotov (2006). "Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering." Advanced Materials **18**(24): 3203-3224.
- Teixeira, A. I., G. A. Abrams, P. J. Bertics, C. J. Murphy and P. F. Nealey (2003). "Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates." Journal of Cell Science **116**(10): 1881-1892.
- Teixeira, A. I., G. A. McKie, J. D. Foley, P. J. Bertics, P. F. Nealey and C. J. Murphy (2006). "The effect of environmental factors on the response of human corneal epithelial cells to nanoscale substrate topography." Biomaterials **27**(21): 3945-3954.
- Torbet, J., J. M. Freyssinet and G. Hudry-Clergeon (1981). "Oriented fibrin gels formed by polymerization in strong magnetic fields." Nature **289**(5793): 91-93.
- Torbet, J., M. Malbouyres, N. Builles, V. Justin, M. Roulet, O. Damour, Å. Oldberg, F. Ruggiero and D. J. S. Hulmes (2007). "Orthogonal scaffold of magnetically aligned

collagen lamellae for corneal stroma reconstruction." Biomaterials **28**(29): 4268-4276.

Torbet, J. and M. C. Ronziere (1984). "Magnetic Alignment of Collagen during Self-Assembly." Biochemical Journal **219**(3): 1057-1059.

Traub, W. (1981). "Citation Classic - the Chemistry and Structure of Collagen." Current Contents/Life Sciences(5): 17-17.

Vannoort, R. (1987). "Titanium - the Implant Material of Today." Journal of Materials Science **22**(11): 3801-3811.

Vernon, R. B., M. D. Gooden, S. L. Lara and T. N. Wight (2005). "Microgrooved fibrillar collagen membranes as scaffolds for cell support and alignment." Biomaterials **26**(16): 3131-3140.

Vleggeert-Lankamp, C. L. A. M., A. P. Pego, E. A. J. F. Lakke, M. Deenen, E. Marani and R. T. W. M. Thomeer (2004). "Adhesion and proliferation of human Schwann cells on adhesive coatings." Biomaterials **25**(14): 2741-2751.

Voinova, M. V., M. Rodahl, M. Jonson and B. Kasemo (1999). "Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: Continuum mechanics approach." Physica Scripta **59**(5): 391-396.

Vrana, N. E., A. Dupret-Bories, C. Bach, C. Chaubaroux, C. Coraux, D. Vautier, F. Boulmedais, Y. Haikel, C. Debry, M. H. Metz-Boutigue and P. Lavalley (2012). "Modification of macroporous titanium tracheal implants with biodegradable structures: Tracking in vivo integration for determination of optimal in situ epithelialization conditions." Biotechnology and Bioengineering **109**(8): 2134-2146.

Vrana, N. E., A. Dupret-Bories, C. Chaubaroux, E. Rieger, C. Debry, D. Vautier, M.-H. Metz-Boutigue and P. Lavalley (2013). "Multi-Scale Modification of Metallic Implants With Pore Gradients, Polyelectrolytes and Their Indirect Monitoring In vivo." (77): e50533.

Vuillaume, P. Y., A. M. Jonas and A. Laschewsky (2002). "Ordered polyelectrolyte "multilayers". 5. Photo-cross-linking of hybrid films containing an unsaturated and

hydrophobized poly(diallylammonium) salt and exfoliated clay." Macromolecules **35**(13): 5004-5012.

Wallingford, J. B., S. E. Fraser and R. M. Harland (2002). "Convergent extension: The molecular control of polarized cell movement during embryonic development." Developmental Cell **2**(6): 695-706.

Wang, H. G., T. Y. Yin, S. P. Ge, Q. Zhang, Q. L. Dong, D. X. Lei, D. M. Sun and G. X. Wang (2013). "Biofunctionalization of titanium surface with multilayer films modified by heparin-VEGF-fibronectin complex to improve endothelial cell proliferation and blood compatibility." Journal of Biomedical Materials Research Part A **101**(2): 413-420.

Wang, X., C. A. Ohlin, Q. Lu and J. Hu (2008). "Cell directional migration and oriented division on three-dimensional laser-induced periodic surface structures on polystyrene." Biomaterials **29**(13): 2049-2059.

Wang, Y. L. and R. J. Pelham (1998). "Preparation of a flexible, porous polyacrylamide substrate for mechanical studies of cultured cells." Molecular Motors and the Cytoskeleton, Pt B **298**: 489-496.

Weiss, P. (1934). "In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber." Journal of Experimental Zoology **68**(3): 393-448.

Whitesides, G. M. (2006). "The origins and the future of microfluidics." Nature **442**(7101): 368-373.

Williams, D. F. (2006). "To engineer is to create: the link between engineering and regeneration." Trends in Biotechnology **24**(1): 4-8.

Wojciakstothard, B., A. Curtis, W. Monaghan, K. Macdonald and C. Wilkinson (1996). "Guidance and activation of murine macrophages by nanometric scale topography." Experimental Cell Research **223**(2): 426-435.

Wojciakstothard, B., A. Curtis, W. Monaghan, M. Mcgrath, I. Sommer and C. Wilkinson (1995). "Role of the Cytoskeleton in the Reaction of Fibroblasts to Multiple Grooved Substrata." Cell Motility and the Cytoskeleton **31**(2): 147-158.

Worcester, D. L. (1978). "Structural Origins of Diamagnetic Anisotropy in Proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **75**(11): 5475-5477.

Wyckoff, R. W. G., R. B. Corey and J. Biscoe (1935). "X-RAY REFLECTIONS OF LONG SPACING FROM TENDON." Science **82**(2121): 175-176.

Yang, F., R. Murugan, S. Wang and S. Ramakrishna (2005). "Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering." Biomaterials **26**(15): 2603-2610.

Yano, T., Y. Higaki, D. Tao, D. Murakami, M. Kobayashi, N. Ohta, J.-i. Koike, M. Horigome, H. Masunaga, H. Ogawa, Y. Ikemoto, T. Moriwaki and A. Takahara (2012). "Orientation of poly(vinyl alcohol) nanofiber and crystallites in non-woven electrospun nanofiber mats under uniaxial stretching." Polymer **53**(21): 4702-4708.

Zeugolis, D. I., S. T. Khew, E. S. Y. Yew, A. K. Ekaputra, Y. W. Tong, L. Y. L. Yung, D. W. Hutmacher, C. Sheppard and M. Raghunath (2008). "Electro-spinning of pure collagen nano-fibres - Just an expensive way to make gelatin?" Biomaterials **29**(15): 2293-2305.

Zhang, J., B. Senger, D. Vautier, C. Picart, P. Schaaf, J. C. Voegel and P. Lavalley (2005). "Natural polyelectrolyte films based on layer-by layer deposition of collagen and hyaluronic acid." Biomaterials **26**(16): 3353-3361.

Zhao, B., W. Tian, H. Feng, I.-S. Lee and F. Cui (2005). "Effects of RGD peptide grafting to titanium dental implants on the adhesion of human gingival fibroblasts and epithelial cells." Current Applied Physics **5**(5): 407-410.

Zhu, B. S., Q. H. Lu, J. Yin, J. Hu and Z. G. Wang (2005). "Alignment of osteoblast-like cells and cell-produced collagen matrix induced by nanogrooves." Tissue Engineering **11**(5-6): 825-834.

Zou, C., E. Zhang, M. Li and S. Zeng (2008). "Preparation, microstructure and mechanical properties of porous titanium sintered by Ti fibres." J Mater Sci Mater Med **19**(1): 401-405.

Résumé de la thèse

Revêtements à base de collagène pour la fonctionnalisation de biomatériaux

Discipline : **Chimie Physique**

Unité de Recherche : **INSERM UMR-S 1121**

Directeur de Thèse : **Joseph HEMMERLE**, Ingénieur de Recherche

Directeur de Thèse : **Youssef HAIKEL**, Professeur-Praticien Hospitalier

Ecole Doctorale de Physique et Chimie Physique (ED 182)

La fonctionnalisation de surfaces figure parmi les stratégies actuellement développées pour promouvoir l'intégration de biomatériaux dans un organisme vivant. Cette approche confère des propriétés bioactives en plus de la biocompatibilité aux dispositifs implantaires. La méthode consiste à recouvrir une surface à l'architecture et aux propriétés modulables. En effet, ces revêtements de surfaces peuvent être anti-microbiens, anti-inflammatoires, ou plus généralement, inducteurs de réponses cellulaires guidées.

La méthode de dépôt *couche par couche* permet l'élaboration de films *multicouches de polyélectrolytes* particulièrement adaptés au recouvrement d'implants. Au début des années 1990, les travaux de Decher ont initiés la méthode d'assemblage couche par couche, appliquée à des polymères chargés, ou polyélectrolytes (Decher *et al.* 1992a; Decher *et al.* 1992b; Decher 1997). Depuis une dizaine d'années, ces assemblages supramoléculaires suscitent un grand intérêt dans des domaines aussi variés que les traitements de surface antireflets pour l'optique, les systèmes de séparation de molécules et de nanofiltration ou encore la bioingénierie implantaire.

Comme le collagène est un constituant majeur du tissu conjonctif, plusieurs équipes ont étudié des systèmes multicouches à base de collagène pour des applications biomédicales (Johansson *et al.* 2005b; Mhanna *et al.* 2011). Cependant, l'association du collagène (COL) avec l'alginate (ALG) pour la fabrication de revêtements multicouches n'avait jamais été proposée. Ce système, totalement naturel, est constitué d'une part de collagène (type I), protéine fibrillaire responsable des propriétés mécaniques des tissus, et d'autre part, d'alginate, polysaccharide issu des algues, déjà utilisé dans de multiples applications biomédicales et agroalimentaires.

Le projet de thèse a consisté à développer de nouveaux revêtements multicouches à base de collagène, entièrement naturels, capables de recouvrir des surfaces et utilisables en conditions physiologiques (biomatériaux implantaires). La construction des films a été suivie

par microbalance à cristal de quartz (milieu liquide) et par ellipsométrie. Nous avons noté que l'épaisseur évolue de manière non-linéaire en fonction du nombre de paires de couches déposées. On atteint ainsi une épaisseur d'environ 300 nm pour 7 paires de couches COL/ALG déposées. La construction des films a également été suivie par spectroscopie infrarouge et potentiel zêta pour vérifier l'alternance des couches de collagène et d'alginate.

Toutefois, les architectures COL/ALG construites à pH 3,8 se dégradent à pH physiologique (pH 7,4). Nous avons donc entrepris de stabiliser les films multicouches par réticulation chimique. Une étude comparative sur la réticulation des films a été menée en utilisant d'une part, le glutaraldéhyde, un réticulant éprouvé mais cytotoxique et la génipine, un réticulant naturel d'origine végétale (*Gardénia Jasminoides*). La modulation du taux de réticulation a permis de définir un taux de réticulation seuil (pour une concentration en génipine de 100 mM), à partir duquel les films conservent leur intégrité à pH 7,4. La même étude a été réalisée avec le glutaraldéhyde. Un taux de réticulation seuil, pour une concentration en glutaraldéhyde de 50 mM, a été déterminé. La topographie des films a été étudiée par microscopie à force atomique (AFM). Les observations par AFM montrent que les revêtements COL/ALG sont de nature fibrillaire. Les images d'AFM montrent aussi que la réticulation chimique des films avec la génipine n'altère en rien la structure fibrillaire.

Des cellules endothéliales humaines issues du cordon ombilical (HUVEC) ont été déposées sur des films COL/ALG (3 paires de couches) pour étudier leur biocompatibilité. L'étude de l'attachement et de la prolifération des cellules HUVEC sur les films COL/ALG révèle d'une part que ces films sont de bons supports pour la culture de cellules HUVEC, d'autre part que les cellules adhèrent et prolifèrent davantage sur des films réticulés avec la génipine plutôt que sur ceux réticulés avec le glutaraldéhyde (Chaubaroux *et al.* 2012). Notons que les revêtements COL/ALG réticulés avec la génipine peuvent être déposés sur des

surfaces aux morphologies variées, ce qui a permis, par exemple, de fonctionnaliser des prothèses constituées de microbilles en titane (Vrana *et al.* 2012).

La fonctionnalisation d'une surface, c'est-à-dire la modification de sa topographie et/ou de ses propriétés physico-chimiques, peut aussi être employée pour l'organisation cellulaire. Cette approche trouve des applications dans l'ingénierie tissulaire. En effet, certains tissus comme les tendons ou le ligament alvéolo-dentaire sont dotés de structures fibrillaires alignées à base de collagène, sur lesquelles les cellules vont s'aligner.

Depuis quelques années, plusieurs techniques telles que l'électrospinning, un champ magnétique ou la nano/micro structuration de surfaces ont été utilisées pour produire des supports fibrillaires et ainsi contrôler l'organisation cellulaire à la surface des revêtements. Néanmoins, il a été décrit que l'électrospinning pouvait endommager les molécules de collagène (Zeugolis *et al.* 2008). Nous nous sommes donc proposés de développer une technique simple, capable d'agir sur l'orientation des fibrilles du revêtement COL/ALG sans dénaturer le collagène.

Pour cela, des films multicouches COL/ALG (15 à 60 paires de couches) ont été déposés sur des supports en poly(diméthylsiloxane) (PDMS) puis déformés mécaniquement, à l'aide d'une platine d'étirement conçue au laboratoire, pour aligner les fibrilles de collagène du revêtement. Nous avons pu vérifier que les fibres de collagène s'alignent selon l'axe d'étirement. L'analyse topographique (AFM et microscopie électronique à balayage (MEB)) des surfaces étirées en fonction des taux d'étirement a démontré la possibilité de moduler l'alignement des fibrilles constitutives du revêtement COL/ALG. Nous avons suivi l'effet de la déformation du substrat (PDMS) sur l'orientation des fibrilles de collagène jusqu'à la désorganisation structurale du film multicouche. Les expériences d'étirement montrent que l'alignement des structures fibrillaires du revêtement COL/ALG augmente avec le taux d'étirement. En d'autres termes plus on étire le substrat en PDMS sur lequel repose le film

multicouche, plus les fibrilles de collagène du revêtement s'alignent parallèlement au sens de la déformation. Cet effet se poursuit jusqu'à un étirement α maximal de 150 % (où $\alpha = l_0 / (l - l_0) \times 100$, avec l_0 , longueur d'origine du substrat, l , longueur du substrat après étirement) où le film COL/ALG se déstructure.

Des fibroblastes murins et humains, ainsi que des astrocytes provenant du rat ont été cultivés sur des films multicouches COL/ALG étirés ou non. La morphologie, l'adhésion et la prolifération des cellules cultivées sur les supports alignés sont remarquablement modifiés par rapport à la morphologie, l'adhésion et la prolifération des cellules cultivées sur des supports non orientés. En effet, les 3 types cellulaires étudiés s'alignent parallèlement à l'axe des fibrilles de collagène du revêtement. Enfin, nous avons réussi à détacher, par pelage, des revêtements COL/ALG réticulés de leur support de construction. Les films multicouches auto-portés ainsi obtenus peuvent être ensuite déposés sur des substrats d'intérêt biologique ou implantaires. Lorsque des fibroblastes sont cultivés sur ces dernières surfaces, on note que l'effet d'alignement des cellules est conservé (Chaubaroux et al. 2013, article en préparation). Cela laisse entrevoir la possibilité d'utiliser des films ou membranes multicouches collagène/alginate alignés ou non pour la fonctionnalisation de biomatériaux.

Listes des publications et communications

Publications :

Articles publiés dans des revues avec comité de lecture :

[1] N. E. Vrana, A. Dupret-Bories, C. Bach, **C. Chaubaroux**, C. Coraux, D. Vautier, F. Boulmedais, Y. Haikel, C. Debry, M. H. Metz-Boutigue, P. Lavalley, *Biotechnol Bioeng* **2012**, *109*, 2134.

[2] **C. Chaubaroux**, E. Vrana, C. Debry, P. Schaaf, B. Senger, J.-C. Voegel, Y. Haikel, C. Ringwald, J. Hemmerlé, P. Lavalley, F. Boulmedais, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2128.

[3] D. Mertz, J. W. Cui, Y. Yan, G. Devlin, **C. Chaubaroux**, A. Dochter, R. Alles, P. Lavalley, J. C. Voegel, A. Blencowe, P. Auffinger, F. Caruso, *Acs Nano* **2012**, *6*, 7584.

[4] Vrana, N. E., Dupret-Bories, A., **Chaubaroux, C.**, Rieger, E., Debry, C., Vautier, D., *et al.* Multi-Scale Modification of Metallic Implants With Pore Gradients, Polyelectrolytes and Their Indirect Monitoring *In vivo*. *J. Vis. Exp.* (77), e50533, doi:10.3791/50533 **2013**.

[5] **C. Chaubaroux**, F. Perrin-Schmitt, B. Senger, L. Vidal, Y. Haïkel, J.-C. Voegel, P. Lavalley, P. Schaaf, F. Boulmedais and J. Hemmerlé, *en préparation*.

Communications :

- Workshop Laboratory of Biosensors and Bioelectronics ETH Zurich (Switzerland), Titisee, Allemagne. «Collagen-based multilayer films cross-linked by a natural agent» (présentation orale)
- Nanophysics for Health, Ecole thématique du CNRS, 5 - 9 November 2012, Mittlewihr, France «Collagen-based multilayer films cross-linked by a natural agent» (poster)
- Evaluation AERES «Collagen-based fibrillar multilayer films cross-linked by genipin» (poster)
- XXI^{ème} congrès annuel de la Société Française de Biologie de la Matrice Extracellulaire, 21-23 Mars 2013 (Strasbourg), «Collagen-based fibrillar multilayer films cross-linked by genipin» (poster)
- E-MRS 2013 Spring meeting, 27-31 Mai 2013 (Strasbourg), symposium U (Design of multi-functional nano-objects for biomedical applications) «Collagen-based multilayer films for biomaterials functionalization» (présentation orale)

Cours magistraux :

Module d'enseignement "technologies des matériaux", enseigné en deuxième et troisième années de faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg.

RESUME. La fonctionnalisation des biomatériaux est une stratégie probante et prometteuse développée pour favoriser l'intégration de biomatériaux dans un organisme vivant. Le dépôt de films multicouches de polyélectrolytes est une méthode de fonctionnalisation de surfaces particulièrement adaptée au recouvrement d'implants. Ces surfaces modifiées pourront ainsi interagir avec leur environnement biologique. Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé un nouveau revêtement, à base de composés naturels, capable de recouvrir plusieurs types de surfaces. De plus, ces revêtements originaux peuvent être utilisés pour orienter certains phénomènes cellulaires.

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons mis au point un nouveau système de films multicouches à base de collagène et d'alginate. La réticulation chimique avec la génipine, un agent naturel d'origine végétale (*Gardenia Jasminoïde*), stabilise ces constructions pour une utilisation en conditions physiologiques. Les études d'adhérence et de prolifération de cellules endothéliales humaines ont montré que ces revêtements à base de constituants naturels sont des supports adéquats en vue d'applications biomédicales. Nous avons ensuite déposé des films collagène/alginate sur des implants en titane précédemment recouvert d'un gel microporeux en poly(acide lactique). Nous avons pu montrer que les films collagène/alginate favorisent la prolifération de cellules épithéliales, ce qui permettrait une meilleure intégration des implants.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons développé une technique permettant d'obtenir des revêtements et des membranes à base de films multicouches collagène/alginate ayant des structures fibrillaires orientées. L'alignement fibrillaire s'obtient par simple étirement des substrats élastiques en poly(diméthyl siloxane) (PDMS) sur lesquels sont déposés les revêtements collagène/alginate. La déformation longitudinale du substrat induit un alignement préférentiel des fibrilles de collagène du revêtement. L'étude de l'influence du taux d'étirement sur l'alignement des fibres a montré qu'il était possible de moduler cet alignement. Enfin, nous avons observé que le comportement de différents types cellulaires (fibroblastes et astrocytes) est modifié par l'alignement fibrillaire. On note que les cellules s'alignent dans la même direction que les fibrilles de collagène. A l'évidence, l'organisation fibrillaire du revêtement conditionne la géométrie de l'étalement cellulaire. Les cellules s'allongent lorsque les fibrilles sont alignées. De plus, il apparaît que la direction des divisions cellulaires est guidée par la direction de l'alignement des fibrilles de collagène dans le revêtement étiré. Cela signifie que les cellules sont guidées par les fibrilles de collagène alignées.

ABSTRACT. Biomaterial functionalization is a promising strategy developed to favor material implantation in a living organism. The deposition of polyelectrolyte multilayer films is a useful functionalization technique to coat implants. These modified surfaces may then interact with their biological environment. In this work, we developed new collagen-based coatings and membranes, able to cover several kinds of substrates. Moreover, these original coatings can either promote cell proliferation or guide cell alignment.

In the first part of our work, we developed a new polyelectrolyte multilayer assembly made of collagen and alginate. Chemical cross-linking with a natural agent, genipin (extracted from *Gardenia Jasminoïde*), renders the films stable in physiological conditions. Human endothelial cells adhere and proliferate well on these collagen-based coatings. Then, we functionalized macroporous poly(lactic acid) gels-coated titanium implants with collagen/alginate multilayer films to favor epithelial cell proliferation. We showed that cells adhere and proliferate better on collagen/alginate-coated implants. This shows the potential suitability of collagen/alginate coatings for a better integration of biomaterials.

In the second part of our work we developed a new technique in order to align the fibrillar structure of collagen/alginate multilayer films and membranes. The principle is simple and versatile. It consists in stretching collagen/alginate multilayer film coated on PDMS substrates. This longitudinal deformation leads to the alignment of the collagen fibrils in the coating. Cell adhesion and proliferation (fibroblasts, astrocytes) is modified due to fibrils alignment. We showed that cells align along the direction of the collagen fibrils. Obviously, the fibrillar organization of the coatings influences cell adhesion geometry. Cells stretch out along aligned fibrils. Furthermore, it appears that cell divisions direction is guided by the direction of the collagen fibrils alignment in the stretched coatings.