



HAL
open science

Revêtements surfaciques à base de polymères et de composants naturels : applications à la mise au point de surfaces mécano-sensibles et de substrats cellulaires nourriciers

Julien Barthes

► **To cite this version:**

Julien Barthes. Revêtements surfaciques à base de polymères et de composants naturels : applications à la mise au point de surfaces mécano-sensibles et de substrats cellulaires nourriciers. Autre. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAE018 . tel-01205155

HAL Id: tel-01205155

<https://theses.hal.science/tel-01205155>

Submitted on 25 Sep 2015

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 / Biologie

Soutenue par **Julien BARTHES**

Le 24 Septembre 2014

**Revêtements surfaciques à base de polymères et de composants naturels :
applications à la mise au point de surfaces mécano-sensibles et de substrats
cellulaires nourriciers**

JURY

Directeur de thèse : Philippe Lavalley, Directeur de Recherche, INSERM
Co-directeur de thèse : Bernard Senger, Directeur de Recherche, INSERM
Rapporteurs : Karine Glinel, Professeur, Université Catholique de Louvain
Emmanuel Pauthé, Professeur, Université de Cergy Pontoise
Examineurs : Halima Kerdjoudj, Maître de Conférences, Université de Reims
Vincent Roucoules, Professeur, Université de Haute-Alsace

Ecole doctorale de Physique et Chimie Physique

« L'imagination est plus importante que le savoir »

Albert Einstein

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord mes co-directeurs de thèse, Philippe Laval, Directeur de Recherche à l'INSERM (U1121, Strasbourg) et Bernard Senger, Directeur de recherche à l'INSERM (U1121, Strasbourg) pour m'avoir encadré dans d'excellentes conditions tout au long de mon doctorat. Je les remercie pour la formation scientifique et technique qu'ils m'ont apportée, le temps qu'ils m'ont consacré et les précieux conseils qu'ils ont pu me prodiguer. Je suis très heureux de les avoir eus comme directeurs de thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Jean-Claude Voegel, Directeur de Recherche à l'INSERM (U1121, Strasbourg), et à Pierre Schaaf, Professeur à l'INSERM (U1121, Strasbourg), pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire sous leur direction.

Je suis très sensible à l'honneur que me font les membres du jury en acceptant de juger mon travail. Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Madame Karine Glinel, Professeur à l'Université Catholique de Louvain, Madame Halima Kerdjoudj, Maître de conférences à l'Université Reims Champagne Ardennes, Monsieur Emmanuel Pauthe, Professeur à l'Université de Cergy Pontoise et Monsieur Vincent Roucoules, Professeur à l'Université de Haute Alsace. Je leur adresse mes sincères remerciements.

Je tiens également à remercier tout l'équipe du laboratoire « Biomatériaux et inflammation en site osseux » de l'Université de Reims Champagne Ardenne et tout particulièrement Halima Kerdjoudj et Saad Mechiche Alimi pour l'accueil qu'ils m'ont réservé quand je suis venu à Reims. Aussi j'aimerais remercier Grégory Francius et Jalal Bacharouche du LCPME à Nancy pour les analyses d'AFM nanoindentation ; Emmanuelle Leize, Yannis François et Rabah Gahoual du LSNIS à Strasbourg pour les analyses de spectrométrie de masse ; Marie-Hélène Metz-Boutigue de l'INSERM U1121 pour les analyses HPLC ; Joseph Hemmerlé de l'INSERM U1121 pour les analyse MEB et Jérôme Mutterer pour ses précieux conseils en microscopie confocale.

Je remercie également Karim Benmlih pour la conception des dispositifs d'étirements et de libération de molécules.

Je voudrais adresser un grand merci à Damien Mertz, Chargé de Recherche au CNRS (IPCMS, Strasbourg) et Engin Nihal Vrana, Post-Doctorant à l'INSERM (U1121, Strasbourg). Vous m'avez accompagné tout au long de ma thèse, vous avez toujours été la

pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments et vous n'avez jamais cessé de m'épauler. Je ne trouverai jamais les mots pour vous remercier suffisamment.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement Hayriye Ozcelik avec qui j'ai beaucoup collaboré au cours de mon doctorat. Merci pour ta joie de vivre et pour toute l'aide que tu as pu m'apporter.

Je remercie amicalement Dominique Vautier et Vincent Ball pour nos discussions toujours intéressantes et Fabienne Perrin-Schmitt pour ses précieux conseils en biologie.

J'en arrive à mes collègues de bureau avec qui j'ai passé trois ans merveilleux : Florent, Christine, Caroline, Annie, Jean-Baptiste, Camille, Mathilde, Eric, Marta, Sait, Agnès et Florence.

Je remercie tout particulièrement Christiane Bouthier pour sa gentillesse et pour toute l'aide qu'elle peut nous apporter tous les jours pour permettre le bon fonctionnement du laboratoire.

Une mention spéciale à tous les résidents du « Bureau du 7^{ème} ! » et tous ceux qui y passent très régulièrement : Morgane, Christophe, Géraldine, Armelle, Christian, Helena, Florian et sans oublier la mascotte « Schwarzy ». Merci pour toutes les discussions et tous les fous rires que nous avons pu partager dans ce bureau si spécial tout au long de ces trois années

J'adresse un grand merci à mes parents, mes grands parents, mes amis strasbourgeois (Antoine, Rabah, Pierre, Jeff, Alex, Julie, Marine Céline, Lara) qui n'ont cessé de me soutenir tout au long de ma thèse et avec qui j'ai tellement partagé de bons moments.

Enfin je terminai en remerciant la personne la plus importante, ma compagne Flavie, celle qui partage mon quotidien depuis presque 9 ans, qui m'a toujours soutenu et qui m'apporte tant de belles choses.

SOMMAIRE

Abréviations	8
Introduction générale.....	12
1. Revue bibliographique.....	15
1.1. Films multicouches de polyélectrolytes	16
1.1.1. Généralités sur les films multicouches de polyélectrolytes	16
1.1.2. Films multicouches répondant à différents stimuli.....	21
1.1.3. Films multicouches sous étirement mécanique.....	25
1.1.4. Films multicouches de polyélectrolytes dégradables par voie enzymatique pour la libération de molécules	32
1.2. Microenvironnement cellulaire.....	35
1.2.1. Définition	35
1.2.2. La matrice extracellulaire (MEC)	35
1.2.3. Les facteurs de croissance	41
1.3. Biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire	48
1.4. Contrôle du microenvironnement cellulaire en ingénierie tissulaire	56
1.4.1. Contrôle du microenvironnement cellulaire par un système de libération de molécules bioactives.....	56
1.4.2. Contrôle du microenvironnement par changement de la rigidité du substrat.....	65
1.5. Films à base de gélatine	70
2. Matériels et Méthodes.....	85
2.1. Matériels.....	86
2.1.1. Matériels pour la construction et l'étirement des films multicouches de polyélectrolytes	86
2.1.2. Matériels pour la construction, la réticulation, la modification biochimique et biophysique des films de gélatine	93
2.2. Analyses biologiques	99
2.2.1. Culture cellulaire	99
2.2.2. Ensemencement des cellules sur les films de gélatine	100
2.2.3. Activité métabolique des cellules.....	102
2.2.4. Viabilité cellulaire	102
2.2.5. Fixation/perméabilisation	103
2.2.6. Marquages fluorescents.....	104

2.2.7.	Activité antimicrobienne	105
2.2.8.	Quantification de la dégradation des films de gélatine	106
2.3.	Méthodes d'analyse et caractérisation des films multicouches, des films de gélatine et des cellules.....	107
2.3.1.	Microscopie confocale.....	107
2.3.2.	Fluorimètre et spectrofluorimètre	111
2.3.3.	Microscopie à épi-fluorescence.....	114
2.3.4.	Microbalance à cristal de quartz	115
2.3.5.	Microscopie à force atomique.....	119
2.3.6.	Microscopie électronique à balayage.....	122
2.3.7.	Couplage Spectrométrie de masse/ Electrophorèse capillaire	123
3.	Elaboration de surfaces mécano-sensibles à base de films multicouches de polyélectrolytes pour libérer des molécules bioactives	125
3.1.	Contexte et résumé.....	126
3.2.	Article	129
4.	Contrôle physique et biochimique du microenvironnement cellulaire par un film nourricier à base de gélatine	155
4.1.	Contexte et résumé	156
4.2.	Article	159
4.3.	Résultats complémentaires.....	202
4.3.1.	Film nourricier à base de gélatine pour les cellules souches de la gelée de Wharton.....	202
4.3.2.	Application de la stratégie de substrat nourricier pour des cellules dans un environnement 3D	204
	Conclusion et perspectives.....	210
	Références.....	214
	Publications scientifiques.....	233
	Communications.....	234
	Enseignements	235
	Résumé.....	236

Abréviations

Polymères

Naf : Nafion

HA : Acide hyaluronique

PA : Polyacrylamide

PAA : Poly(acide acrylique)

PAH : Chlorhydrate de poly(allylamine)

PCL : Poly(caprolactone)

PDADMA : Chlorure de poly(diallyldiméthylammonium)

PDL : Poly(D-lysine)

PDMS : Poly(diméthylsiloxane)

PEI : Poly(éthylène imine)

PEG : Polyéthylène glycol

PGA : Poly(acide L-glutamique)

PLA : Poly(lactique acide)

PLGA : Poly(acide lactique-co-glycolique)

PLL : Poly(L-lysine)

PMMA : Poly(méthacrylate de méthyle)

PNIPAM : Poly(N-isopropylacrylamide)

PSS : Poly (4-styrène sulfonate de sodium)

Réactifs et solvants

CAP : Acétophtalate de cellulose

Dex-GMA : Dextrane méthacrylate de glycidyle

DMA : 2-(diméthylamino) éthyl méthylacrylate)

EDC : Hydrochlorure de N,N-(3-diméthylaminopropyl)-N-carbodiimide

FBS : Fœtal bovine serum

FITC : Fluorescéine isothiocyanate

GTA : Glutaraldéhyde

HCl : Acide chlorhydrique

NaCl : Chlorure de sodium

NHS : N-hydroxysulfosuccinimide
PBS : Phosphate buffer saline
PFA : Paraformaldéhyde
Rho : Rhodamine
Tris : Tris (hydroxyméthyl) aminométhane

Cellules, bactéries, milieux de culture et notations utilisées pour les expériences cellulaires

ATCC : American Type Culture Collection
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
EMEM : Eagles Minimum Essential Medium
HUVEC : Human umbilical vein endothelial cell
HGF : Human gingival fibroblast
PtK2 : Potorous Tridactylis Kidney 2
ATCC : American Type Culture Collection
NM : Normal medium
S.aureus : Staphylococcus aureus
SM : Starvation medium

Molécules biologiques et protéines

ADN : Acide désoxyribonucléique
ALP : Phosphatase alcaline
BMP : Bone morphogenic protein
BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine
CS : Chondroïtine-sulfate
EGF : Epidermal growth factors factor
ECM : Extracellular matrix
FDP : Fluorescéine diphosphate
FGF : Fibroblast growth factor
GAG : Glycosaminoglycane
HGF : Hepatocyte growth factor
HS : Héparane-sulfate
IGF : Insulin growth factor

KS : Kérotane-sulfate
LDH : Lactase déshydrogénase
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MEC : Matrice extracellulaire
NGF : Nerve growth factor
PC : Phosphorylcholine
PDGF : Platelet derived growth factor
PECAM : Platelet endothelial cell adhesion molecule
PG : Protéoglycane
PS : Phosphatidylserine
RGD : séquence tripeptide arginine-glycine-acide aspartique
RHAMM : Receptor for hyaluronan-mediated cell motility
rhBMP-2 : Recombinant human bone morphogenic protein 2
RTK : Récepteur à activité tyrosine kinase
SVF : sérum veau fœtal
TGA : Transglutaminase
TRY : Trypsine
VEGF : Vascular endothelial growth factor

Appareils utilisés et techniques

AFM : Atomic force microscopy
CE : Electrophorèse capillaire
CLSM : Microscopie confocale à balayage laser
LBL : Layer-by-Layer (couche par couche)
HBO : Lampe à vapeur de mercure
HPLC: High performance liquid chromatography
MS : Spectrométrie de masse
MEB : microscopie électronique à balayage
SEM : Scanning electron microscopy
QCM : microbalance à cristal de quartz

Notations

E : module de Young

LCST : lower critical solution temperature

λ_{em} : longueur d'onde émission

λ_{ex} : longueur d'onde excitation

Mw : masse moléculaire

m/v : concentration en masse par volume de solvant

OD : densité optique

pI : point isoélectrique

rpm : rotations par minute

UV : ultraviolet

v/v : concentration en volume de produit par volume de solvant

Introduction générale

L'élaboration de revêtements de surface à partir de polymères ou de composants naturels est un thème d'étude majeur en raison des applications potentielles dans le domaine du biomédical et plus particulièrement dans les stratégies d'ingénierie tissulaire. En effet les films formés sont utilisés pour fonctionnaliser des matériaux comme des implants dans l'optique de leur conférer des propriétés spécifiques pour permettre une meilleure intégration du matériau dans l'organisme et pour favoriser par exemple des processus cellulaires comme la prolifération, l'adhésion ou la différenciation. Ces processus cellulaires sont indispensables notamment pour les phénomènes de cicatrisation et de régénération tissulaire. Les revêtements mis en place peuvent agir sur le microenvironnement cellulaire de différentes manières. Tout d'abord, ils peuvent moduler les propriétés biochimiques du microenvironnement cellulaire en délivrant des molécules bioactives comme des agents thérapeutiques, des facteurs de croissances ou des hormones. Ensuite ces revêtements peuvent également agir d'un point de vue biophysique par la présence de motifs peptidiques spécifiques dans leur structure comme les groupements RGD (arginine-glycine-acide aspartique) qui favorisent l'adhésion et l'étalement cellulaire et impliquent une organisation du cytosquelette particulière. Dans l'optique de se mimer le plus possible les microenvironnements rencontrés *in vivo* (démarche de "biomimétisme"), les études se dirigent de plus en plus vers l'utilisation de composants naturels de la matrice extracellulaire pour réaliser des revêtements de surface applicables aux biomatériaux.

Depuis les années 1990, une nouvelle méthode d'élaboration de structure supramoléculaire a été élaborée : le dépôt couche par couche de films de polyélectrolytes. Cette technique est basée sur l'adsorption alternée de polycations et polyanions sur des surfaces solides. La cohésion de ces structures est assurée principalement par les interactions électrostatiques s'opérant entre ces polyélectrolytes. Ces assemblages supramoléculaires suscitent un intérêt particulier dans le domaine biomédical car de nombreux agents biologiques, tels que des protéines ou des médicaments, peuvent y être incorporés. La libération contrôlée de ces agents biologiques par l'action de stimuli extérieurs constitue un enjeu majeur pour ces types de matériaux. Ainsi, plusieurs stimuli ont déjà été utilisés dans cette optique, notamment l'application d'un potentiel électrique, la modification du pH, ou

encore le changement de température. En revanche, l'application d'une contrainte mécanique pour entraîner la libération de biomolécules initialement localisées dans le film reste un concept peu étudié bien que les contraintes mécaniques soient courantes dans l'organisme, notamment lors des processus de vasodilatation et vasoconstriction ou encore lors de la contraction musculaire.

L'Unité Inserm 1121 « Biomatériaux et Bioingénierie » s'intéresse depuis quelques années aux stimuli mécaniques appliqués sur des matériaux fonctionnalisés afin déclencher des processus catalytiques, des réactions chimiques ou encore pour engendrer des modifications conformationnelles de protéines. Dans le cadre de cette thématique, la première partie de mon doctorat (premier projet) s'est articulée autour de l'élaboration de surfaces mécano-sensibles à partir de films multicouches de polyélectrolytes pour libérer des molécules bioactives. Cette stratégie a été utilisée pour la libération d'un agent anticancéreux, le paclitaxel.

Cependant, ces films multicouches de polyélectrolytes ne sont pas toujours les meilleurs substrats pour permettre une croissance cellulaire optimale et donc dans le but de développer un revêtement de surface favorisant les processus cellulaires, nous avons décidé d'utiliser la gélatine qui correspond à du collagène dénaturé, lui-même un des composants majeurs de la matrice extracellulaire. La deuxième partie de mon doctorat (second projet) s'est donc articulée autour de l'élaboration d'un substrat cellulaire nourricier « gel-feeder », mimant la matrice extracellulaire. Les propriétés biochimiques et biophysiques du film de gélatine ont pu être modulées respectivement par le chargement et la libération de molécules bioactives nécessaires au bon développement des cellules et par l'ajout de particules pour moduler la rigidité du film. Ce substrat nourricier constitué de divers éléments permet le contrôle précis du microenvironnement cellulaire.

Le chapitre 1 qui est divisé en 5 parties, donne un état de l'art concernant tous les sujets scientifiques abordés lors de cette thèse. La première partie est consacrée à l'étude des films multicouches de polyélectrolytes. Nous parlerons dans cette partie des différents stimuli externes auxquelles les films multicouches peuvent répondre, de leurs propriétés mécaniques et de leurs utilisations pour libérer des molécules bioactives (premier projet). Les parties 2, 3 et 4 présentent le contexte général du second projet et soulignent le besoin d'utiliser des biomatériaux pour contrôler de manière plus précise le microenvironnement cellulaire. La partie 5 s'attarde plus particulièrement sur les biomatériaux à base de gélatine.

Le chapitre 2 présente une description détaillée de tous les produits, techniques et instruments utilisés pour réaliser nos expériences.

Le chapitre 3 correspond au premier chapitre décrivant les résultats expérimentaux et concerne la libération de molécules bioactives sous étirement mécanique à partir de films multicouches de polyélectrolytes. Ce chapitre se compose de deux parties. La première partie décrit le contexte de l'étude, résume l'article qui a découlé de ses travaux et présente quelques perspectives. La seconde partie du chapitre est constituée de cet article.

Le chapitre 4 correspond au second chapitre des résultats expérimentaux concernant le projet sur l'élaboration d'un substrat nourricier cellulaire avec un film de gélatine dont les propriétés biochimiques et biophysiques sont modulables afin d'établir le contrôle précis du microenvironnement cellulaire. Ce chapitre se compose de trois parties. La première partie explique le contexte de l'étude et résume l'article en préparation qui a découlé de ses travaux. La seconde partie du chapitre est constituée de cet article et la troisième partie résume quelques perspectives d'études ainsi que des résultats complémentaires.

La dernière partie est une conclusion générale à ses travaux de thèse suivie de perspectives auxquelles ce travail peut donner lieu.

1. Revue bibliographique

1.1. Films multicouches de polyélectrolytes

1.1.1. Généralités sur les films multicouches de polyélectrolytes

La préparation de films multicouches par le biais d'interactions électrostatiques entre des particules colloïdales cationiques et anioniques avait déjà été mise en évidence par Iler (Iler 1966) mais les véritables avancées dans ce domaine ne sont apparues qu'au début des années 1990 avec les travaux de G. Decher (Decher *et al.* 1992). Ces travaux se sont axés autour de l'assemblage couche par couche (LBL « Layer by Layer ») de polyélectrolytes, c'est à dire des polymères chargés négativement (polyanions) et positivement (polycations) (Decher 1997).

1.1.1.1. Principe de construction : méthode LBL

La préparation des films multicouches de polyélectrolytes est basée essentiellement sur les interactions électrostatiques entre les polyanions et les polycations. Ces polyélectrolytes sont adsorbés successivement sur un support. Cette méthode est décrite sur la figure 1.

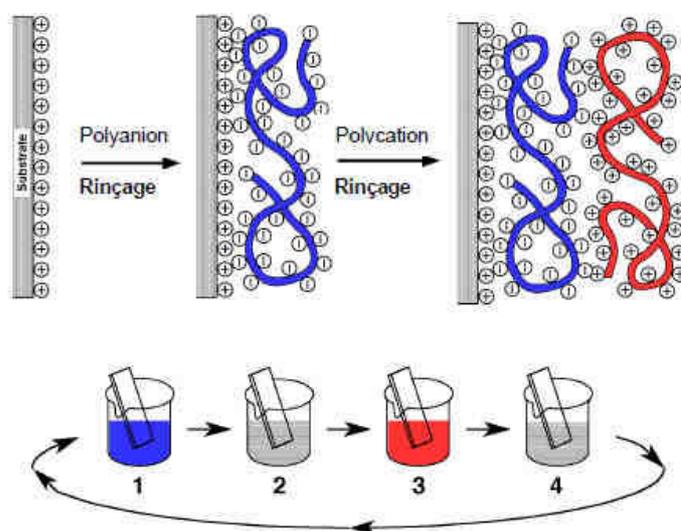


Figure 1. Principe de construction des films multicouches par la méthode LBL (Decher 1997).

Sur l'exemple présenté figure 1, le substrat est chargé positivement, la première couche adsorbée sera donc une couche de polyanions. Les polyanions vont s'adsorber à la surface du substrat *via* des interactions électrostatiques. Aussi, par un phénomène de surcompensation des charges négatives, la surface va être chargée négativement (Caruso *et al.* 1998; Ladam *et*

al. 1999). Les polyanions libres, qui n'ont pas été absorbés, seront éliminés par les étapes de rinçage. Il en sera de même lors de l'adsorption des polycations sur la surface chargée négativement, celle-ci sera alors chargée positivement par le phénomène de surcompensation des charges positives. Cette méthode de construction des films couche par couche par trempage est appelée « dip-coating ».

1.1.1.2. Nature du substrat

Les supports les plus couramment utilisés pour la construction des films multicouches sont des surfaces planes ou des particules sphériques colloïdales, de nature minérale (lame de verre (Decher 1997)), métallique (titane fritté (Vautier *et al.* 2003)) ou organique (polyéthylène (Green et Sadrameli 2004)). Pour notre étude nous utiliserons un support élastomérique tel que le poly(diméthylsiloxane) (PDMS), aussi appelé silicone, car il permet l'application d'une contrainte mécanique d'étirement.

1.1.1.3. Modes de croissance des films multicouches

Des travaux ont montré qu'il existe deux types de croissance pour les films multicouches: la croissance linéaire et la croissance exponentielle (figure 2).

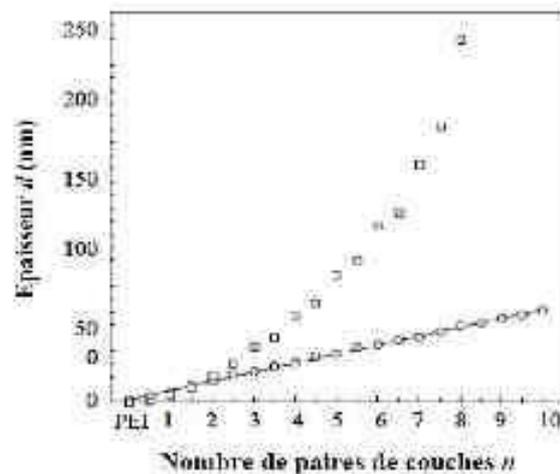


Figure 2. Evolution de l'épaisseur d'un film PEI/(PGA/PLL)_n (□) et d'un film PEI/(PSS/PAH)_n (□) en fonction du nombre de paires de couches, n , déposées, suivie par spectroscopie optique par guide d'onde (Lavalle *et al.* 2002).

La croissance linéaire concerne les films où l'épaisseur augmente linéairement en fonction du nombre de couches déposées. La structure obtenue est relativement stratifiée (Lvov *et al.* 1994). Ce mode de croissance a été mis en évidence pour les couples de polyélectrolytes PDADMA/PSS : poly(diallyldiméthylammonium)/ poly(4-styrène sulfonate de sodium) (Dubas et Schlenoff 1999) et PAH/PAA : poly(allylamine)/ poly(acide acrylique) (Shiratori et Rubner 2000). Les films PAH/PSS sont également des films à croissance linéaire et ils seront utilisés comme strate barrière au cours de nos travaux car leur structure stratifiée et dense constitue une excellente barrière à la diffusion de molécules.

La croissance exponentielle, quant à elle, concerne les films où l'épaisseur augmente de façon exponentielle en fonction du nombre de couches déposées. L'épaisseur de ces films peut atteindre, Après le dépôt d'une vingtaine de paires de couches, les films de multicouches à croissance exponentielle peuvent atteindre quelques micromètres alors que pour les films à croissance linéaire des épaisseurs de quelques centaines de nanomètres sont atteintes. Certains travaux ont expliqué ce phénomène par une augmentation de la rugosité de surface au fur et à mesure de la construction du film (Ruths *et al.* 2000) ce qui aurait pour conséquence d'augmenter la surface d'adsorption et donc la quantité de polyélectrolyte adsorbée. D'autres études ont décrit le mode de croissance exponentielle pour les couples (PLL/PGA) : poly(L-lysine)/ poly(acide glutamique) et (PLL/HA) : poly(L-lysine)/ acide hyaluronique (Picart *et al.* 2001; Lavalley *et al.* 2002; Picart *et al.* 2002). Les travaux de Lavalley *et al.* expliquent le phénomène de croissance exponentielle par la diffusion d'au moins un des polyélectrolytes dans la section du film (Lavalley *et al.* 2003). En effet dans le cas des films PLL/HA, les chaînes de PLL se complexent avec les chaînes de polyanions (HA) formant ainsi une nouvelle couche mais elles diffusent également à l'intérieur du film qui forme ainsi un réservoir de polycations libres. Lors de l'étape de rinçage, seulement une partie de ces polycations libres migrent vers l'extérieur du film. La capacité du film à stocker une partie des chaînes de PLL est due à l'excès de charges positives à la surface du film ce qui crée une barrière de potentiel empêchant la diffusion des polycations hors du film. Lorsque la solution de polyanions est ajoutée, ceux-ci se complexent avec l'excès de charges positives en surface et changent le signe de la barrière de potentiel ce qui permet aux polycations libres de diffuser vers l'extérieur et former une nouvelle couche (figure 3). Ces films (PLL/HA) très hydratés seront utilisés comme réservoir des molécules bioactives lors du travail décrit dans ce manuscrit.

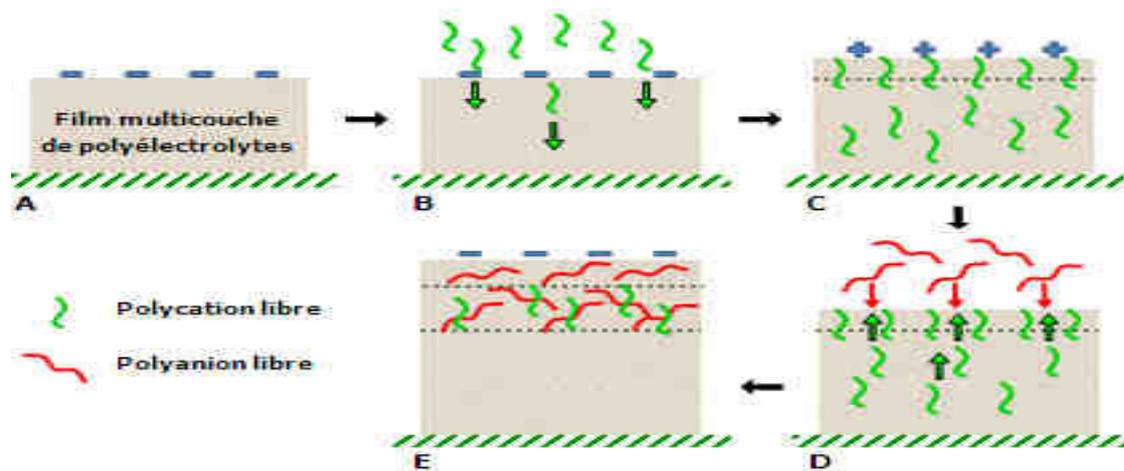


Figure 3. Mécanisme de construction d'un film multicouche de poly (L-lysine) (PLL) et d'acide hyaluronique (HA) qui suit un régime de croissance exponentielle (Lavalle *et al.* 2003).

1.1.1.4. Films multicouches réservoir(s)/barrière(s)

L'assemblage par alternance de polyélectrolytes à croissance linéaire et exponentielle a permis de créer des systèmes dits "multi-compartiments" (barrières + réservoirs) (Garza *et al.* 2004). La barrière est assemblée avec les polyélectrolytes à croissance linéaire de manière à empêcher la diffusion de molécules hors du réservoir ou entre deux réservoirs.

La strate réservoir a pour intérêt le stockage de molécules biologiques telles que des protéines, des agents thérapeutiques ou de l'ADN. Ces facteurs biologiques peuvent être soit insérés dans la multicouche durant la séquence de construction, soit greffés de manière covalente à une chaîne de polyélectrolyte. La méthode la plus simple consiste à insérer la molécule biologique à un moment précis de l'élaboration du film. Pour cela, il est nécessaire d'avoir des interactions favorables entre la molécule et les polyélectrolytes. Ces interactions peuvent être d'origines très variées (forces de van der Waals, liaisons hydrogène, forces électrostatiques ou interactions hydrophobes). Il est cependant important de s'assurer que ces interactions n'induisent pas la dénaturation de ces molécules biologiques dans le film.

Des films PLL/HA ont été utilisés comme réservoirs de molécules anticancéreuses, par exemple le paclitaxel (Taxol) (Vodouhê *et al.* 2006) (figure 4). Cette molécule est utilisée en chimiothérapie pour son activité antiproliférative, en particulier dans le traitement du cancer des ovaires et du sein. Les auteurs de ce travail ont montré que la dose de Taxol insérée dans

le film était complètement modulable et que l'activité de la molécule restait stable après son insertion. Cet exemple démontre l'utilité de ce type de film à des fins thérapeutiques.

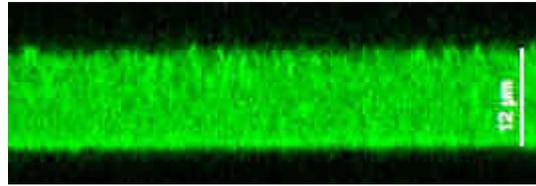


Figure 4. Observation par microscopie confocale (image dans le plan xz) d'un film (PLL/HA)₆₀ sur lequel le Taxol^{FITC} (Taxol marqué avec une sonde fluorescente verte, la fluorescéine isothiocyanate) a été incubé à 200 μg/mL (Vodouhê *et al.* 2006).

Crouzier *et al.* en 2009 ont étudié le chargement d'une protéine rhBMP-2 (Recombinant Human Bone Morphogenic Protein 2) dans un film PLL/HA réticulé (Crouzier *et al.* 2009). Cette protéine joue un rôle important dans le développement des os et des cartilages. Elle permet la différenciation des myoblastes en ostéoblastes. En utilisant le film PLL/HA comme réservoir pour cette protéine, les auteurs ont montré que ce type de film pouvait s'avérer utile dans le domaine de la médecine régénérative. En effet, en analysant la figure 5, on peut constater qu'on augmente considérablement la quantité de protéine chargée en passant d'une simple adsorption sur la surface de plastique à celle réalisée dans un film PLL/HA. De plus on peut noter que la quantité de protéine chargée augmente avec le nombre de bicouches constituant le film PLL/HA.

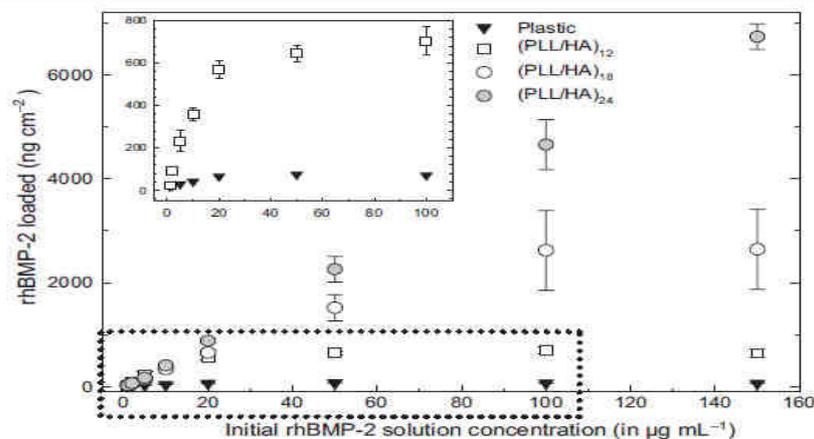


Figure 5. Quantité de protéine rhBMP-2 adsorbée dans les films PLL/HA d'épaisseurs différentes (n = 12, 18, 24) en fonction de la concentration initiale en solution de rhBMP-2. La surface de plastique est utilisée comme surface contrôle (Crouzier *et al.* 2009).

1.1.2. Films multicouches répondant à différents stimuli

Dans cette partie, nous donnerons un bref aperçu des différents stimuli qui peuvent être appliqués sur les films multicouches de polyélectrolytes pour induire des changements de leurs propriétés physico-chimiques. Nous nous focaliserons plus particulièrement sur trois stimuli externes différents : le pH, la température et la lumière.

1.1.2.1. Films répondant au pH

Les propriétés physico-chimiques des films multicouches de polyélectrolytes peuvent tout d'abord être modulées par des changements de pH. En effet, les polyélectrolytes faibles comme le PAH, ont une densité de charge qui va être variable en fonction du pH. Ces changements dans la densité de charge des chaînes du polyélectrolyte faible vont affecter les interactions électrostatiques entre les deux polyélectrolytes composant le film et cela va provoquer des changements dans la morphologie ou la perméabilité du film. Ces changements entraînent différents effets macroscopiques comme la dissolution du film, la formation de pores dans la structure du film ou encore le gonflement du film. En prenant l'exemple des films PAH/PSS, l'augmentation du pH au-dessus du pKa du PAH (10.8) va provoquer une diminution de la densité de ses charges des chaînes de PAH. Par contre, le PSS étant un polyélectrolyte fort, sa densité de charge ne dépend pas du pH. En augmentant le pH au dessus de 10.8, on obtient un excès de charges négatives dans le film dû aux chaînes de PSS ce qui favorise une répulsion électrostatique entre les chaînes de PSS et engendre le gonflement du film. En augmentant le pH suffisamment fortement, on peut même assister à la dissolution complète du film (Sukhishvili 2005; Glinel *et al.* 2007).

Les films ou les capsules pH-répondant réalisés à partir de multicouches de polyélectrolytes peuvent trouver des applications pour le chargement ou la libération de molécules. Des travaux ont été menés par Tong et al sur les changements de perméabilité de capsules (PEI/PAA)₅ en fonction du pH pour charger le dextrane^{FITC} (Tong *et al.* 2006). En effet à un pH inférieur à 4, les capsules permettent le chargement du dextrane^{FITC} à l'intérieur de la capsule et à pH supérieur à 9, ces mêmes capsules deviennent imperméables et le dextrane^{FITC} devient alors confiné dans la capsule (figure 6). Cet exemple illustre la possibilité de créer des assemblages macromoléculaires répondant au pH ("pH-responsif") pour encapsuler des molécules bioactives.

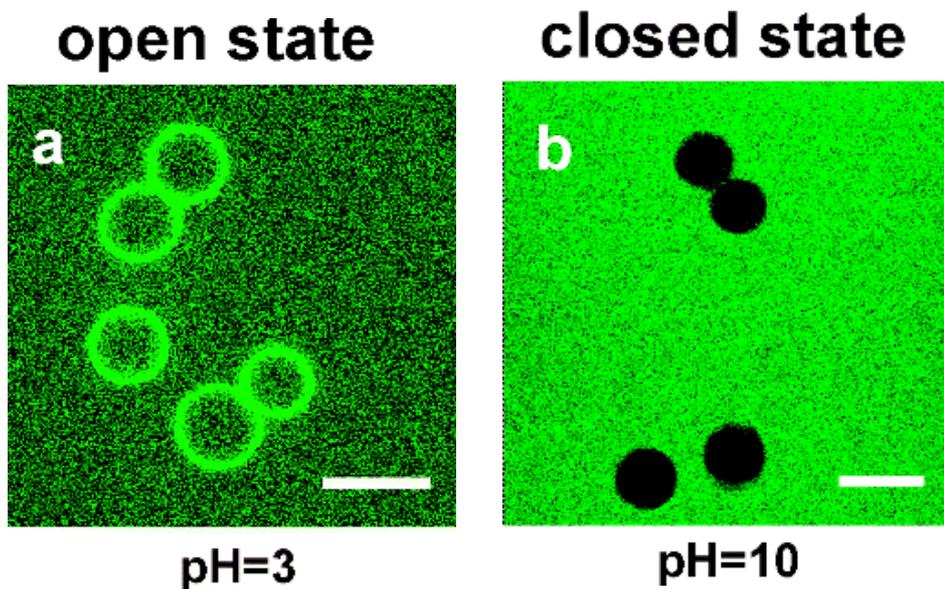


Figure 6. Changement de perméabilité pour le dextrane^{FITC} des capsules (PEI/PAA)₅ en fonction du pH. Dans cet exemple, le dextrane^{FITC} en solution est mis au contact des capsules à différentes valeurs de pH ; a) pH = 3 (open state) et b) pH = 10. La barre d'échelle représente 10 μm (Tong *et al.* 2006).

1.1.2.2. Films répondant à la température

1.2.2 Films répondant à la température

Le polymère le plus connu et le plus utilisé pour son caractère thermosensible est le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM). Ce polymère est soluble dans l'eau à température ambiante en formant des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau (hydrophile). Au dessus d'une température critique (lower critical solution temperature, LCST), le polymère devient insoluble dans l'eau (hydrophobe) et les molécules d'eau sont expulsées de sa structure (Heskins et Guillet 1968). La LCST du PNIPAM (32°C) est proche des conditions physiologiques (37°C) ce qui en fait un bon candidat pour des applications biomédicales où des agents thérapeutiques pourraient être chargés dans des gels de PNIPAM à température ambiante et libérés dans l'organisme par la suite à 37°C (Guan et Zhang 2011).

Ce polymère a été utilisé pour fabriquer des films multicouches de polyélectrolytes thermosensibles. Comme le PNIPAM est neutre, il faut le combiner avec des polyélectrolytes pour permettre la fabrication du film multicouche. Pour cela, des copolymères (Jaber et

Schlenoff 2005) chargés contenant PNIPAM ont été synthétisés tels que les copolymères PSS-co-PNIPAM ou PAH-co-PNIPAM (figure 7).



Figure 7. Copolymères chargés à base de PNIPAM (Jaber et Schlenoff 2005).

1.1.2.3. Films répondant à la lumière

Des réactions photochimiques peuvent être utilisées sur les multicouches de polyélectrolytes pour influencer sur la perméabilité de capsules creuses et notamment permettre l'encapsulation d'agents bioactifs. En effet, des études ont été menées sur des capsules creuses faites à partir de PSS et de diazorésine (Zhu et McShane 2005). Les auteurs ont montré que ces capsules étaient perméables et permettaient l'encapsulation d'une enzyme avant irradiation UV. L'irradiation sous UV déclenche une réticulation photochimique créant des liaisons covalentes entre les chaînes de PSS et celles de diazorésine constituant les capsules. Cette réticulation photochimique rend les capsules imperméables et emprisonne l'enzyme à l'intérieur de ces mêmes capsules.

Les multicouches de polyélectrolytes répondant à la lumière trouvent également des applications pour la libération d'agents thérapeutiques. En effet, des nanoparticules métalliques (or, argent) absorbent fortement l'énergie du rayonnement IR et la restituent sous forme de chaleur en provoquant un échauffement local. Dans le cas où ces particules sont incluses dans la structure des films ou capsules fabriquées à partir de multicouches de polyélectrolytes, l'échauffement local provoqué par le rayonnement laser va engendrer une dégradation du film et permettre la libération de l'agent thérapeutique préalablement chargé dans le film (figure 3) (Wohl et Engbersen 2012).

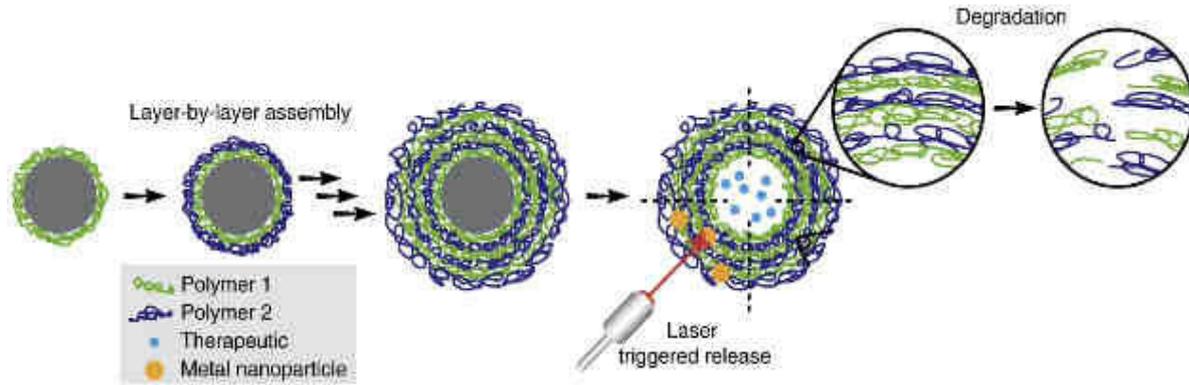


Figure 8. Mécanisme de libération d'un agent thérapeutique déclenché par un rayonnement IR (Wohl et Engbersen 2012).

En utilisant la même stratégie, des nanoparticules d'or ont été fonctionnalisées avec des copolymères thermosensibles à base de NIPAM et DMA (2-(diméthylamino)éthyl méthylacrylate). Ces nanoparticules ont été utilisées pour réaliser un film multicouche répondant à la lumière en déposant successivement une couche de PMMA (poly(méthacrylate de méthyle)) avec une couche de ses particules jusqu'à obtenir le nombre de couches voulues (figure 4A). L'assemblage a été réalisé à $\text{pH} = 3$ pour permettre la formation de liaisons hydrogène entre les unités de NIPAM se trouvant sur les particules et les unités de PMMA protonées. A température ambiante, sous la LCST du NIPAM, le copolymère (NIPAM/DMA) va se charger en eau en provoquant un gonflement de la structure. Ensuite en appliquant un rayonnement lumineux (546 nm), les particules vont absorber le rayonnement et le restituer sous forme de chaleur. Cela va provoquer un échauffement local suffisant pour passer au-dessus de la LCST du NIPAM et ainsi provoquer une rétraction du copolymère (NIPAM/DMA) qui va expulser l'eau de sa structure. En assemblant ces particules avec le PMMA pour former un film multicouche, il est donc possible de créer un film répondant à la lumière qui va gonfler à 20°C et se rétracter sous l'effet du rayonnement lumineux (figure 4B). Ce phénomène de contraction du film sous rayonnement lumineux a été utilisé pour déclencher la libération de molécules de pyrène initialement chargées dans ce film multicouche.

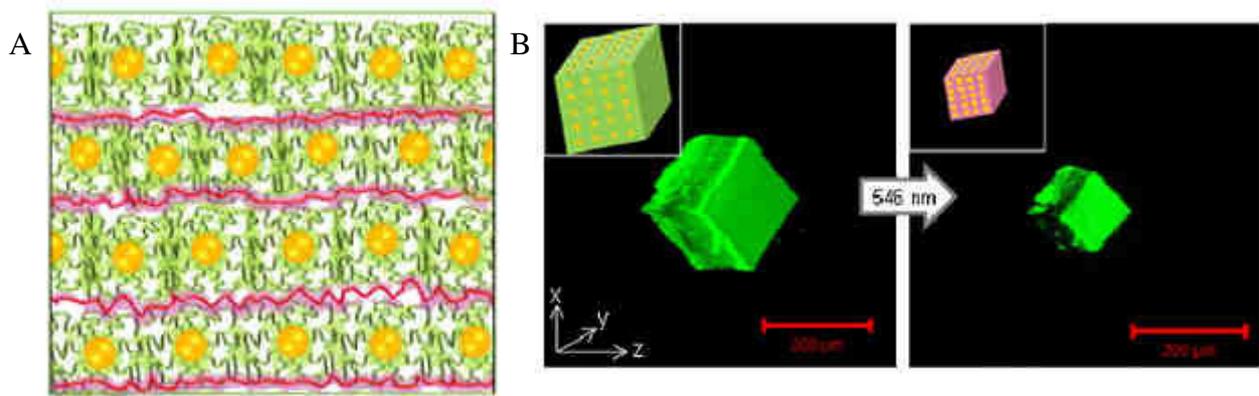


Figure 9. A) Structure du film multicouche nanoparticules d'or (jaune) fonctionnalisées avec copolymère (vert) (NIPAM-DMA)/PMMA (rouge). B) Images 3D obtenues par microscopie confocale montrant la contraction du film multicouche dans une solution aqueuse à 20°C à pH = 3 après 20 minutes d'exposition à un rayonnement lumineux (546 nm) (Zhu *et al.* 2012).

1.1.3. Films multicouches sous étirement mécanique

1.1.3.1. Propriétés mécaniques des films multicouches de polyélectrolytes

Dans cette section, nous nous focaliserons plus particulièrement sur les films PLL/HA et PSS/PAH car ils seront l'objet principal de notre étude. Les films PLL/HA ont une forte viscosité égale à environ 100 mPa.s (Picart *et al.* 2001) et un module élastique voisin de 0 (Schneider *et al.* 2005; Üzümlü *et al.* 2012). Les films PSS/PAH, quant à eux, sont dans un état proche de l'état solide ou vitreux (Kulcsár *et al.* 2005). La détermination des modules élastiques a pu être obtenue pour de nombreux films multicouches assemblés soit sous forme de films déposés (Schneider *et al.* 2005; Jaber et Schlenoff 2006) sur une surface plane soit sous forme de capsules creuses (Gao *et al.* 2001).

Les propriétés mécaniques des films multicouches de polyélectrolytes sont directement reliées à la mobilité des chaînes de polyélectrolytes au sein du film. Il existe une certaine mobilité des chaînes de polyélectrolytes qui dépend de la nature de l'assemblage. Par exemple, le coefficient de diffusion des chaînes de polymères dans des films PSS/PAH à croissance linéaire est estimé à moins de $10^{-6} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Klitzing 2006) ce qui indique une faible mobilité des chaînes de polymères dans ce matériau vitreux. Par opposition, la mobilité des chaînes de polymères dans des films PLL/HA à croissance exponentielle est estimée entre 1 et $10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Picart *et al.* 2005) ce qui indique une forte diffusion des chaînes dans ces films viscoélastiques.

Dans une autre étude, trois systèmes multicouches différents ont été étudiés sous étirement mécanique : les films PLL/HA, PAH/PSS et PDADMA/PSS (Mertz *et al.* 2007). Ces films ont été construits sur un substrat en silicone pour permettre l'application d'une contrainte mécanique. Cette étude a tout d'abord montré que les films PLL/HA et PDADMA/PSS restaient parfaitement homogènes sans aucune fissure pour des pourcentages d'étirement allant jusqu'à $\alpha = (l-l_0)/l_0 = 50\%$ (l_0 : longueur initiale et l : longueur du film à l'état étiré) tandis que le film PAH/PSS montrait des fissures perpendiculaires à la direction d'élongation à partir de $\alpha = 10\%$ (figure 10). Ces fissures confirment les comportements vitreux et cassants des films PAH/PSS précédemment mentionnés. En ce qui concerne les films PLL/HA, leur comportement, proche de celui d'un gel ou même d'un liquide, combiné avec leur important coefficient de diffusion peut expliquer leur accommodation à la contrainte mécanique et donc l'absence de rupture. Il en est de même pour les films PDADMA/PSS, même si ces derniers sont plus proches de la transition vitreuse. Ainsi, ces différents films multicouches de polyélectrolytes constituent des matériaux de choix pour le développement de films sensibles à l'étirement mécanique.

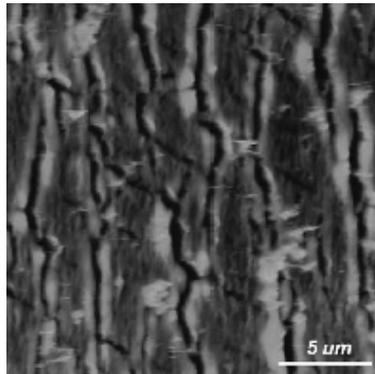


Figure 10. Image AFM d'un film (PAH/PSS)₃₀ déposé sur un substrat silicone étiré à $\alpha = 10\%$ (Mertz *et al.* 2007).

1.1.3.2. Films multicouches répondant aux stimuli mécaniques

1.1.3.2.1. Des surfaces hydrophiles aux surfaces hydrophobes

Récemment, un nouveau type de surface basé sur le dépôt direct de multicouche de polyélectrolytes sur des feuilles de silicone, a permis de passer réversiblement d'un état de surface hydrophile à un état de surface hydrophobe, par simple étirement mécanique

longitudinal du substrat en silicone (Hemmerlé *et al.* 2005). Un polyélectrolyte hydrophobe, le Nafion, a été utilisé pour construire des assemblages formés de films multicouches poly(allylamine)/Nafion (PAH/Naf) en tant que strate hydrophobe et poly(allylamine)/poly(acrylic acid) (PAH/PAA) en tant que strate hydrophile. L'angle de contact d'un film PEI/(Naf/PAH)₄/Naf/(PAH/PAA)₂ a été mesuré au cours de plusieurs cycles d'élongation/rétraction successifs et a conduit à des valeurs alternant réversiblement entre 57 et 100° lorsque l'on passe de l'état non-étiré à un état étiré ($\alpha = 120\%$) (figure 11). Cette observation s'explique notamment par l'exposition en surface de la strate hydrophobe Naf/PAH sous étirement et son ré-enfouissement lors du retour à un état de repos (rétraction).

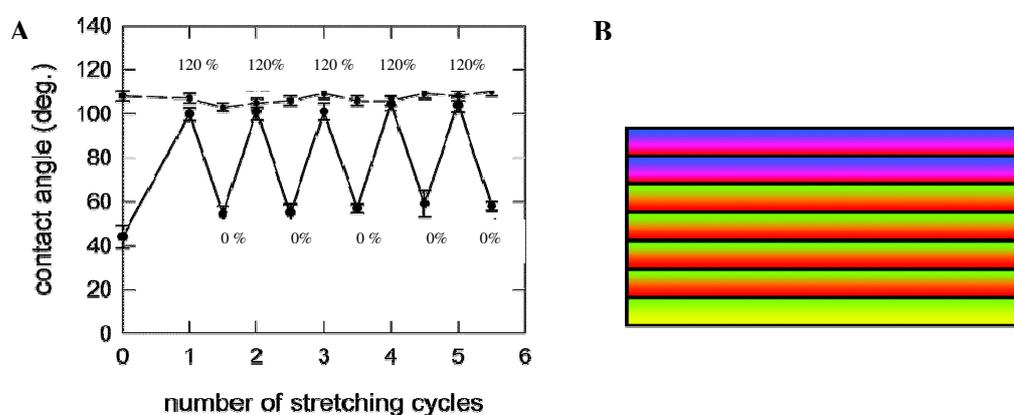


Figure 11. A) Courbe représentant l'évolution de l'angle de contact durant les cycles d'élongation/rétraction pour une multicouche (PEI/Naf)/(PAH/Naf)₄(PAH/PAA)₂. L'état non étiré correspond $\alpha = 0\%$ et l'état étiré correspond à $\alpha = 120\%$. B) Schéma de la structure supposée stratifiée d'un tel film : les bandes vertes et jaunes correspondent à (PEI/Naf), les bandes rouges et vertes à (PAH/Naf) et les bandes rouges et bleues à (PAH/PAA) (Hemmerlé *et al.* 2005).

1.1.3.2.2. Nanovalves à commande mécanique

Mertz *et al.* en 2007 ont montré que l'étirement mécanique d'un système multi-compartimenté (PLL/HA)_n/(PDADMA/PSS)_m/(PLL/HA)_n construit sur un feuillet de silicone créait des nanopores dans la barrière (PDADMA/PSS) (Mertz *et al.* 2007) (figure 12).

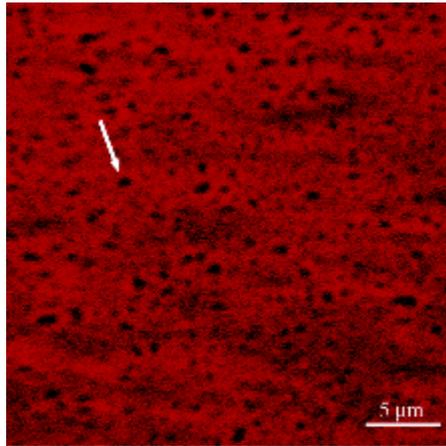


Figure 12. Observation par microscopie confocale (image dans le plan x,y) d'un film multicouches $(PLL/HA)_{30}/PLL^{Rho}/(HA/PLL)/(PSS/PDADMA)_5/(HA/PLL)_{30}/HA/PLL$ (deux compartiments séparés par une barrière) construit sur du silicone. L'image se focalise sur la barrière PDADMA/PSS dans le canal rouge (détection de la rhodamine, notée Rho). Le feuillet de silicone avec le film est étiré à un degré $\alpha = 90\%$. La flèche blanche indique un pore localisé dans la barrière et la flèche noire représente la direction de l'étirement (Mertz *et al.* 2007).

Dans cette structure deux compartiments réservoirs PLL/HA sont séparés par une barrière PDADMA/PSS. Ces nanopores agissent comme des nanovalves à commande mécanique puisqu'ils s'ouvrent à l'état étiré permettant ainsi la diffusion de polyelectrolytes (PLL^{FITC} ou PLL^{Rho}) d'un compartiment à l'autre en traversant la barrière et ils se referment à l'état non étiré et ainsi bloquent la diffusion. Ce système permet donc de moduler la diffusion, grâce aux propriétés de la barrière, d'un compartiment à l'autre par stimulus mécanique (figure 13). En analysant cette figure, on peut constater après étirement une diffusion graduelle des chaînes de PLL^{FITC} du compartiment supérieur vers le compartiment inférieur et vice versa pour les chaînes de PLL^{Rho} jusqu'à un point où l'on ne peut plus différencier les deux compartiments.

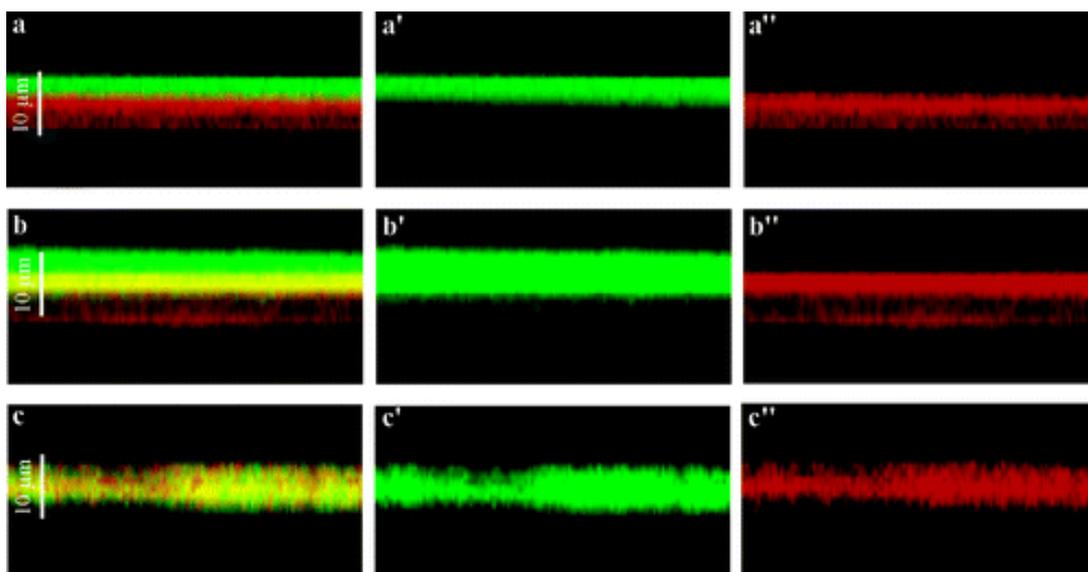


Figure 13. Images obtenues par microscopie confocale (images dans le plan x,z) d'un film multicouche $(PLL/HA)_{30}/PLL^{Rho}/(HA/PLL)/(PSS/PDADMA)_5/(HA/PLL)_{30}/HA/PLL^{FITC}$ (deux compartiments séparés par une barrière) construit sur du silicone et montrant la diffusion graduelles des chaînes de PLL d'un compartiment à l'autre après application d'un étirement mécanique. Le film a été étiré à un degré $\alpha = 90\%$ et les images ont été prises après a) 1 min, b) 240 min et c) 480 min. a, b, c correspondent à la superposition des canaux rouges et verts ; a',b',c' au canal vert et a'',b'',c'' au canal rouge (Mertz *et al.* 2007) .

1.1.3.2.3. Surfaces mécano-transductives pour une biocatalyse réversible

En s'appuyant encore sur le concept de barrière mécano-sensible, Mertz et al. en 2009 ont construit un système multi-compartiment (barrière + réservoir) $(PLL/HA)_n(PDADMA/PSS)_m$ pour déclencher une réaction biocatalytique de manière réversible (Mertz *et al.* 2009). En effet les auteurs ont chargé un film PLL/HA par une enzyme, ALP (phosphatase alcaline), et ils ont recouvert ce film avec une barrière PDADMA/PSS. Ensuite ils ont mis au contact du revêtement une solution d'un substrat non fluorescent de cette enzyme, la FDP (fluorescéine diphosphate). Sous l'effet de l'enzyme ALP, la réaction d'hydrolyse de ce substrat est catalysée et on obtient les produits suivants : la fluorescéine (molécule fluorescente) et des ions phosphates. La biocatalyse peut donc être suivie directement par fluorimétrie. En l'absence d'étirement, aucune fluorescence n'est relevée ce qui indique que le substrat n'est pas entré au contact de l'enzyme et donc que la barrière ne laisse pas passer les molécules. Sous un étirement de $\alpha = 70\%$, une augmentation massive de fluorescence est observée dans le surnageant ce qui signifie que la réaction de biocatalyse se produit. L'étirement mécanique a donc permis une exposition en surface des

enzymes enfouies dans le film réservoir et leur contact avec les molécules de substrat FDP qui se sont transformés en fluorescéine (figure 14). Les auteurs ont également mis en évidence un autre point important : la réversibilité du phénomène. En effet, après rinçage et lorsque le système est ramené à l'état de repos et incubé à nouveau avec la FDP, un niveau de fluorescence négligeable est mesuré dans le surnageant ce qui indique que la réaction de biocatalyse ne se produit pas et que l'enzyme est de nouveau enfouie dans le film et isolée du milieu extérieur. Plusieurs cycles étirement/rinçage/repos peuvent être effectués en conservant le déclenchement de la réaction enzymatique après chaque étirement. Cette étude a constitué le premier système permettant d'induire une réaction biocatalytique par le biais d'un étirement mécanique d'où le terme de surface "mécano-transductive" car un stimulus mécanique est converti en réaction chimique.

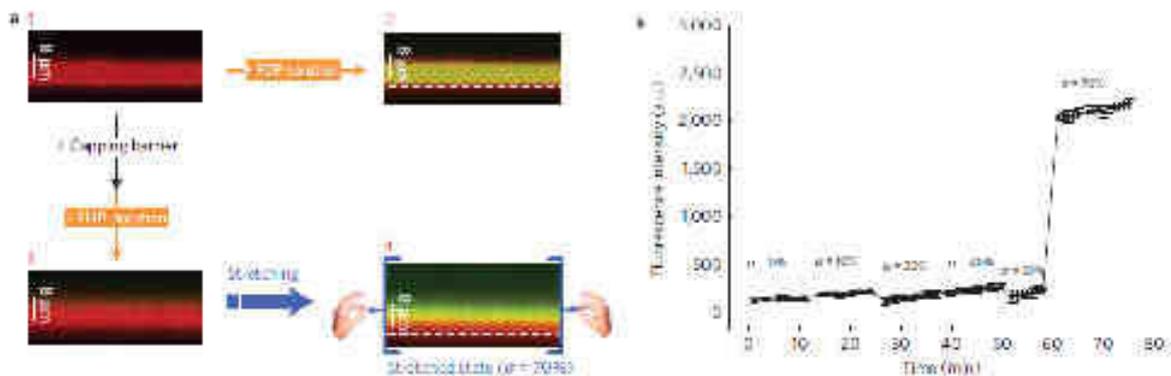


Figure 14. Déclenchement de l'activité biocatalytique induite par étirement mécanique. a) images obtenues par microscopie confocale dans le plan (x,z) d'un film multicouche réservoir + barrière, construit sur feuille de silicone, chargé avec l'enzyme. Images 1et 2 : Réservoir avec l'enzyme de structure $(PLL/HA)_{15}/PLL/ALP^{Rho}/(PLL/HA)_{15}$ dans une solution tampon (image 1) et au contact de la solution de FDP (image 2). Image 3 : Réservoir avec l'enzyme recouvert d'une barrière de structure $(PDADMA/PSS)_6$ au contact de la solution de FDP ne montrant aucune activité biocatalytique. Image 4 : film de l'image étiré à 70% avec activation de la biocatalyse. b) évolution dans le temps de l'intensité de fluorescence dans le surnageant pour différents étirements (de 0 à 70%) (Mertz *et al.* 2009).

1.1.3.2.4. Surface cyto-mécanoresponsive

Des travaux récents ont utilisé des multicouches de polyélectrolytes pour réaliser une surface dite "cyto-mécanoresponsive" (Davila *et al.* 2011). Les processus d'adhésion cellulaire sont naturellement régulés en partie par la présence de peptides d'adhésion sur les surfaces, notamment la séquence d'acide aminés arginine-glycine-acide aspartique (RGD). En utilisant la technique des films multicouches de polyélectrolytes, les auteurs de ce travail ont

réalisé un substrat qui, à l'état non étiré, est non adhérent pour les cellules. Une fois sous étirement mécanique, ce substrat devient adhérent. Ce film est constitué d'une couche de poly(acide acrylique) greffée avec des groupements RGD (PAA-RGD) est enfouie sous des couches de poly(acide acrylique) greffées avec de la phosphorylcholine (PAA-PC) non adhérentes pour les cellules. Pour permettre la construction du film, ces couches de PAA sont séparées entre elles par des couches de PAH. Le film est construit sur du PDMS pour permettre l'étirement de l'ensemble de la structure. L'étirement du film permet de rendre accessibles les groupements RGD et donc de rendre la surface adhérente vis-à-vis des cellules. Lorsque le système revient à l'état non étiré les groupements RGD sont à nouveau enfouis dans la structure du film et la surface redevient non adhérente (figure 15). Ce travail constitue le premier exemple de contrôle de l'activité cellulaire par étirement mécanique.

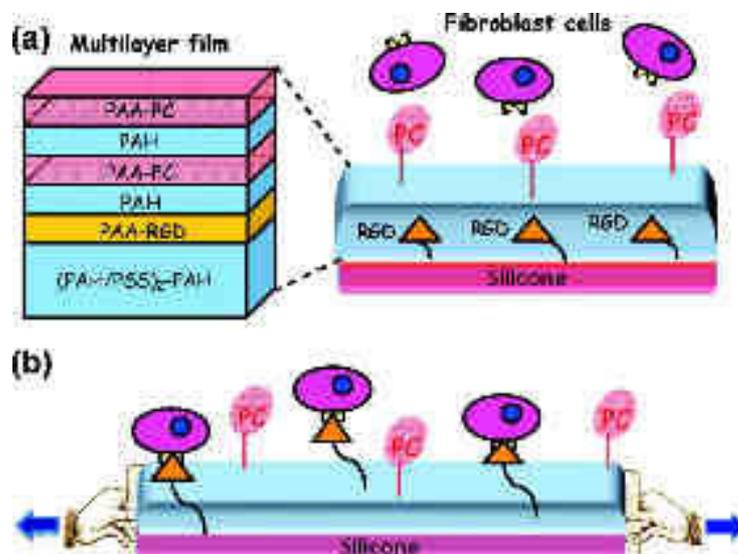


Figure 15. Représentation schématique de la stratégie utilisée pour concevoir le film multicouche "cyto-mécanoresponsif". a) à l'état non étiré les peptides RGD sont enfouis dans le film, b) à l'état étiré les peptides RGD deviennent accessibles aux cellules permettant leur adhésion cellulaire (Davila *et al.* 2011).

Dans le même objectif de développer des surfaces "cyto-mécanoresponsives", une surface de PDMS fonctionnalisée avec des chaînes de PEG (polyéthylène glycol) et des peptides RGD ou de la biotine a été conçue (Bacharouche *et al.* 2013). L'idée était d'enfouir des ligands (RGD ou biotine) entre les chaînes de PEG et de les rendre accessibles uniquement par étirement mécanique pour permettre l'ancrage des cellules (grâce aux groupements RGD) ou des protéines comme la streptavidine (forte interaction avec la biotine) (figure 16). En étirant le substrat, les ligands deviennent accessibles pour les récepteurs

protéiques. En revenant à l'état non étiré, les récepteurs protéiques sont expulsés du substrat et les ligands sont à nouveau enfouis entre les chaînes de PEG et donc masqués. Le processus est donc parfaitement réversible.

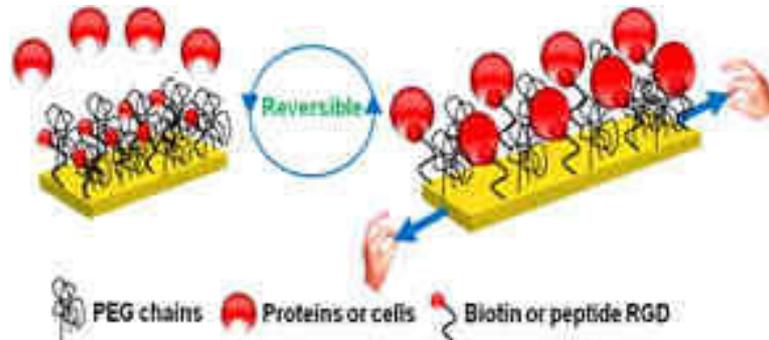


Figure 16. Représentation schématique de la surface "cyto-mécanosensible". A l'état non étiré les ligands sont enfouis entre les chaînes de PEG et à l'état étiré ils deviennent accessibles aux récepteurs protéiques (Bacharouche *et al.* 2013).

1.1.4. Films multicouches de polyélectrolytes dégradables par voie enzymatique pour la libération de molécules

De nombreux films multicouches de polyélectrolytes étant construits avec des polymères naturels ou biodégradables, la dégradation enzymatique de ces films a suscité un grand intérêt dans le but de libérer des molécules bioactives. Ainsi, Lu *et al.* ont étudié la libération d'ADN à partir d'un film multicouche ADN/protéine où l'ADN et la protéine (albumine) sont liés de manière covalente grâce à l'utilisation de formaldéhyde (Lu *et al.* 2007). Les auteurs ont utilisé la protéinase K, qui est une enzyme qui dégrade l'albumine, afin de détruire le film et ainsi libérer l'ADN (figure 17). Cet exemple nous montre qu'il est possible de réaliser un film multicouche biocompatible permettant la libération de l'ADN par action enzymatique.

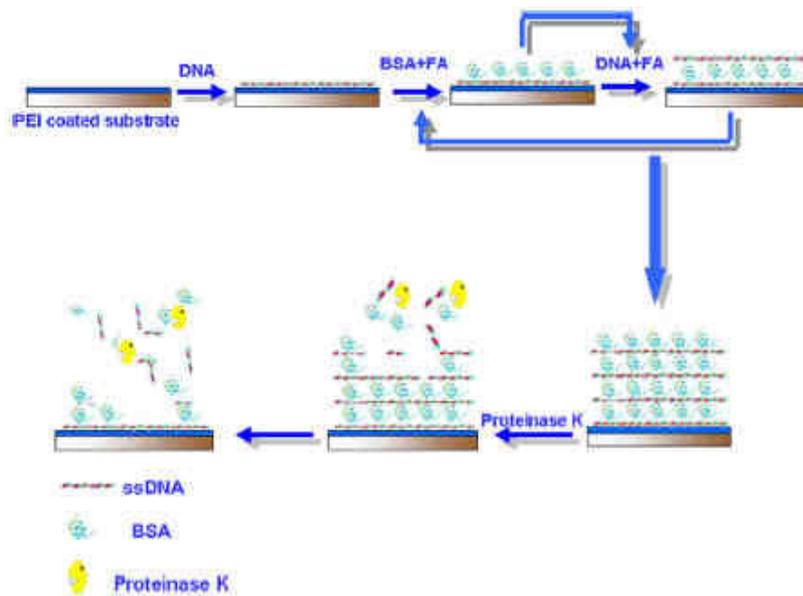


Figure 17. Construction du film multicouche ADN/protéine liés de manière covalente puis libération de l'ADN par dégradation du film sous l'effet de la protéinase K (Lu *et al.* 2007) .

Ren *et al.* en 2006 ont également étudié la libération de l'ADN mais en utilisant un film multicouche PLL/ADN qu'ils ont dégradé en présence de trypsine, une enzyme clivant les liaisons peptidiques des groupes lysine et donc dégradant les chaînes de PLL (Ren *et al.* 2006). Ils ont aussi cherché à contrôler la libération d'ADN en utilisant un agent réticulant, le glutaraldéhyde (figure 18). En augmentant le temps d'incubation de cet agent dans le film, ils ont pu retarder la dégradation enzymatique du film et donc retarder la libération de l'ADN.

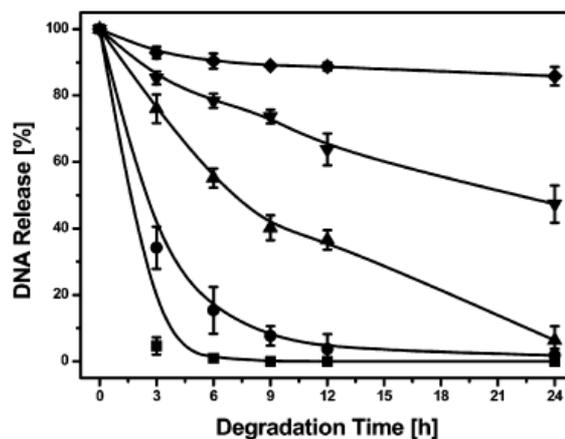


Figure 18. Cinétique de libération d'ADN dans une solution de trypsine à partir d'un film PLL/ADN après différents temps de réticulation au glutaraldéhyde : film original (carré), film ayant été réticulé 10 min (rond), 30 min (triangle), 60 min (triangle inversé), ou 180 min (losange). L'absorbance relative de 100% représente l'absorbance du film PLL/ADN original tandis que 0% représente l'absorbance du substrat de quartz (film totalement dégradé) (Ren *et al.* 2006).

Une étude plus récente utilise les multicouches de polyélectrolytes pour libérer un anticancéreux, le paclitaxel (Boudou *et al.* 2012). Le paclitaxel est un agent thérapeutique hydrophobe et donc les auteurs ont voulu construire un film multicouche de polyélectrolytes contenant des nanodomains hydrophobes pour permettre un meilleur chargement de la molécule. Pour cela, ils ont utilisé des films PLL/HA avec des chaînes de HA modifiées avec des groupements hydrazides contenant des chaînes alkyles. Le paclitaxel a été précomplexé avec le HA modifié contenant des domaines hydrophobes et le film PLL/HA a ensuite été construit. Cette technique leur a permis de réaliser un film sur substrat plan ou sur des supports sphériques. Ensuite le paclitaxel a été libéré par dégradation enzymatique du film par la hyaluronidase (enzyme qui dégrade spécifiquement l'acide hyaluronique).

Ces exemples montrent que l'utilisation d'une enzyme spécifique permet la dégradation contrôlée de tout film composé de polymères naturels ou biopolymères. En chargeant ces films avec des molécules thérapeutiques il devient possible de libérer ces médicaments par simple dégradation enzymatique. De plus, il est important de noter que ces enzymes telles que la trypsine sont naturellement présentes dans les milieux biologiques d'où la possibilité de dégradation *in vivo*.

1.2. Microenvironnement cellulaire

1.2.1. Définition

Les domaines de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénérative visent à produire des tissus artificiels ou même des organes entiers dans un but de régénération après lésion ou encore pour simuler des tests cliniques, mettre au point des biocapteurs ou tester des agents thérapeutiques. En ingénierie tissulaire, Même s'il existe de nombreuses approches en ingénierie tissulaire comme celles utilisant des architectures tridimensionnelles artificielles ("scaffolds") ou des matériaux naturels décellularisés, la présence de composants cellulaires est généralement nécessaire (Zorlutuna *et al.* 2013). Les dernières avancées dans le domaine de la biologie ont montré que les cellules sont très sensibles à leur environnement et donc que le contrôle du microenvironnement cellulaire est un aspect fondamental de la médecine régénérative et de l'ingénierie tissulaire.

Le microenvironnement cellulaire peut être défini comme l'ensemble des composants qui agissent directement sur une cellule ou un groupe de cellules. Il affecte le comportement de la cellule principalement par voie biochimique et/ou biophysique.

Le microenvironnement d'une cellule individuelle est composé :

- de la matrice extracellulaire,
- des cytokines, hormones, facteurs de croissance et autres molécules bioactives,
- des cellules voisines.

La nano/microtopographie et les propriétés physiques de la matrice extracellulaire affectent également le comportement de la cellule tout comme les contraintes de déformation dues au mouvement de l'organisme ou des fluides physiologiques comme le sang.

1.2.2. La matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire est composée de macromolécules sécrétées par les cellules. Elle est principalement constituée d'eau, de polysaccharides (glycosaminoglycanes et protéoglycanes) et de protéines fibreuses. Elle est très abondante dans les tissus conjonctifs. Ce réseau est en contact avec la surface des cellules. La cellule s'attache à la MEC grâce à des protéines membranaires comme les intégrines (figure 19).

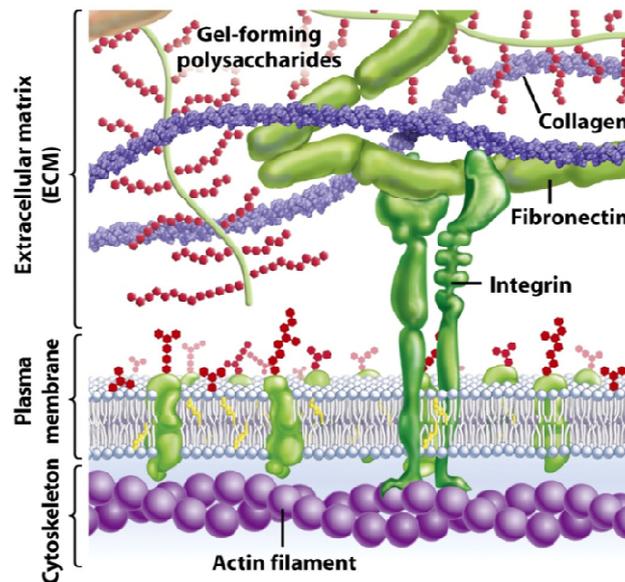


Figure 19. Composition de la matrice extracellulaire et sa connexion avec la membrane cytoplasmique d'une cellule. (Freeman S 2005).

La matrice extracellulaire est produite principalement par les cellules épithéliales et les cellules des tissus conjonctifs comme les fibroblastes ou les ostéoblastes (Kim *et al.* 2011). Elle remplit les fonctions suivantes :

- Promouvoir l'association des cellules pour former un tissu cohérent,
- Assurer la cohésion des tissus et des organes (résistance mécanique),
- Réguler le comportement des cellules (adhésion, prolifération, migration, différenciation) par la transmission de signaux spécifiques,
- Fixer des facteurs de croissance et des hormones.

Toutes les fonctions assurées par la matrice extracellulaire dépendent de ses propriétés physiques et biochimiques qui sont propres à chaque tissu.

1.2.2.1. Les composants de la matrice extracellulaire

1.2.2.1.1. Protéines

- Les protéines de « structure »

La MEC est composée de protéines dites « de structure » dont certains domaines permettent des interactions avec d'autres composants de la MEC, ce qui permet l'organisation et la structuration de la matrice. Une des principales protéines de structure est le collagène. Les collagènes appartiennent à une famille de glycoprotéines fibreuses que l'on trouve chez tous les animaux pluricellulaires (figure 20).

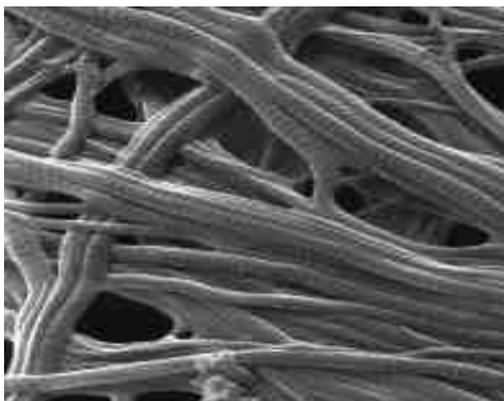


Figure 20. Fibres de collagène de type I imagées en microscopie électronique à balayage (MEB) (www.azom.com).

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes chez les mammifères où elles représentent 25 % des protéines totales. Il existe de nombreux types de collagène (au moins 29) mais ils ne sont pas tous présents dans la matrice extracellulaire. Ils sont pour la plupart produits par les fibroblastes. Ces protéines ont une structure hélicoïdale (chaîne en hélice α). L'hélice est formé par la succession d'un triplet d'acides aminés (glycocolle aussi appelé Glycine-X-Y)_n avec X et Y qui sont le plus souvent la proline et l'hydroxyproline. La proline a pour but de stabiliser la conformation hélicoïdale (Ramachandran et Kartha 1955; Ramachandran 1956; Fratzi *et al.* 1998). Les collagènes sont des protéines de structure qui ont un rôle de soutien mécanique du tissu conjonctif, des tendons et du cartilage. Ces protéines jouent également un rôle en se liant avec d'autres molécules de la MEC. Une autre protéine de structure que l'on peut trouver abondamment dans la MEC est l'élastine. Cette protéine riche en proline et en glycine est responsable de l'élasticité de nombreux tissus (Hay 1991). Elle est présente au niveau de la peau, des poumons, des vaisseaux sanguins, des tissus conjonctifs et dans certains tendons et cartilages. La forte teneur en acides aminés hydrophobes de cette protéine est responsable de l'élasticité. En milieu aqueux, les acides aminés hydrophobes amènent la protéine à se replier sur elle-même de façon désordonnée et ensuite lorsque le tissu contenant de l'élastine subit un étirement, la protéine exhibe ses parties hydrophobes ce qui crée une situation thermodynamiquement instable. Une fois l'étirement terminé, l'instabilité thermodynamique amène la chaîne polypeptidique à se replier de nouveau sur elle-même pour minimiser son énergie. Ainsi l'élasticité peut être expliquée par la capacité de la protéine à se

dérouler sous étirement et à reprendre sa conformation globulaire une fois la tension relâchée (figure 21).

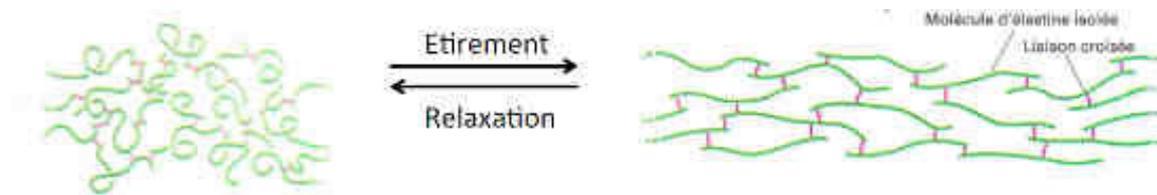


Figure 21. Structure de l'élastine pendant les phases d'étirement et de relaxation.

- Les protéines « d'adhérence »

La MEC est aussi composé de protéines dites « d'adhérence ». Ces protéines ont des propriétés adhésives liées à la présence de domaines d'interaction avec des récepteurs d'adhésion comme les intégrines. Ces domaines sont responsables de l'adhésion des cellules à la matrice. Une des principales protéines d'adhérence est la fibronectine. Cette protéine est constituée de deux monomères similaires. Les deux monomères sont reliés par une paire de ponts disulfures à leur extrémité C-terminale. La fibronectine, synthétisée par divers types cellulaires comme les fibroblastes, possède de nombreux sites de liaison avec les protéines de la MEC comme le collagène et l'héparane-sulfate (Ruoslahti 1988). La fibronectine possède également des domaines d'interaction avec les protéines du sang comme la fibrine, ce qui permet la cicatrisation, l'hémostase ou l'angiogénèse (Makogonenko *et al.* 2002) (figure 22). Elle possède aussi un domaine contenant la séquence d'acides aminés arginine-glycine-acide aspartique (RGD) permettant la liaison avec des protéines membranaires comme les intégrines ce qui régule les phénomènes d'adhésion cellulaire, de prolifération, de différenciation et de motilité (Ruoslahti 1996). Enfin cette protéine contient des domaines d'interaction avec des glycosaminoglycanes comme l'héparine (Barkalow et Schwarzbauer 1991).

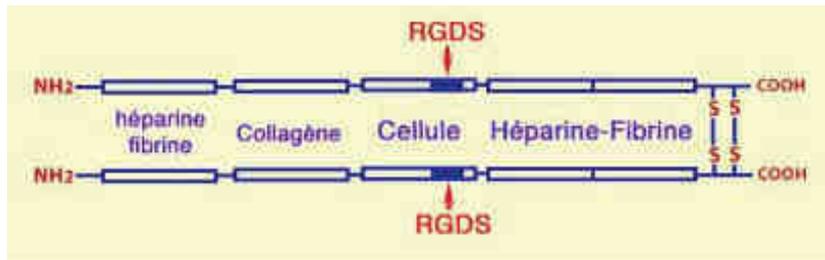


Figure 22. Structure de la fibronectine et ses domaines de liaison avec différentes molécules comme les protéines de la MEC (collagène), les glycosaminoglycanes (héparine) ou les protéines membranaires avec la séquence RGD (Biologie Moléculaire de la Cellule 3ème Edition 1998).

1.2.2.1.2. Les polysaccharides

- Les glycosaminoglycanes (GAGs)

Dans la famille des polysaccharides, on peut tout d'abord distinguer les glycosaminoglycanes qui sont des longues chaînes carbonées non ramifiées constituées de la répétition d'un même motif disaccharidique. Les GAGs les plus répandus sont l'acide hyaluronique (HA) (figure 23), la chondroïtine-sulfate (CS), l'héparane-sulfate (HS), l'héparine et le kératane-sulfate (KS). Les GAGs ont une charge globale négative et ils sont très hydrophiles ce qui leur confère la capacité d'absorber une grande quantité d'eau (Haxaire *et al.* 2003). Ils forment donc des gels hydratés qui remplissent la matrice et lui donnent sa résistance aux forces de compression.

L'acide hyaluronique est un GAG non sulfaté composé d'environ 50 000 disaccharides reliés par des ponts hydrogène (Sugrue et Hay 1981). L'acide hyaluronique est le seul glycanes extracellulaire qui ne soit pas associé par covalence à une protéine. Il peut interagir avec les protéines de la MEC comme le collagène, la fibronectine, la laminine. L'acide hyaluronique peut être trouvé dans de nombreux tissus et fluides du corps humain comme la peau ou les cartilages (Fraser *et al.* 1997). En formant des gels hydratés visqueux, il confère au cartilage des propriétés de résistance à la pression et à la déformation. Il améliore aussi la lubrification des surfaces articulaires. Enfin le HA intervient dans les processus de signalisation, différenciation et prolifération en se liant aux protéines transmembranaires présentes à la surface des cellules comme les récepteurs CD44 ou RHAMM (Receptor for Hyaluronan-Mediated cell Motility) (Underhill 1992; Turley *et al.* 2002).

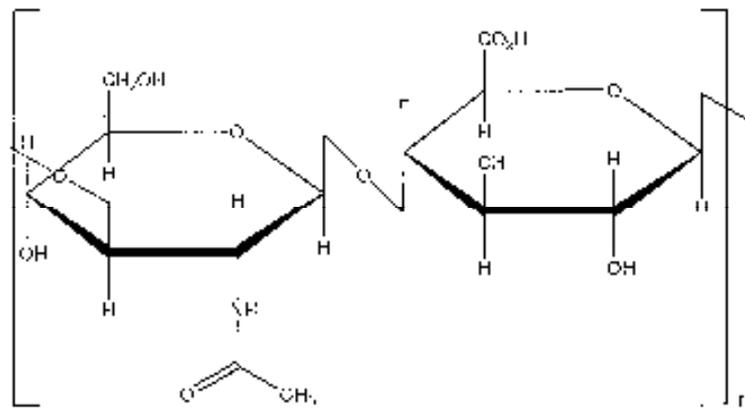


Figure 23. Structure d'un glycosaminoglycane : l'acide hyaluronique.

- Les protéoglycans (PG)

Les PGs sont une famille de macromolécules composés de chaînes de GAG-sulfatés (donc différents de l'acide hyaluronique) liées de manière covalente à une protéine centrale (Iozzo et Murdoch 1996). Dans ces complexes de protéines et de GAGs, la composante polysaccharide est largement prédominante (plus de 90%). Les chaînes latérales de GAGs sont attachées à des résidus de sérine ou thréonine de la chaîne polypeptidique par une liaison de type O-glycosidique (tétrasaccharide de liaison : xylose-galactose-galactose-acide glucuronique) (figure 24).

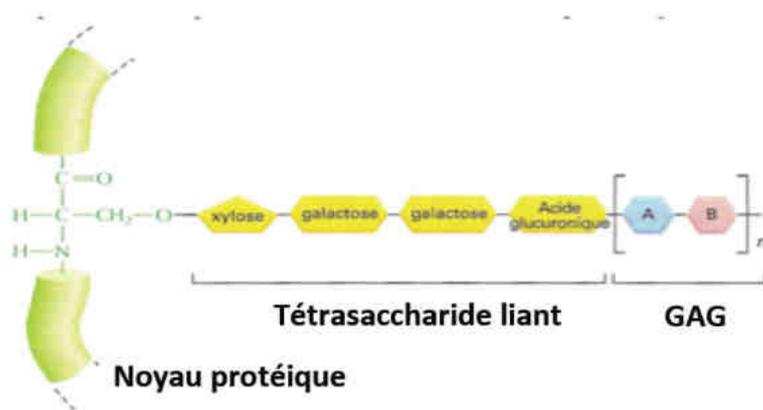


Figure 24. Structure des protéoglycans avec le GAG lié au noyau protéique par un tétrasaccharide (Biologie Moléculaire de la Cellule 3^{ème} Edition 1998).

Les PG les plus répandus sont la décorine (à base de chondroïtine-sulfate) et le perlecan (à base d'héparane-sulfate). Les PGs se fixent sur l'acide hyaluronique, le collagène et d'autres protéines de la MEC dont ils consolident la structure. Lorsque de nombreux PG se lient à une molécule d'acide hyaluronique, ils forment des agrégats de PGs. Ces agrégats peuvent retenir de grandes quantités d'eau (charge négative élevée) et fixer certaines cytokines et facteurs de croissance. Les PGs jouent également un rôle dans les voies de signalisation cellulaire (Schaefer et Iozzo 2008), dans l'adhérence et dans la migration cellulaires (Schaefer et Schaefer 2010).

1.2.2.2. Interaction matrice extracellulaire-cellules

La MEC émet des signaux en fonction de ses propriétés biophysiques et biochimiques. Ces signaux sont capables de réguler le comportement cellulaire. Ils se propagent de la membrane plasmique de la cellule jusqu'à son noyau par une cascade de signalisation entraînant une modification du comportement cellulaire notamment l'adhésion et la migration. Ces signaux vont même réguler l'expression des gènes ce qui aura un effet sur la différenciation, la prolifération ou l'apoptose (Watt 2013).

La communication, et donc la transmission de signaux, entre la MEC et la cellule, se fait par le biais de protéines d'adhésion situées dans la membrane cytoplasmique des cellules, dont les principales sont les intégrines. En effet les intégrines sont capable de se lier avec des molécules spécifiques de la MEC comme la fibronectine. Ces protéines membranaires, en recevant les signaux spécifiques de la MEC, changent de conformation et permettent l'ancrage des cellules. Par exemple, l'absence d'adhésion des cellules à la MEC conduit à la mort cellulaire par apoptose (Frisch et Francis 1994). En fonction des différents types d'intégrines présents à la surface des cellules et de leurs affinités respectives pour les différentes molécules du microenvironnement cellulaire, différentes cascades de signalisation peuvent se produire et engendrent différents comportements cellulaires (Mitra et Schlaepfer 2006).

1.2.3. Les facteurs de croissance

Le comportement cellulaire peut être régulé par de nombreuses molécules bioactives comme les facteurs de croissance, les hormones, les cytokines ainsi que par des agents thérapeutiques comme les médicaments. Certaines de ses molécules comme les facteurs de croissance jouent un rôle dans la formation des tissus, leur maintien et leur régénération et ce

rôle majeur explique que ces molécules aient été fortement étudiées dans les domaines de la médecine régénérative et l'ingénierie tissulaire.

1.2.3.1. Fonctions des facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des petites protéines présentes en faible concentration dans la matrice extracellulaire et qui sont capable de stimuler la prolifération et la différenciation cellulaire. Leur action sur les cellules peut se manifester de la façon suivante (Varkey *et al.* 2004):

- effet mitogénique (stimulation division cellulaire),
- effet morphogénique (favorise la différenciation cellulaire),
- effet métabolique (stimulation activité métabolique),
- effet apoptotique (mort cellulaire programmée),
- effet chimiotactique (favorise la migration cellulaire).

Ces polypeptides sont considérés comme des molécules de signalisation qui sont capables d'induire des réponses cellulaires spécifiques dans un microenvironnement biologique (Cross et Dexter 1991). En effet ils modulent le comportement cellulaire en se liant à des récepteurs transmembranaires spécifiques de la cellule visée.

Les facteurs de croissance ont un rôle fondamental dans les processus de signalisation cellulaire. La signalisation cellulaire est le système complexe de communication entre les cellules qui régule leur développement, leur organisation en tissu, leur croissance, leur division et la coordination de leurs fonctions. On peut distinguer trois voies de signalisation cellulaire différentes (figure 25) des facteurs de croissance :

- la voie autocrine qui signifie que les facteurs de croissance agissent sur la cellule qui les a sécrétés par le biais de récepteurs de la membrane cellulaire,
- la voie paracrine qui signifie que les facteurs de croissance agissent sur des cellules voisines de la cellule qui les a sécrétés,
- la voie télécrine qui se rapproche de la voie paracrine mais où les facteurs de croissance agissent sur des cellules plus éloignées qui ne sont pas en interaction directe avec la cellule sécrétrice.

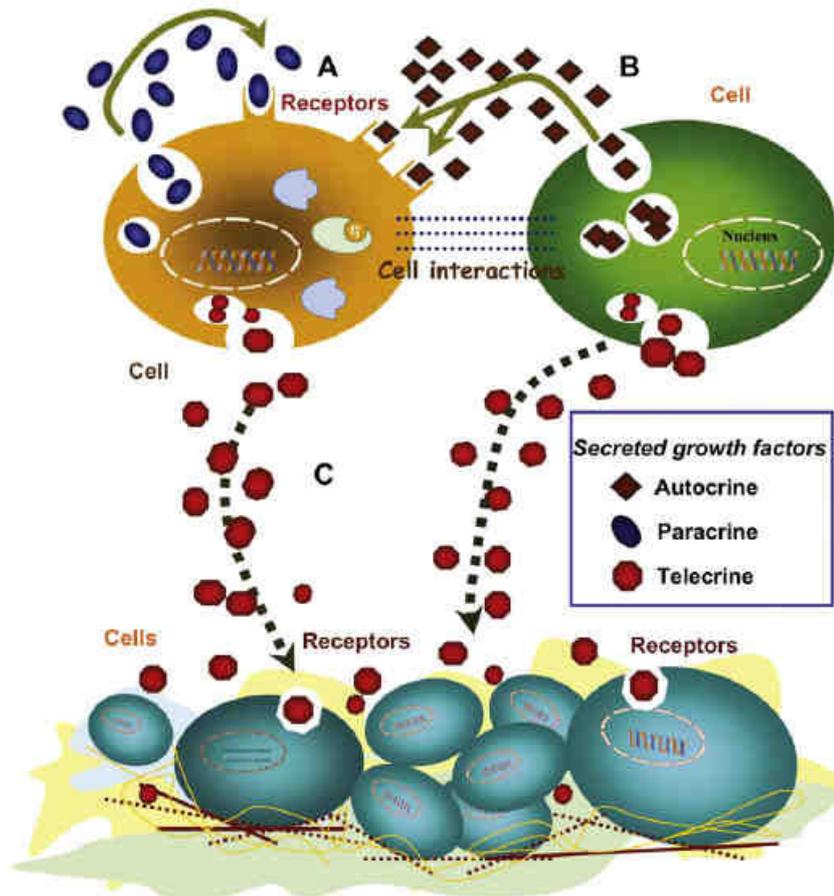


Figure 25. Illustration schématique des différentes voies de signalisation pour les facteurs de croissance : autocrine (A), paracrine (B) et télécrine C). Les facteurs de croissance se lient aux récepteurs spécifiques des cellules et régulent l'expression des gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la morphogénèse ou la régénération (Chen *et al.* 2010).

La transmission du signal du facteur de croissance au noyau de la cellule visée résulte d'une multitude d'événements impliquant la phosphorylation des protéines du cytosquelette, des flux d'ions, des changements dans le métabolisme, l'expression de certains gènes, et enfin la synthèse de protéines (Cohen *et al.* 1995) (figure 26).

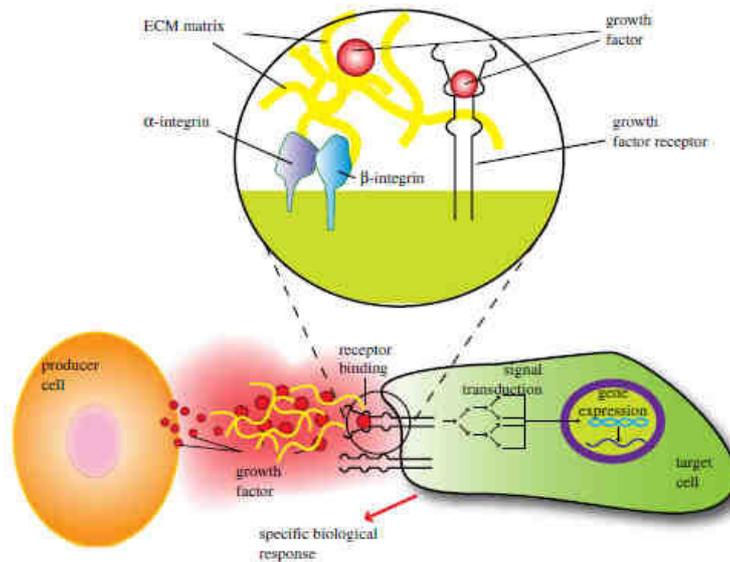


Figure 26. Communication entre les cellules régulées par les facteurs de croissance et la MEC. La cellule productrice sécrète des facteurs de croissance soluble qui se lie aux récepteurs de la cellule visée. Les instructions sont transmises à l'intérieur de la cellule via la phosphorylation des protéines du cytosquelette (transduction du signal) et régulent l'expression de certains gènes (Lee *et al.* 2011).

Les facteurs de croissance jouent également un rôle majeur dans le transfert d'information entre les différentes populations cellulaires et leur microenvironnement. En effet, ils participent activement au recrutement cellulaire pour les phénomènes de régénération tissulaire et la morphogénèse. Les facteurs de croissance ont une portée de diffusion assez faible dans la MEC et ils agissent de manière locale à cause de leur faible temps de demi-vie et leur diffusion assez lente. La capacité d'un facteur de croissance à délivrer un message particulier à une population cellulaire spécifique n'est pas seulement déterminée par l'identité du facteur de croissance ou sa capacité à diffuser à travers la MEC mais par le nombre de cellules cibles présentes et le type de récepteurs transmembranaires qu'elles possèdent (Lee *et al.* 2011). Les familles les plus connues de facteurs de croissance sont les suivantes :

- BMP (bone morphogenic protein)
- VEGF (vascular endothelial growth factor)
- EGF (epidermal growth factors factor)
- FGF (fibroblast growth factor)
- PDGF (platelet derived growth factor)

- HGF (hepatocyte growth factor)

- IGF (insulin growth factor)

Les composants de la MEC comme les GAGs, les protéoglycanes et les protéines sont capables de se lier à des facteurs de croissance spécifiques (tableau 1).

Facteur de croissance	Effet sur les cellules	Interactions avec GAG, PG ou protéines de la MEC
FGF (fibroblast growth factor)	Prolifération, migration et survie principalement des cellules fibroblastiques	héparane sulfate/héparine (Hileman <i>et al.</i> 1998) fibronectine (Kulahin <i>et al.</i> 2008)
VEGF (vascular endothelial growth factor)	Prolifération, migration et survie des cellules endothéliales	héparane sulfate/héparine (Zhao <i>et al.</i> 2012) hyaluronane (Jackson 2003) fibronectine (Wijelath <i>et al.</i> 2006)
BMP (bone morphogenic protein)	Différenciation des cellules osseuses pour BMP-2 et BMP-7	héparane sulfate/héparine (Kreuger <i>et al.</i> 2006) collagène (Zhu <i>et al.</i> 1999)

Tableau 1. Quelques facteurs de croissance et leurs principales interactions avec les protéines et les GAGS de la MEC. Tableau adapté de Macri *et al.* 2007.

Les molécules de la MEC servent alors de réservoir pour les facteurs de croissance tout en régulant leur activation, leur synthèse et leur dégradation. En effet, cette liaison altère la concentration locale en facteur de croissance dans le microenvironnement cellulaire, limiter leur mobilité dans la MEC et empêcher leur interaction avec les cellules avoisinantes (Macri

et al. 2007). Les facteurs de croissance pourront redevenir accessibles pour les autres cellules par dégradation protéolytique des molécules de la matrice extracellulaire. Ils seront alors présentés à la cellule sous forme soluble. Dans certains cas comme avec le VEGF₁₆₅, il est nécessaire que le facteur de croissance soit lié à des composants de la MEC pour induire une migration des cellules endothéliales (Ruhrberg *et al.* 2002). Les voies de signalisation cellulaire sont assez complexes et le fait que le facteur de croissance soit présenté sous forme soluble ou lié à des composants matriciels induit différents comportements cellulaires.

Nous allons maintenant prendre l'exemple de la famille du VEGF pour expliquer plus précisément les voies de signalisation cellulaire.

1.2.3.2. VEGF : Vascular Endothelial Growth factor

La famille du VEGF est connue pour réguler de nombreuses fonctions des cellules endothéliales comme la mitogénèse (prolifération cellulaire), la migration cellulaire, la résistance mécanique des vaisseaux, la perméabilité et la sécrétion de molécules vasoactives (molécules provoquant la dilatation ou la constriction des vaisseaux). Il existe plusieurs isoformes du VEGF dont les principales sont le VEGF₁₈₉, VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁ et le VEGF₂₀₅. L'activité du VEGF est régulée par trois récepteurs à activité Tyrosine Kinase (RTK) : VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 (Giles 2001; Kowanetz et Ferrara 2006). Ce sont des récepteurs transmembranaires qui transmettent le signal entre les milieux extracellulaire et intracellulaire par des réactions successives de phosphorylation des protéines intracellulaires jusqu'à atteindre le noyau de la cellule. Ainsi dans le cas du VEGF, le récepteur VEGFR-2 est principalement responsable de la prolifération des cellules endothéliales par son activation et par l'activation d'autres kinases comme ERK1/2 (aussi connu sous le nom de MAPK : mitogen activated protein kinase) (figure 27). L'activation de ces protéines se fait par la phosphorylation des résidus tyrosine. Cette cascade de réaction à l'intérieur de la cellule aboutit à la synthèse d'ADN et donc à la prolifération des cellules (Müller *et al.* 2008).

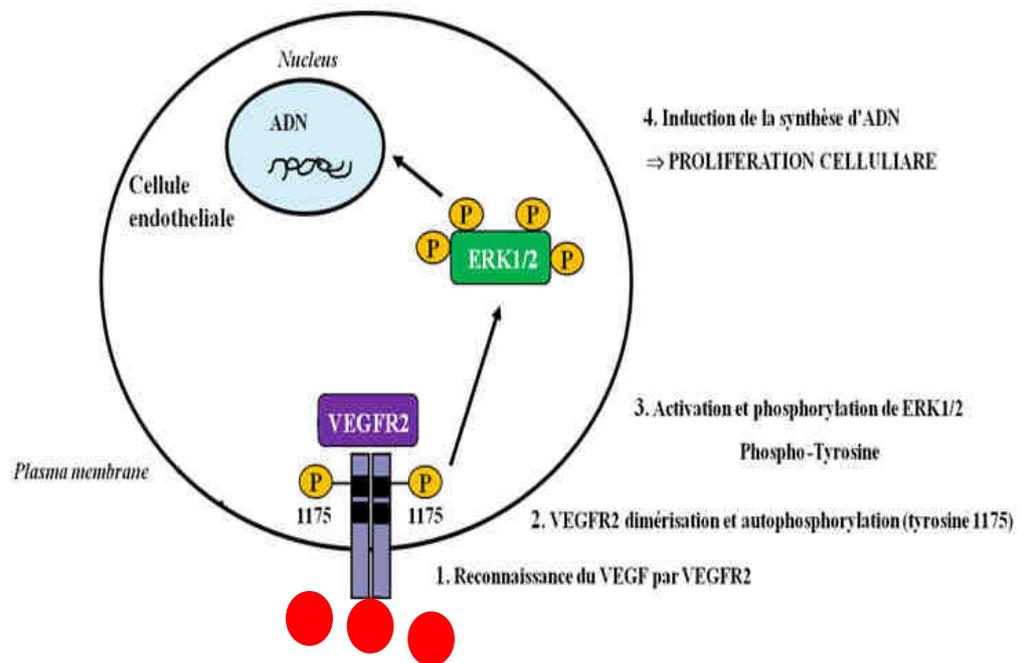


Figure 27. Transduction du signal par le récepteur VEGFR-2 pour les cellules endothéliales. Cette voie de signalisation va être activée par la liaison entre le VEGF et le récepteur VEGFR-2 qui va induire la dimérisation et l'autophosphorylation du récepteur sur les résidus tyrosine. Ensuite une réaction en cascade est amorcée avec par exemple l'activation (liaison des phosphates sur les résidus tyrosine 1175) et l'autophosphorylation d'ERK 1/2 qui entraîne la synthèse d'ADN. Figure adaptée de (Müller *et al.* 2008).

1.3. Biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire

1.3.1. Introduction

La partie précédente de la revue bibliographique était destinée à montrer l'importance du microenvironnement cellulaire et plus particulièrement le rôle de la matrice extracellulaire et des facteurs de croissance dans le contrôle du comportement des cellules. Dans les domaines de la médecine régénérative et de l'ingénierie tissulaire, les recherches se sont portées sur la mise en place de matériaux pour mimer la matrice extracellulaire. Ces matériaux ont pour but de procurer aux cellules l'environnement idéal pour faciliter leur régénération, leur adhésion, leur prolifération, leur différenciation et ainsi permettre la régénération de tissus. Pour permettre l'assemblage des cellules précurseurs d'un tissu, il est important de reconstituer, d'une part, tous les signaux biochimiques de la MEC avec ses protéines, ses GAG, ses facteurs de croissance et d'autre part les signaux physiques de la MEC avec ses caractéristiques de rigidité et de topographie. Pour être de bons candidats pour l'ingénierie tissulaire, les matériaux devront répondre aux critères suivants (Sokolsky-Papkov *et al.* 2007) :

- avoir des propriétés mécaniques correspondant au tissu sur lequel ils sont implantés ou au moins posséder des propriétés mécaniques suffisamment proches,
- être biocompatibles et non cytotoxiques,
- mimer la matrice extracellulaire pour promouvoir le développement des cellules et la morphogénèse,
- avoir une surface d'adhérence favorable aux cellules et aux protéines. En effet le matériau doit permettre l'adhésion, la prolifération, la migration des cellules et faciliter le contact entre les cellules;
- être dégradables. Le matériau biodégradable doit être absorbé au terme d'une durée prédéterminée et doit ensuite être remplacé par le tissu néoformé.

Une des premières problématiques étudiées dans l'optique d'élaborer des biomatériaux mimant la MEC est l'adhésion cellulaire (Garrouste *et al.* 1982). En effet sans adhésion cellulaire, les cellules destinées à former un tissu ne peuvent pas survivre. Pour conférer aux matériaux des propriétés adhésives, des molécules favorisant l'adhésion cellulaire comme les protéines de la MEC (la fibronectine par exemple) ou des séquences peptidiques particulières (la séquence RGD : arginine-glycine-acide aspartique, par exemple) ont été greffées à la

surface du matériau (Shin *et al.* 2003). Par la suite les propriétés mécaniques du substrat et l'incorporation de facteurs de croissance ont été largement étudiées (Lee *et al.* 2011).

Les biomatériaux qui permettent de mimer la MEC peuvent se diviser en deux catégories :

- les matériaux naturels comme ceux à base d'alginate, de collagène, d'acide hyaluronique, de gélatine, de chitosane et les Matrigels (voir détails ci-après).
- les matériaux synthétiques comme ceux à base de poly(esters), de poly(éthylène glycols) (PEGs), les polyacrylates, les polyacrylamides et leurs copolymères et les mélanges de ces composés.

On peut également considérer une troisième catégorie de matériaux, dit matériaux hybrides. A titre d'exemple, on peut citer les films multicouches de polyélectrolytes qui peuvent être construits à partir de matériaux synthétiques (PAH/PSS) : (poly(allylamine)/poly(4-styrène sulfonate de sodium), de matériaux naturels (collagène/alginate) ou avec un mélange matériau synthétique/ matériau naturel PLL/HA) : (poly(L-lysine)/acide hyaluronique). Les films multicouches de polyélectrolytes ont été traités dans la première partie de la revue bibliographique, ils ne seront donc pas détaillés dans cette partie.

1.3.2. Les matériaux synthétiques

Il existe de nombreux matériaux synthétiques qui peuvent être utilisés en ingénierie tissulaire. Dans cette partie, nous nous focaliserons sur deux familles à titre d'exemple.

- Les polyesters

Dans la famille des polyesters synthétiques, le poly(acide lactique) (PLA), le poly(acide glycolique) (PGA) et leurs copolymères comme le poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) sont les plus utilisés pour l'ingénierie tissulaire, les implants et les applications de libération de molécules bioactives (figure 28). Ils sont biocompatibles et leur vitesse de dégradation peut être modulée de plusieurs mois à plusieurs années en fonction de leur degré de cristallinité, leur poids moléculaire, et leur ratio de copolymère (Anderson et Shive 2012). De nombreux types cellulaires ont été cultivés sur des matériaux à base de PLA,

PGA et PLGA comme les ostéoblastes, les fibroblastes et les cellules souches (Sokolsky-Papkov *et al.* 2007). Ces matériaux ont néanmoins quelques désavantages comme :

- l'hydrophobicité de leurs oligomères,
- la génération d'espèces acides et donc une baisse locale de pH qui peut causer des inflammations autour de l'implant et déclencher une hydrolyse,
- l'auto-accélération de la dégradation déclenchée par une chute locale du pH qui va catalyser la dégradation hydrolytique des liaisons esters.

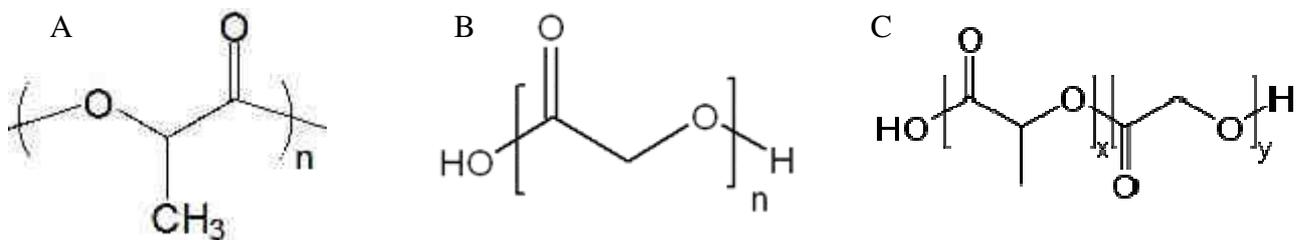


Figure 28. Différentes structures de polyesters : PLA (A), PGA (B) et le copolymère PLGA (C).

- Le poly (éthylène glycol) PEG

Les hydrogels à base de PEG sont très utilisés en ingénierie tissulaire car ils font partie des rares substrats ayant des propriétés mécaniques contrôlées et qui permettent donc d'étudier les cellules dans un environnement 3D (Tibbitt et Anseth 2009). Cependant ils sont biologiquement inertes et nécessitent l'incorporation de molécules bioactives ou le greffage de peptides d'adhésion comme le peptide RGD pour réguler le comportement des cellules (Fisher *et al.* 2014). Des matériaux à base de PEG ont été fabriqués pour être dégradables par des enzymes spécifiques (métallo-protéases) sécrétées par les cellules. Ces matériaux sont principalement des copolymères de PEG avec des oligopeptides (Guo et Ma 2014). Pour rendre le matériau biodégradable, des copolymères de PEG avec d'autres polymères biodégradables ont également été réalisés comme le copolymère dibloc PEG- PLGA (Lee et Mooney 2001) (figure 29).

- L'alginate

L'alginate est un polysaccharide obtenu à partir d'algue et il est souvent utilisé en ingénierie tissulaire (figure 30A). En effet les matériaux à base d'alginate sont biocompatibles, faiblement toxiques, peu onéreux et l'obtention d'un hydrogel se fait par simple gélification en présence de cations divalents comme le calcium ou le magnésium (Ingar Draget *et al.* 1990) (figure 30B). Grâce à cette réticulation ionique, un substrat 3D peut être formé.

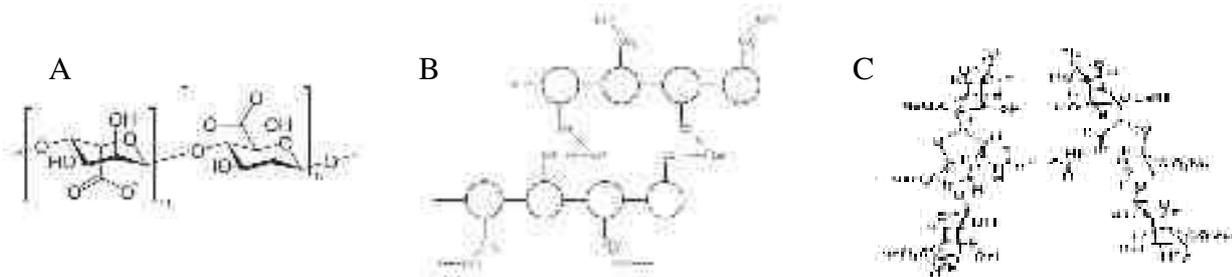


Figure 30. Différentes structures de l'alginate : état natif (A), réticulation ionique avec le calcium (B) et réticulation covalente avec l'acide adipique dihydrazide (C).

Il y a néanmoins quelques limitations quant à l'utilisation de l'alginate comme biomatériau. En se dégradant, il libère des ions divalents dans le milieu environnant et ce processus est difficilement contrôlable (Lee et Mooney 2001). Ce problème peut être contourné en préférant une réticulation covalente avec l'acide adipique dihydrazide par exemple (figure 30C) au lieu d'une réticulation ionique, qui permet de contrôler plus précisément les propriétés mécaniques et de gonflement des gels (Lee *et al.* 2000). Un autre problème avec les gels d'alginate est l'absence d'interaction avec les cellules. En effet l'alginate ne permet pas l'absorption de protéines et donc la plupart du temps il est non adhérent pour les cellules. Ce problème a cependant pu être résolu en greffant chimiquement des peptides RGD (Huebsch *et al.* 2010)

- L'acide hyaluronique

Comme nous l'avons déjà expliqué précédemment, l'acide hyaluronique est l'un des principaux glycosaminoglycanes de la MEC (figure 23). Il a la capacité d'absorber de grandes quantités d'eau et donc de former des hydrogels par liaison hydrogène lorsque sa concentration est suffisante en solution aqueuse. Comparé au collagène, l'acide hyaluronique forme des hydrogels non fibrillaires. De plus l'enchevêtrement des chaînes d'acide

hyaluronique de haut poids moléculaire pendant la formation de l'hydrogel rend le gel stable en ralentissant fortement sa dissolution (Patterson *et al.* 2010). En utilisant de l'acide hyaluronique modifié chimiquement, il est possible de réticuler le gel de manière covalente en utilisant des dérivés hydrazide par exemple (Vercruyssen *et al.* 1997; Kadi *et al.* 2009). Les hydrogels d'acide hyaluronique ont été utilisés dans de nombreux domaines comme la réparation de cartilage (Tognana *et al.* 2007), la peau artificielle (Choi *et al.* 1999) et les implants faciaux intradermiques (Duranti *et al.* 1998). De plus comme l'acide hyaluronique interagit avec des récepteurs à la surface des cellules (CD44, RHAMM), il est particulièrement adapté pour l'ingénierie tissulaire et son activité biologique peut même être augmentée en incorporant d'autres biomolécules. Par exemple des gels d'acide hyaluronique ont été fonctionnalisés avec des peptides dérivés de la fibronectine (RGD) pour améliorer la prolifération des fibroblastes (Park *et al.* 2003). Cependant ces gels ont de faibles propriétés mécaniques ce qui limite leurs utilisations.

- Le chitosane

Le chitosane est préparé par N-déacétylation de la chitine (issue principalement des carapaces de crustacés, de limules ou des cuticules externes des insectes) et il contient généralement moins de 40% de résidus N-acétyl-D-glucosamine (unité acétylée) (figure 31).

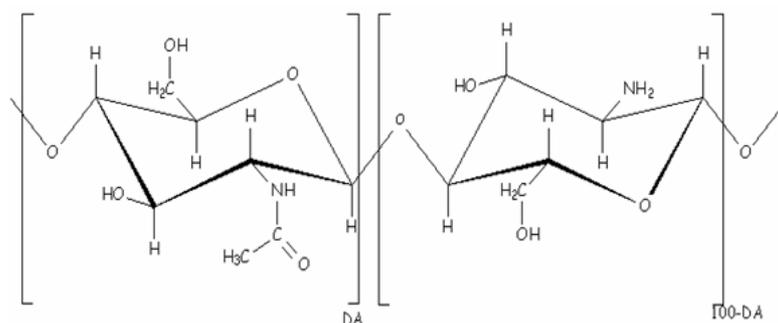


Figure 31. Structure du chitosane qui est en réalité un copolymère avec d'une part (à gauche) l'unité acétylée (structure chitine) et d'autre part (à droite) l'unité déacétylée.

Les biomatériaux à base de chitosane possèdent des propriétés intéressantes pour l'ingénierie tissulaire car ils peuvent former des structures poreuses interconnectées. Ainsi de nombreuses cellules peuvent êtreensemencées et peuvent migrer à l'intérieur du matériau

(Kim *et al.* 2008). De plus le chitosane est biocompatible, peu onéreux, il a une structure proche des glycosaminoglycanes et il est dégradé enzymatiquement par des enzymes comme la chitosanase et le lysozyme (Singh et Ray 2000). Le chitosane présente également une activité antimicrobienne ce qui est un avantage pour les applications en ingénierie biomédicale. Des hydrogels de chitosane peuvent être formés par réticulation ionique ou chimique avec le glutaraldéhyde par exemple (Mirzaei B *et al.* 2013). Cependant un des désavantages de ce matériau est sa solubilité uniquement en condition acide et donc son insolubilité à pH physiologique et dans de nombreux solvants organiques à cause de ses amines et de son importante fraction cristalline.

- Les Matrigels

Les Matrigels sont des mélanges gélatineux de protéines commercialisés et extraits de cellules tumorales de souris qui sont capables de former des gels à 37°C. Comme ces gels sont préparés directement à partir de la MEC des cellules tumorales, ils contiennent les protéines de la MEC (collagène, laminine, fibronectine) et les facteurs de croissance sécrétés par ces cellules (voir tableau 2).

Protéine	Pourcentage (%)	Facteur de croissance	Concentration
Laminine	61	bFGF	0-0.1 pg.mL ⁻¹
Collagène IV	30	EGF	<0.5 ng/mL ⁻¹
Entactine	7	IGF-1	5 ng.mL ⁻¹
Sulfate d'héparine (principalement perlécane)	<i>non déterminé</i>	PDGF	<5 pg.mL ⁻¹
		NGF	<0.2 ng.mL ⁻¹
		TGF-β	1.7 ng.mL ⁻¹

Tableau 2. Composition d'un gel Matrigel (d'après Kohen *et al.* 2009)

De plus ce sont des matériaux qui possèdent une des meilleures biocompatibilités. Ils permettent donc de créer un matériau qui mime véritablement la matrice extracellulaire. Les Matrigels vont favoriser la croissance cellulaire en 3D et influencent la morphologie des cellules, leur prolifération, leur différenciation et l'expression de certains gènes (Kleinman et Martin 2005; Price *et al.* 2012). Les Matrigels sont utilisés pour étudier les cancers car ils favorisent la croissance des cellules tumorales *in vivo* (Fridman *et al.* 1990).

Cependant ces matériaux ont plusieurs désavantages. Tout d'abord, la composition des Matrigels n'est pas bien contrôlée car elle dépend directement du comportement des cellules qui auront sécrété la matrice utilisée. Une grande variabilité est possible entre les différents lots issus de différentes cultures cellulaires. De plus, les Matrigels possèdent des propriétés mécaniques assez faibles avec un module de Young de l'ordre de 400 Pa. Enfin l'origine animale des Matrigels limite également leur utilisation.

1.4. Contrôle du microenvironnement cellulaire en ingénierie tissulaire

1.4.1. Contrôle du microenvironnement cellulaire par un système de libération de molécules bioactives

Le microenvironnement cellulaire peut être contrôlé *in vitro* via l'utilisation de systèmes de libération de molécules bioactives comme les hormones, les médicaments, les cytokines ou les facteurs de croissance. Comme nous l'avons expliqué précédemment, les facteurs de croissance peuvent réguler la prolifération, la migration et la différenciation des cellules qui sont les paramètres cruciaux pour des phénomènes comme l'angiogenèse (croissance de nouveaux vaisseaux sanguins) ou l'ostéogenèse (croissance de tissus osseux) (Lee *et al.* 2011). Des études récentes se sont focalisées sur l'incorporation de molécules de signalisation comme les facteurs de croissance ou les cytokines dans des biomatériaux (Ito 2008). A titre d'exemple, voici quelques effets constatés suite à l'incorporation de molécules de signalisation dans les biomatériaux (Mieszawska et Kaplan 2010) (figure 32) :

- vascularisation, formation de nouveaux vaisseaux sanguins, suite à l'action du FGF-2 (fibroblast growth factor-2);
- régénération de neurones, suite à l'action du NGF (nerve growth factor);
- maintien du phénotype des cellules souches, suite à l'immobilisation de cytokines sur un film de copolymère d'anhydride maléique;
- augmentation de l'attachement cellulaire et de l'étalement des cellules souches mésenchymateuses, suite à l'incorporation de l'EGF (epidermal growth factor) dans le matériau).

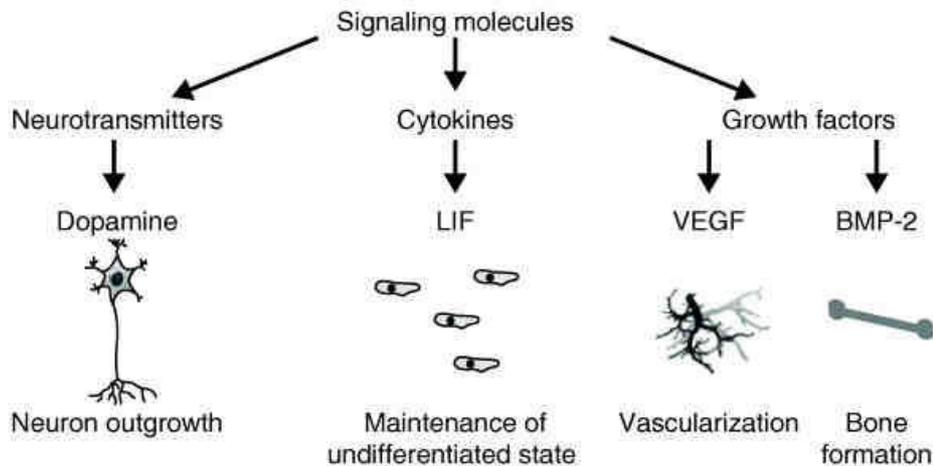


Figure 32. Exemple de molécules de signalisation modulant le comportement des cellules dans un biomatériau (Mieszawska et Kaplan 2010).

Cependant ces molécules ont une grande instabilité, un temps de demi-vie très court (grande instabilité et demi-vie courte synonymes? éviter redite) et elles peuvent être dégradées par les enzymes ou désactivées pendant leur circulation dans les fluides physiologiques (Konturek *et al.* 1990; Chen *et al.* 2009). De plus les facteurs de croissance et les autres molécules bioactives doivent cibler le site spécifique à régénérer. L'administration systémique *in vivo* de molécules bioactives n'est donc pas le meilleur moyen pour contrôler leur concentration dans la zone ciblée. En effet, l'administration systémique (par voie générale) agit sur tout l'organisme et pas spécifiquement sur la zone ciblée (Bai *et al.* 2013). Pour surmonter ces problèmes, il était nécessaire de développer des "scaffolds" d'ingénierie tissulaire implanté sur le site concerné et capables de libérer localement des molécules bioactives. Pour illustrer cela, il a été démontré que pour la formation de vaisseaux sanguins, un bolus d'injection de VEGF (injection rapide et brève dans un vaisseau sanguin) est moins efficace que la libération prolongée et contrôlée à partir d'un hydrogel biodégradable d'alginate (figure 33). Dans le cas de l'injection d'un bolus, le VEGF n'était pas localisé dans la zone d'intérêt et il restait seulement 72 heures dans l'organisme. Dans le cas de la libération avec un hydrogel d'alginate, injecté spécifiquement sur la zone ciblée, 95% du facteur de croissance se trouvait sur le site ischémié (amélioration de la biodistribution); il restait sur le site plus de 15 jours et sa bioactivité était supérieure. En effet, cette bioactivité était

maintenue en raison de la présence du gel d'alginate agissant comme "protecteur" et limitant la dénaturation du facteur de croissance (Silva et Mooney 2007).

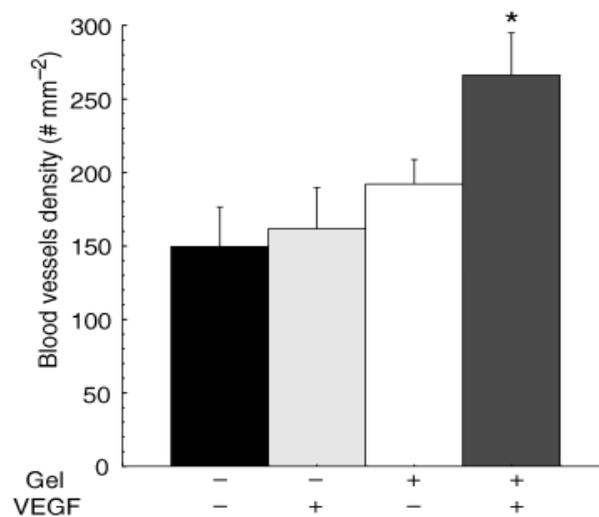


Figure 33. Quantification de la densité de vaisseaux sanguins sur une souris souffrant d'ischémie des membres postérieurs après 6 semaines sans injection de gel d'alginate ou de VEGF (-/-), avec bolus d'injection de VEGF (-/+), avec injection du gel d'alginate sans VEGF (+/-) ou avec libération de VEGF à partir du gel d'alginate (+/+) (Silva et Mooney 2007).

La concentration locale en molécules bioactives peut être contrôlée en utilisant les interactions entre la MEC et les facteurs de croissance. En effet, la MEC contient de nombreuses protéines qui sont capables de se lier aux facteurs de croissance. La localisation des facteurs de croissance au sein de la MEC ainsi que leur signalisation contribuent à l'établissement d'un gradient stable pour les morphogènes solubles et diffusibles. Les morphogènes sont des protéines diffusibles en concentration graduelle qui informe les cellules sur leur position dans l'embryon et qui détermine la différenciation des tissus embryonnaires. Les gradients de morphogènes vont donc jouer un rôle primordial dans la structuration des processus de développement (Kim *et al.* 2011). La liaison entre les facteurs de croissance et la MEC se fait principalement par le biais des GAGs. En utilisant les interactions entre la MEC et les facteurs de croissance, l'expression de certains gènes va être régulée (Rosso *et al.* 2004).

L'incorporation de molécules bioactives dans les "scaffolds" peut être réalisée de deux manières différentes : soit par immobilisation covalente soit par immobilisation non-covalente (Langer 1990; Mitragotri et Lahann 2009; Chen *et al.* 2010). L'approche covalente est basée sur le greffage covalent de la molécule sur le "scaffold" par une réaction chimique. On peut

prendre comme exemple le greffage du VEGF sur un scaffold poreux de collagène en utilisant l'hydrochlorure de N,N-(3-diméthylaminopropyl)-N-carbodiimide (EDC) (Shen *et al.* 2008). La chimie des carbodiimides est utilisée dans ce cas pour coupler les groupes carboxyles du collagène aux groupements amines du VEGF. L'approche non covalente repose sur l'utilisation des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogène entre la molécule et le "scaffold" ou l'encapsulation physique de ce facteur de croissance. Dans le cas de l'incorporation de molécules par interaction électrostatique, des matériaux chargés sont nécessaires comme les multicouches de polyélectrolytes ou encore les hydrogels de gélatine. De nombreux systèmes ont également été développés en fonctionnalisant des matériaux avec des GAGs comme l'héparine ou l'héparane sulfate car il est connu que ces molécules possèdent des domaines d'interactions spécifiques avec des facteurs de croissance tels que le VEGF, le FGF ou encore les BMPs. L'héparine ou l'héparane sulfate permettent donc d'immobiliser le facteur de croissance sur le matériau ou encore de retarder sa libération (Cabanas-Danés *et al.* 2014). Dans ces différentes approches, la libération des molécules bioactives pourra être déclenchée de trois manières différentes :

- par dégradation du "scaffold";
- par diffusion des molécules à travers le matériau;
- par clivage (enzymatique ou hydrolytique) de la liaison covalente entre la molécule et le matériau.

Comme nous l'avons expliqué précédemment, les matériaux utilisés pour développer des vecteurs peuvent être divisés en deux catégories : les matériaux à base de composants naturels comme le collagène, l'alginate, la gélatine, la poly (L-lysine) ou le chitosane et les matériaux à base de composants synthétiques comme le PLLA, le PEG ou la poly (caprolactone) (PCL). Pour être des vecteurs efficaces, ces matériaux doivent être biocompatibles, biodégradables et doivent libérer la molécule bioactive avec un contrôle spatio-temporel (Zhang et Suggs 2007). La libération de facteurs de croissance à partir de "scaffolds" est principalement gouvernée par deux mécanismes : la diffusion à travers le matériau et la vitesse de dégradation du matériau (Lee *et al.* 2000; Lee *et al.* 2011). Le profil de libération de molécules bioactives est un paramètre clé pour contrôler le microenvironnement cellulaire. En fonction des applications comme la promotion de l'angiogenèse, la différenciation des cellules souches ou le traitement de certaines pathologies, les molécules ont besoin d'être libérées à un moment et à une vitesse spécifique.

Dans le cas de matériaux biodégradables, la libération peut être modulée en agissant soit sur le profil de dégradation du matériau soit sur la diffusion de la molécule. La vitesse de dégradation du matériau et de libération de la molécule peut être modulée en réticulant le matériau par exemple pour stabiliser sa structure.

La gélatine qui est une forme de collagène dénaturé, est couramment utilisée en ingénierie tissulaire pour ses propriétés de biomimétisme de la MEC (Vrana *et al.* 2010). De plus la gélatine est biodégradable et est utilisée dans le domaine biomédical depuis de nombreuses années. La gélatine est aussi très utile pour l'incorporation de molécules bioactives car elle peut être chargée positivement (gélatine basique) ou négativement (gélatine acide) et peut donc se complexer avec des molécules chargées positivement et négativement (Tabata et Ikada 1998; Yamamoto *et al.* 2001). Les hydrogels de gélatine sont systématiquement réticulés avec différents agents de réticulation comme la génipine, la transglutaminase ou l'EDC/NHS (hydrochlorure de N,N-(3-diméthylaminopropyl)-N-carbodiimide /N-hydroxysulfosuccinimide) car la structure de gel physique de la gélatine est trop faible et la dégradation est trop rapide (Bigi *et al.* 2002; McDermott *et al.* 2004; Chang *et al.* 2007). Nous reviendrons plus en détail sur la gélatine ultérieurement dans ce manuscrit. Pour les autres matériaux comme les hydrogels d'alginate par exemple, la vitesse de dégradation peut être contrôlée en oxydant partiellement les chaînes de polymères avec du periodate de sodium pour rendre l'hydrogel dégradé par hydrolyse en milieu aqueux. En effet, les hydrogels d'alginate se dégradent lentement et de manière peu contrôlée en libérant des chaînes de haut poids moléculaire qui ne peuvent pas être éliminées par l'organisme. Il est donc nécessaire de les modifier pour pouvoir contrôler cette dégradation (Bouhadir *et al.* 2001) (figure 34). Cette stratégie a été utilisée récemment pour créer un vecteur capable de libérer du VEGF (Silva et Mooney 2007).

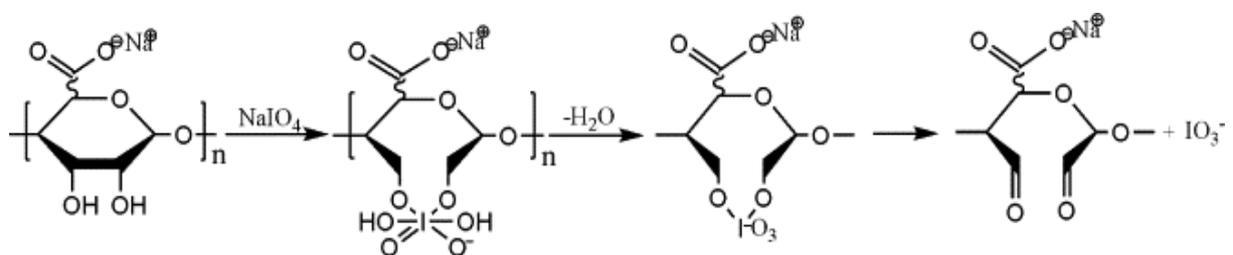


Figure 34. Réaction d'oxydation de l'alginate par le periodate de sodium (NaIO₄) qui clive la liaison C-C du groupe diol et rend l'alginate dégradé par hydrolyse en milieu aqueux (Wang *et al.* 2010).

Les hydrogels synthétiques peuvent aussi être utilisés pour encapsuler et libérer des molécules bioactives. Des hydrogels de polyesters hyperbranchés capables d'encapsuler des molécules hydrophobes comme les facteurs de croissance ou des hormones spécifiques comme la dexaméthasone ont été développés. Ces hydrogels sont photo-réticulables grâce à des groupements méthacrylate ajoutés sur les molécules. Il est habituellement assez difficile d'encapsuler des molécules hydrophobes dans des hydrogels car les hydrogels conventionnels nécessitent souvent une réticulation des chaînes linéaires hydrophiles du polymère. Dans ce cas, une libération prolongée et contrôlée sur huit jours de la dexaméthasone a été réalisée principalement grâce à l'hydrolyse des groupements ester (Zhang *et al.* 2013).

Les multicouches de polyélectrolytes (LbL, de l'anglais "layer-by-layer") sont aussi utilisées comme vecteurs pour libérer des molécules bioactives car ce sont des films faciles à produire, ils peuvent agir comme réservoirs pour les biomolécules (Vodouhê *et al.* 2006) et leurs propriétés comme la porosité, l'épaisseur, la densité de charge sont aisément ajustables. Par conséquent, ils peuvent être facilement utilisés comme revêtements sur les implants (Macdonald *et al.* 2011). Un des principaux problèmes posés par ces films en vue des applications de libération est la libération trop rapide des molécules contenues dans les films. Pour résoudre ce problème, un système à double confinement a été développé récemment pour réaliser la libération sur le long terme du VEGF. Cette stratégie est basée sur le double contrôle de la libération en encapsulant le VEGF dans des particules de PCL qui sont elles-mêmes incorporées dans un film multicouche de polyélectrolytes. Deux mécanismes pour la libération du VEGF ont été proposés :

1. les particules de PCL contenant le VEGF vont être hydrolysées et ensuite le VEGF va diffuser dans le film avant d'être libéré dans le surnageant;
2. les particules de PCL contenant le VEGF vont diffuser hors du film avant d'être hydrolysées pour libérer le VEGF.

La technique couche par couche peut aussi être utilisée pour fabriquer des particules contenant un principe actif (Johnston *et al.* 2006). En utilisant cette technique, un système "stimuli-répondant" pour la libération de médicaments a été élaboré. Ce système est basé sur l'absorption d'une molécule bioactive (l'ibuprofène) sur des sphères mésoporeuses de silice suivi du dépôt d'une couche barrière à base de multicouches de polyélectrolytes (PAH/PSS). A pH ou force ionique physiologique, la couche PAH/PSS agit comme une barrière car elle ne permet pas la diffusion de l'agent bioactif. La libération de l'anti-inflammatoire a été ensuite

déclenchée par changement de pH (pH 1.4) ou par changement de la force ionique (changement de la concentration de NaCl dans le surnageant) (figure 35). Ce vecteur est donc particulièrement adapté pour la libération prolongée et contrôlée de molécules (Zhu *et al.* 2005).

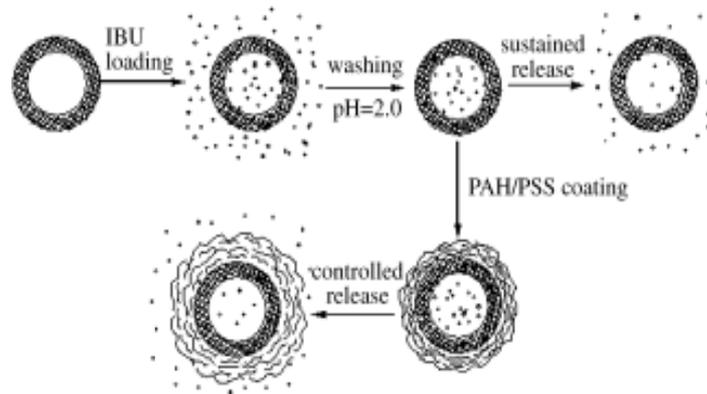


Figure 35. Schéma illustrant les deux systèmes permettant la libération prolongée mais sans contrôle (sustained) ou une libération contrôlée (controlled) avec la couche barrière PAH/PSS qui permet la libération de l'ibuprofène à des pH acides (Zhu *et al.* 2005).

Pour d'autres applications, la libération de plusieurs molécules avec différentes vitesses de libération est nécessaire. Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire par exemple, l'angiogenèse et l'ostéogenèse sont régulées par l'action combinée de plusieurs facteurs de croissance et chacun d'entre eux a besoin d'être libéré à un moment précis et pour une durée très précise. Mooney *et al.* ont élaboré un "scaffold" à base de PLGA permettant la libération de deux facteurs de croissance nécessaires pour la formation de vaisseaux : le VEGF et le PDGF (Platelet-derived growth factor) (Richardson *et al.* 2001). Des particules de PLGA avec du VEGF lyophilisé et des microsphères de PLGA contenant du PDGF encapsulé ont été utilisés pour cette étude. Les libérations du VEGF et du PDGF ont déjà été étudiés tout d'abord séparément en fabriquant un "scaffold" avec les particules de PLGA contenant le VEGF d'une part et en fabriquant un "scaffold" avec les microsphères de PLGA contenant le PDGF pour le PDGF d'autre part. Ensuite un "scaffold" poreux de PLGA a été réalisé pour étudier la libération simultanée des deux facteurs de croissance en mélangeant les microsphères de PLGA contenant le PDGF avec celles contenant le VEGF. Les résultats ont montré que ces facteurs de croissance n'ont pas les mêmes profils de libération. Le VEGF est libéré à 1.7 pmol/jour les sept premiers jours ce qui est principalement dû à la diffusion du VEGF hors du "scaffold". Pour le PDGF, le "scaffold" en libère entre 0.10 et 4.7 pmol/jour suite à la dégradation des particules de PLGA et en utilisant différentes formulations. Cette

étude a pu montrer que la libération simultanée du VEGF et du PDGF était nécessaire pour l'angiogenèse et elle induit la formation de vaisseaux sanguins plus larges (figure 36).

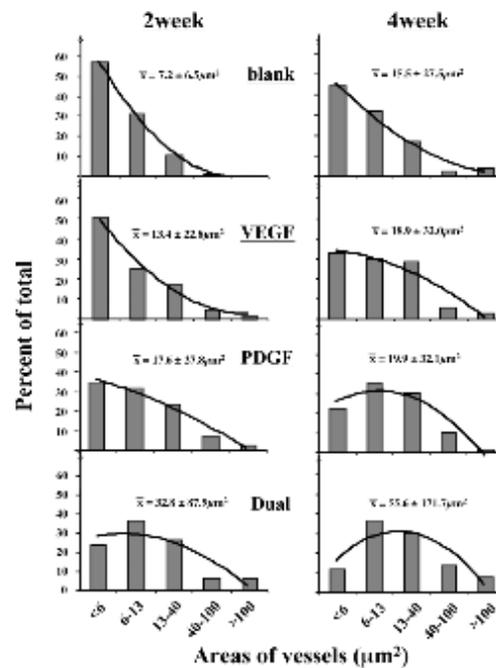


Figure 36. Aire de sections transverses de vaisseaux sanguins après deux semaines et quatre semaines de libération de VEGF et/ou de PDGF (Richardson *et al.* 2001).

Dans le domaine de la thérapie parodontale régénérative, un hydrogel poreux interconnecté à base d'un mélange de Dex-GMA (dextrane méthacrylate de glycidyle) et de gélatine a été développé pour la libération simultanée de deux facteurs de croissance : BMP-2 (Bone morphogenetic protein-2, chargée négativement en conditions physiologiques) et IGF-1 (Insulin growth factor-1, chargé positivement en conditions physiologiques). Les facteurs de croissance ont été encapsulés dans des microparticules de Dex-GMA/gélatine. La gélatine basique (chargé positivement) a été utilisée pour encapsuler la BMP-2 et la gélatine acide (chargé négativement) pour encapsuler IGF-1. Comme le Dex-GMA est dégradé enzymatiquement mais pas par hydrolyse, d'autres microparticules de Dex-GMA ont été préparées avec de la gélatine neutre pour encapsuler la dextranase. Ces particules serviront à déclencher la libération des facteurs de croissance par dégradation enzymatique des microparticules de Dex-GMA. Toutes ces particules ont été mélangées ensemble en présence de PEG et réticulées par irradiation UV pour fabriquer le "scaffold" poreux interconnecté (figure 37). Le mécanisme de libération est basé sur la dégradation enzymatique des microparticules suivie de la dégradation du "scaffold". Ce système permet la libération prolongée des facteurs de croissance sur une durée de 20 jours (Chen *et al.* 2009).

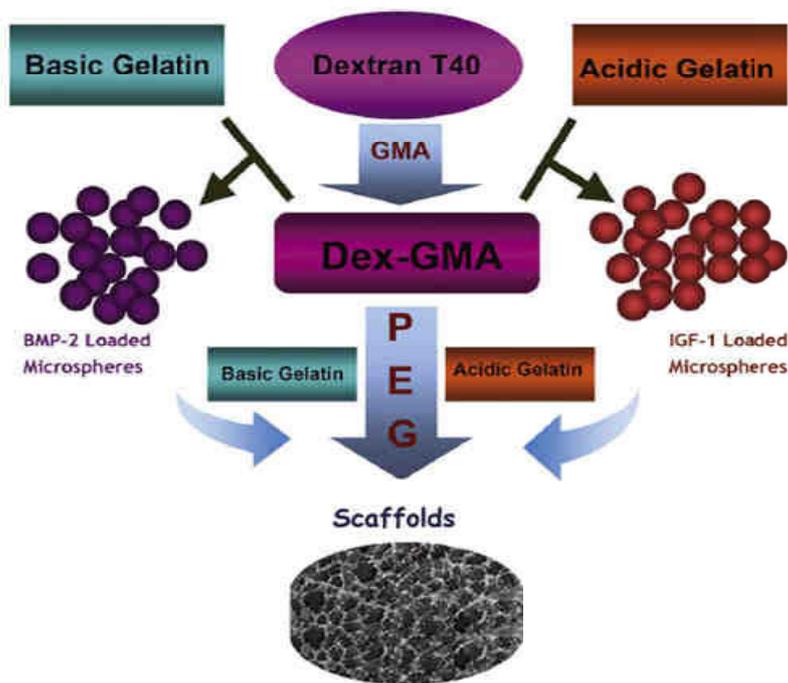


Figure 37. Illustration schématique représentant les étapes pour la fabrication du "scaffold" poreux interconnecté contenant les microparticules chargées avec des facteurs de croissance (Chen *et al.* 2009).

D'autres maladies comme la parodontite (inflammation des tissus de soutien de l'organe dentaire) nécessitent la libération multiple d'antibactériens, d'anti-inflammatoires, d'agents antiresorptifs osseux et d'agents ostéogéniques. Tous ces agents doivent être libérés dans un ordre spécifique pour être efficaces. Pour satisfaire ces exigences, un dispositif multicouche a été conçu (Sundararaj *et al.* 2013). Cette structure stratifiée a été réalisée avec l'association d'acétophtalate de cellulose (CAP), qui est érodable, et de Pluronic F-127 (P). L'assemblage de ces deux composants sera dénotée CAPP. Pluronic est le nom commercial des poloxamères qui sont des copolymères non-ioniques à trois blocs possédant un bloc central hydrophobe de polypropylène glycol et deux blocs externes hydrophiles de polyéthylène glycol (figure 38).

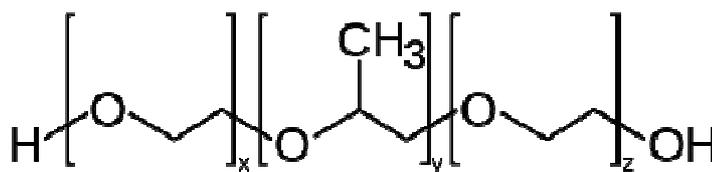


Figure 38. Structure des poloxamères avec le polypropylène glycol en bloc central et les deux PEG sur les blocs externes.

Les différents agents thérapeutiques ont été incorporés dans un ordre spécifique dans chaque strate en les mélangeant avec les solutions de polymères. Chaque couche est séparée des autres par une ou deux couches vierges (sans molécule bioactive) de CAPP pour ralentir l'érosion de la structure et retarder la libération des molécules (figure 39). Ce système est capable de libérer quatre agents thérapeutiques différents dans une séquence temporelle très précise pendant une centaine d'heures en fonction des conditions utilisées. Cette libération résulte de la seule érosion unidirectionnelle de la structure.

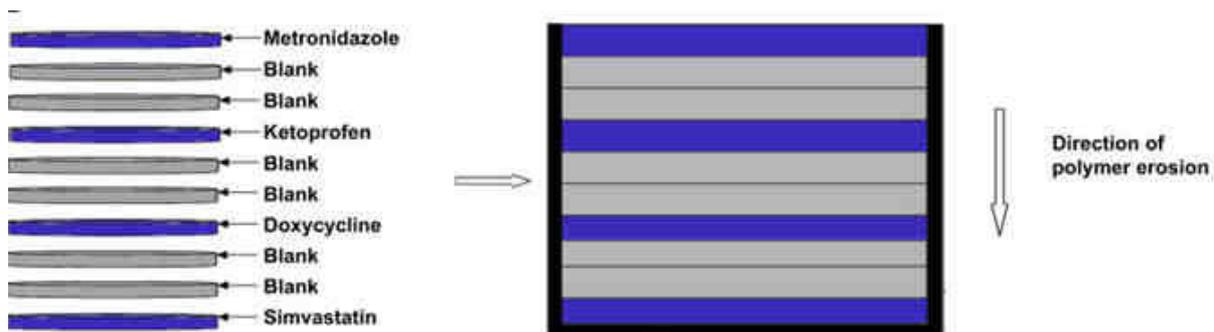


Figure 39. Représentation schématique d'une structure multicouche CAPP avec quatre couches contenant respectivement l'antibiotique pour réduire les infections bactériennes (metronidazole), l'anti inflammatoire (kétoprofène), l'agent antiresorptif (doxycycline) et l'agent ostéogénique (Simvastatine). Chaque couche active est séparée des autres par deux couches vierges (Sundararaj *et al.* 2013).

1.4.2. Contrôle du microenvironnement par changement de la rigidité du substrat

Depuis quelques années, les scientifiques s'intéressent aux propriétés mécaniques de la MEC et à ses implications dans la modulation du comportement des cellules. En effet, les propriétés mécaniques de la MEC régulent de nombreuses fonctions cellulaires comme l'adhésion, l'étalement, la prolifération, la migration et la différenciation des cellules souches (Discher *et al.* 2005). Des matériaux à base de composants naturels de la MEC ont été utilisés pour étudier l'implication de la rigidité du substrat dans le développement des cellules. Cependant, avec ces matériaux, il est très difficile d'isoler l'influence des paramètres mécaniques des autres paramètres structuraux et c'est pourquoi les études se sont principalement focalisées sur des hydrogels synthétiques. En effet, les propriétés physiques de ces hydrogels sont plus facilement contrôlables. De plus, contrairement aux hydrogels

naturels fibreux comme les gels de collagène, les hydrogels synthétiques ne sont généralement pas affectés par la vitesse ou la magnitude de la déformation et peuvent donc être considérés comme des solides élastiques linéaires et définis du point de vue mécanique par un unique module de Young (Trappmann et Chen 2013).

Dans cette partie, nous traiterons tout d'abord de l'influence de la rigidité du substrat sur les phénomènes d'étalement, de migration et de prolifération cellulaire. Ensuite nous nous intéresserons à l'influence de la rigidité du substrat sur la différenciation cellulaire.

1.4.2.1. Etalement, migration et prolifération cellulaire

Les premières études concernant l'influence de la rigidité du substrat sur l'étalement, la migration et la prolifération cellulaire ont été menées avec des gels de polyacrylamide fonctionnalisés avec du collagène. Le collagène a été utilisé comme ligand pour l'adhésion des cellules. La rigidité du substrat a pu être contrôlée en changeant les concentrations relatives en acrylamide (le monomère) et en bis-acrylamide (l'agent réticulant) durant la formation du gel. Une des premières études a été menée par Pelham et Wang en 1997 avec des fibroblastes et des cellules épithéliales (Pelham et Wang 1997). Cette étude a pu montrer que la rigidité des gels de polyacrylamide (PA), caractérisée par leur module de Young, influençait la morphologie (les cellules s'étaient moins sur les substrats les plus mous) et la migration des cellules (les cellules migrent à une vitesse plus importante sur les substrats les plus mous). La mobilité des cellules est un paramètre crucial dans de nombreux processus physiologiques comme la morphogenèse, la cicatrisation ou la réponse immunitaire et c'est pourquoi elle a été étudiée avec attention. Une autre étude concernant la migration cellulaire a été menée en 2000 (Lo *et al.* 2000). Elle a montré que les cellules fibroblastiques migraient uniquement vers les zones de rigidité supérieure. D'autres travaux en 2000 ont pu mettre en évidence que la prolifération cellulaire et l'apoptose étaient influencées par la rigidité du substrat (Wang *et al.* 2000). Ces auteurs ont montré que la prolifération des fibroblastes était deux fois plus importante sur des gels de PA de 14 kPa comparée à celle sur des gels de 4.7 kPa après 24 heures de culture et quatre fois plus importante après 48 heures de culture (figure 40). Ces auteurs ont également constaté qu'il y avait deux fois moins de cellules en apoptose après 24 heures de culture sur les gels les plus rigides.

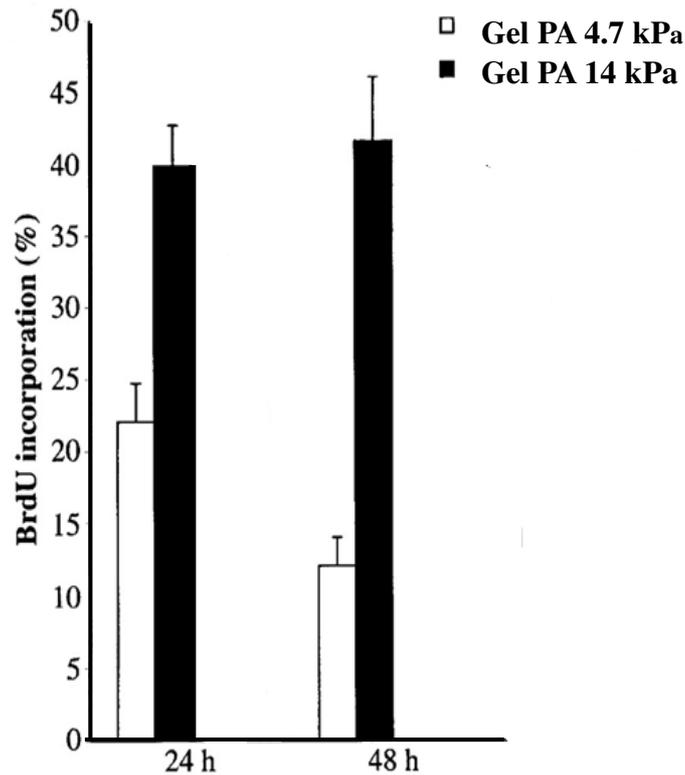


Figure 40. Proportion de cellules 3T3 synthétisant de l'ADN (mesure de la prolifération par dosage de l'ADN après marquage avec le 5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU) après 24 heures et 48 heures de culture sur des gels de polyacrylamide de rigidités différentes (Wang *et al.* 2000).

D'autres substrats ont également été utilisés pour étudier l'influence de la rigidité du matériau sur le comportement cellulaire et plus particulièrement l'étalement cellulaire. On peut prendre comme exemples le PDMS (poly(diméthylsiloxane)) (Wang *et al.* 2012), les films multicouches de polyélectrolytes réticulés (Richert *et al.* 2004) ou le PEG (polyéthylène glycol) (Peyton *et al.* 2006). Tous ces matériaux ont été utilisés après fonctionnalisation avec des molécules de la MEC comme le collagène ou la fibronectine pour permettre l'adhésion des cellules. Les études menées avec ces différents substrats et avec différents types cellulaires ont pu mettre en évidence que l'étalement cellulaire augmentait avec la rigidité du matériau (Nemir et West 2010).

L'utilisation des hydrogels de PEG est une bonne alternative au polyacrylamide car il n'est pas cytotoxique contrairement au monomère acrylamide. Cependant le polyacrylamide reste toujours très utilisé car il possède une excellente transparence et sa rigidité est facilement modulable par modification de la concentration en monomère acrylamide ou en réticulant bis-acrylamide.

1.4.2.2. Différenciation cellulaire

Une des études pionnières montrant l'influence de la rigidité du substrat sur la différenciation cellulaire a été celle d'Engler et al. en 2006. Ces auteurs ont montré qu'en modulant la rigidité du substrat sur lequel étaient cultivées les cellules souches mésenchymateuses, la différenciation en différents types cellulaires était possible (Engler *et al.* 2006). Ces auteurs ont utilisé les mêmes gels de polyacrylamide fonctionnalisés avec du collagène que ceux utilisés dans l'étude de Pelham et al. Les cellules souches ont été cultivées sur ces gels de polyacrylamide de rigidité variant de 0.1 à 40 kPa. Après 4 semaines de culture et sans ajout de facteurs solubles de différenciation, ils ont pu constater que les cellules souches s'étaient différenciées en neurones sur les gels de 0.1 à 1 kPa, en myoblastes (cellules de tissus musculaires) sur les gels de 8 à 17 kPa et en ostéoblastes sur les gels de 25 à 40 kPa (figure 41). En effet, après les 4 semaines de culture, les cellules exprimaient les marqueurs de différenciation neuronale sur les gels les plus mous (β 3 tubuline), les marqueurs myoblastiques sur les gels intermédiaires (MyoD1) et les marqueurs ostéoblastiques sur les gels les plus durs (CBF α 1). Dans cette étude, les gels de polyacrylamide ont permis de recréer la gamme de rigidité des différents tissus de l'organisme : les gels les plus mous ont un module de Young comparable à celui des tissus du cerveau, les gels de rigidité intermédiaire ont un module comparable à celui des tissus musculaires et les gels les plus durs un module comparable à celui des tissus osseux.

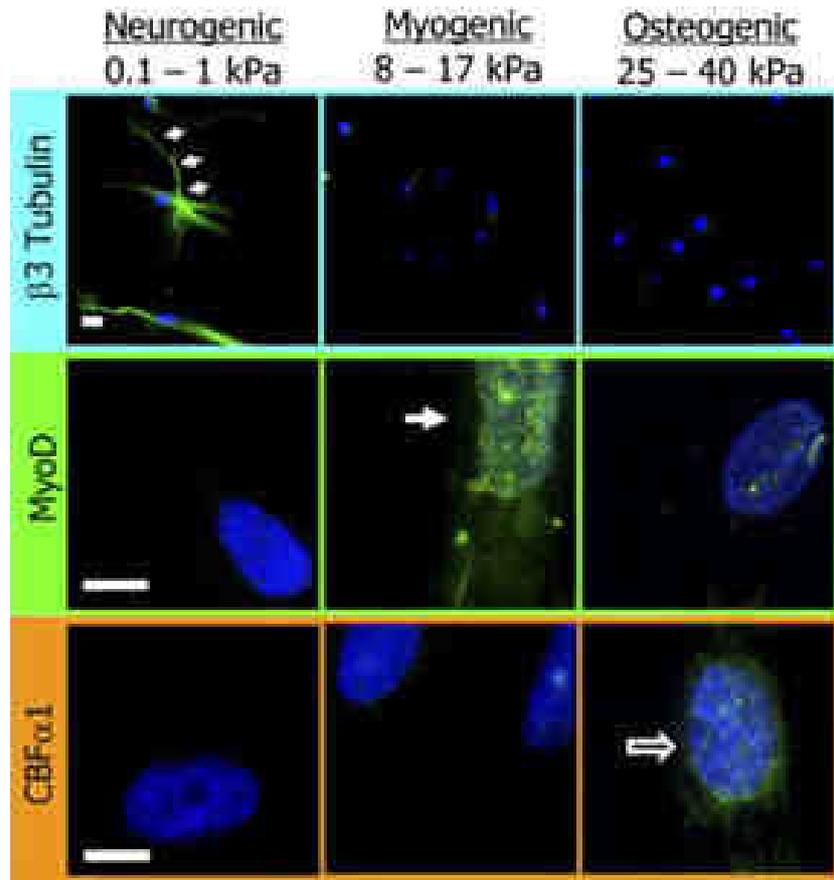


Figure 41. Différenciation des cellules souches mésenchymateuses en divers types cellulaires : neurones, myoblastes et ostéoblastes en fonction de la rigidité des gels de polyacrylamide après 4 semaines de culture. La protéine $\beta 3$ tubuline du cytosquelette des cellules neuronales est exprimée sur les gels les plus mous. Le facteur de transcription myogénique MyOD est situé dans le noyau sur les gels intermédiaires. Le facteur de transcription ostéogénique CBF $\alpha 1$ est situé dans le noyau sur les gels plus rigides (Engler *et al.* 2006).

1.5. Films à base de gélatine

Dans le cadre de nos travaux, nous avons décidé de mettre en œuvre un matériau à base de gélatine. La gélatine est utilisée depuis de nombreuses années dans les secteurs médicaux, pharmaceutiques et alimentaires. En effet, il s'agit d'un composé biocompatible, biodégradable et issu de la dénaturation du collagène (composant de la MEC). La gélatine représente donc un excellent candidat pour élaborer des matériaux mimant la MEC. De plus un des autres avantages de ce composant est qu'il peut être chargé positivement (gélatine type A) ou négativement (gélatine type B) à pH physiologique en fonction de la méthode utilisée pour dénaturer le collagène (Yamamoto *et al.* 2001). Cette propriété est très intéressante pour des applications de libération de molécules puisqu'en fonction de la molécule qu'on veut utiliser il suffira de choisir le type de gélatine le plus approprié. Par exemple comme la plupart des facteurs de croissance sont des protéines basiques (chargées positivement à pH physiologique), il sera plus intéressant d'utiliser une gélatine chargée négativement avec laquelle ils peuvent se complexer pour réaliser un scaffold destiné à l'ingénierie tissulaire.

Dans cette partie nous parlerons des différentes méthodes d'obtention de la gélatine, de sa structure, de ses propriétés et de ses différentes applications en tant que biomatériau.

1.5.1. Méthodes d'obtention de la gélatine

La gélatine est issue de la dénaturation du collagène, la protéine la plus abondante du règne animal. Pour expliquer le mécanisme de formation de la gélatine, il est important de revenir sur la structure du collagène. Le collagène est formée de trois chaînes polypeptidiques principalement composées d'un triplet d'acides aminés (glycine-X-Y)_n avec X et Y qui sont le plus souvent la proline et l'hydroxyproline. Chaque chaîne polypeptidique est structurée sous forme d'une hélice gauche. Ces trois hélices gauches s'assemblent pour donner la structure en triple hélice droite du collagène. Cette triple hélice est stabilisée principalement par des liaisons hydrogène (figure 42).

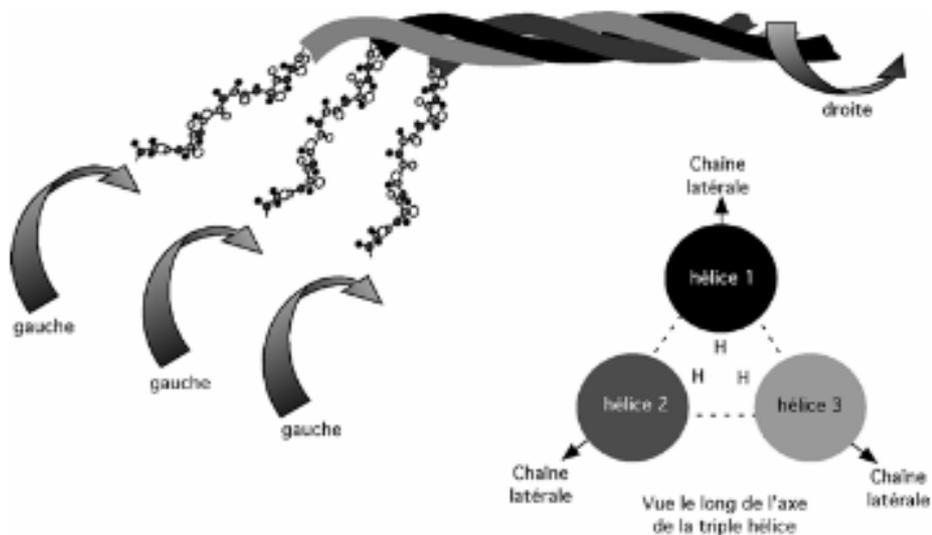


Figure 42. Organisation structurale de la triple hélice de collagène (Molecular Cell Biology 2nd Edition, 1990)

La gélatine est obtenue par destruction de la structure en triple hélice du collagène. Ce processus implique principalement la destruction complète de la structure secondaire du collagène et dans de nombreux cas une destruction partielle des structures primaire et tertiaire (Veis et Cohen 1960; Veis 1964). En se dénaturant, le collagène va laisser place à des chaînes dissociées adoptant une conformation en pelote aléatoire qui donnera la structure de la gélatine.

Il existe deux processus industriels aboutissant à la formation de la gélatine par dénaturation du collagène : le traitement alcalin qui donne la gélatine de type B dite « acide » et le traitement acide qui donne la gélatine de type A dite « alcaline » ou « basique ». Le traitement alcalin (avec l'hydroxyde de calcium) permet l'hydrolyse quasi totale des groupements amide (CONH_2) du collagène. Ce traitement donne une gélatine avec une densité très importante de groupement carboxyle (COOH) ce qui aura pour effet de réduire le point isoélectrique (pI) à environ 5. La gélatine de type B sera donc chargée négativement à pH physiologique. Le traitement acide (avec de l'acide chlorhydrique ou sulfurique) quant à lui, est basé sur une hydrolyse partielle des groupements amide avec un taux de conversion en groupement carboxyle beaucoup plus faible. Les propriétés électrostatiques du collagène restent quasi inchangées et donc le point isoélectrique de la gélatine obtenue dans ce cas (type A) est similaire à celui du collagène soit environ 9 (figure 43). La gélatine de type A sera donc chargée positivement à pH physiologique (Tabata et Ikada 1998; Lee et Mooney 2001).

La dénaturation du collagène en gélatine peut aussi s'opérer par un chauffage prolongée du collagène qui détruit également les structures secondaire et tertiaire de la protéine (Veis 1964).

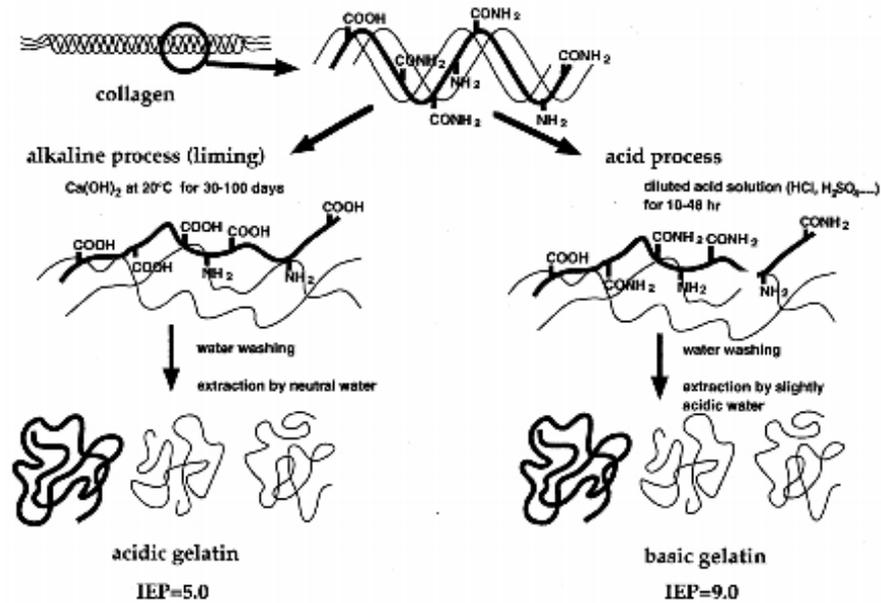


Figure 43. Processus industriel de fabrication des gélatines « acide » et « basique » à partir du collagène (Tabata et Ikada 1998).

1.5.2. Structure et propriétés de la gélatine

La gélatine contient dans sa structure 18 acides aminés différents dont 7 des 8 acides aminés essentiels à l'Homme (figure 44).

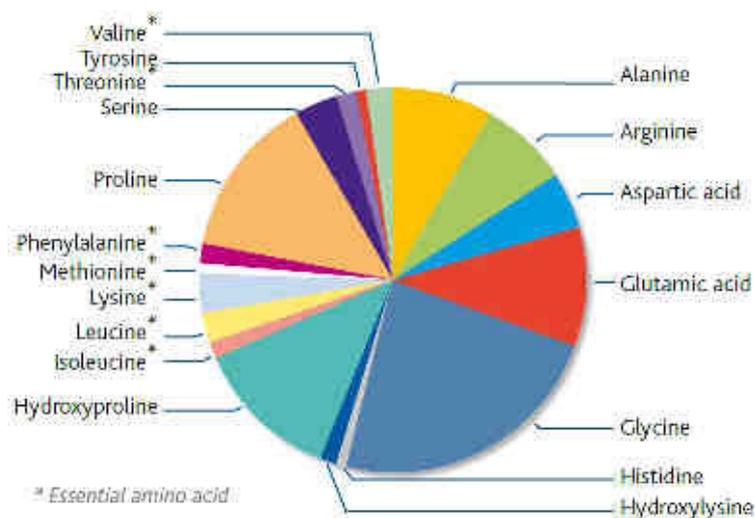


Figure 44. Acides aminés présents dans la gélatine (PB Gelatins, Etats-Unis).

Une des propriétés les plus intéressantes de la gélatine pour l'ingénierie tissulaire est sa capacité à former des gels physiques thermoréversibles. En effet à des températures supérieures à 40°C, la gélatine en solution aqueuse est sous forme de chaînes dissociées adoptant une conformation en pelote aléatoire. En diminuant la température de la solution en dessous de 30°C, les chaînes de gélatine subissent une transition « désordre/ordre » et la structure en triple hélice caractéristique du collagène va être partiellement régénérée (Bigi *et al.* 2004). Ce gel thermoréversible contient tout d'abord des zones ordonnées réticulés physiquement appelées « jonctions » faites par l'association des chaînes de gélatine en structure hélicoïdale et qui sont stabilisées par liaisons hydrogène (figure 45). Sur le contour de ses chaînes de gélatine dites « ordonnées », on trouve également des résidus peptidiques dans une conformation désordonnée (Ross-Murphy 1992). Sa structure moins ordonnée que celle du collagène et sa capacité à gélifier rendent les matériaux à base de gélatine malléables et façonnables ce qui explique que l'on peut trouver la gélatine sous forme de particules, de scaffolds, de gels injectables, de mousses ou encore de colles chirurgicales (Usta *et al.* 2003).

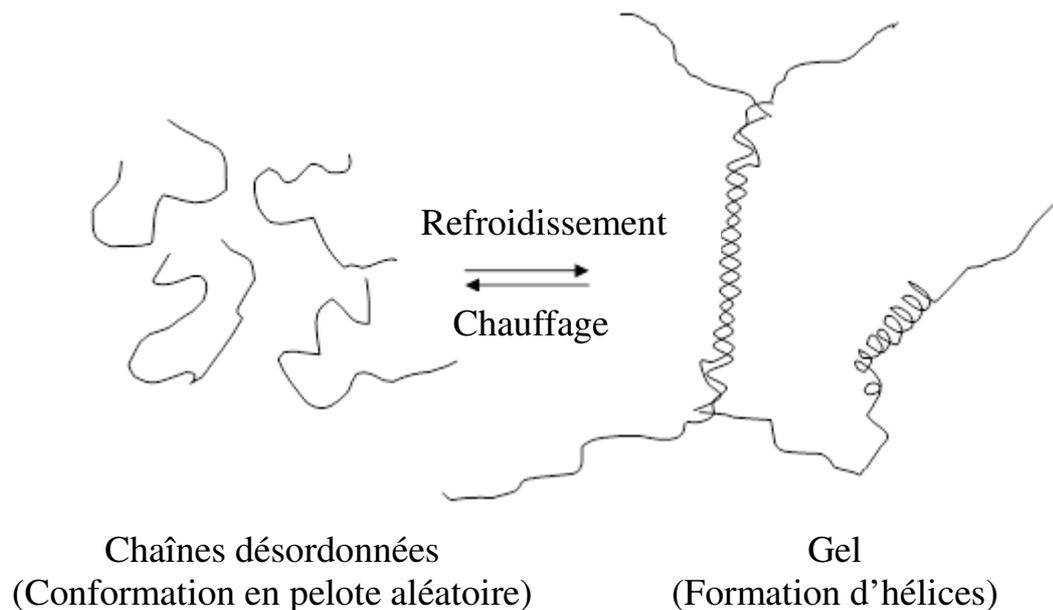


Figure 45. Processus de gélification de la gélatine.

Les propriétés physiques des gels de gélatine sont principalement conditionnées par la provenance de la gélatine (bovine, porcine) et ses conditions d'extraction (acide, basique). La rigidité des gels de gélatine est caractérisée par l'indice Bloom. L'indice Bloom correspond à la force à appliquer sur une sonde sphérique diamètre 12.5 mm) pour déformer la surface du

gel de gélatine de 4 mm sans casser le gel (Bigi *et al.* 2004). Plus l'indice Bloom est élevé, plus le gel est rigide (figure 46). La grande variété de gélatine et les différentes mises en forme existantes permettent de disposer de matériaux à base de gélatine avec une large gamme d'indices Bloom.

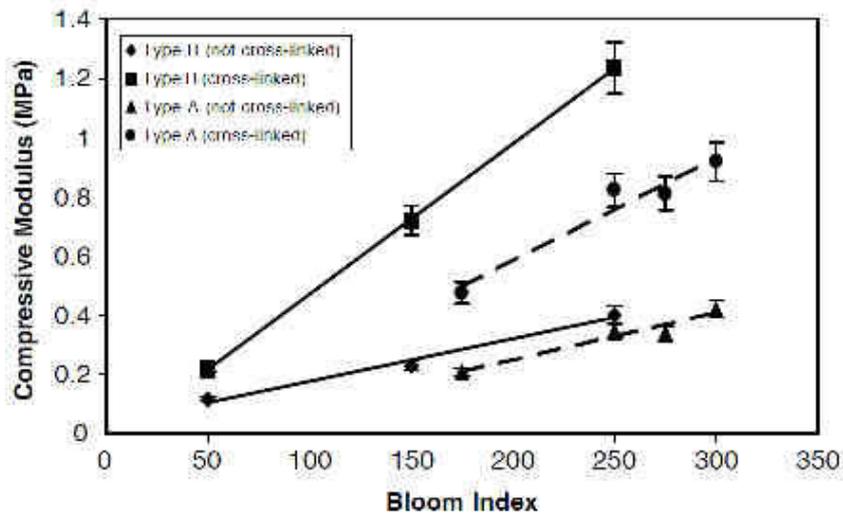


Figure 46. Module de compression pour différentes gélatines (type A et B) réticulées (avec GTA) ou non réticulées en fonction de l'indice Bloom (Usta *et al.* 2003).

Une autre propriété importante de la gélatine concerne le maintien de ses sites de liaisons aux intégrines. En effet, durant le processus de dénaturation, la gélatine conserve la majorité des séquences d'acides aminés des segments de collagène (Eastoe 1957). La gélatine contient donc la majorité de sites de liaison aux intégrines et ce paramètre est très important pour l'ingénierie tissulaire car les cellules vont adhérer au matériau grâce à ces sites. On peut même ajouter que sa structure moins ordonnée que celle du collagène lui permet d'exposer plus de sites de liaison aux intégrines pour l'attachement cellulaire (Elliott *et al.* 2003). En combinant cette propriété avec d'autres propriétés de la gélatine comme la biodégradabilité, la non-cytotoxicité, la faible immunogénicité et la charge électronique modulable en fonction du type de la gélatine utilisée (A ou B), on comprend mieux pourquoi les biomatériaux à base de gélatine sont utilisés dans les domaines de la médecine régénérative et de l'ingénierie tissulaire.

1.5.3. Réticulation

Les principaux obstacles à l'utilisation des matériaux à base de gélatine sont ses propriétés mécaniques qui demeurent relativement faibles. En effet la gélatine est soluble dans l'eau à partir de 37°C et donc une réticulation sera nécessaire pour améliorer les stabilités thermiques et mécaniques du matériau pour des applications biomédicales. Différentes techniques de réticulation ont été utilisées pour renforcer les propriétés mécaniques de la gélatine (tableau 3).

Techniques de réticulation	Réactifs	Référence
Par voie chimique	Glutaraldéhyde (GTA)	(Bigi <i>et al.</i> 2001)
	EDC/NHS	(Liang <i>et al.</i> 2004)
	Génipine	(Bigi <i>et al.</i> 2002; Liang <i>et al.</i> 2004)
Par voie photochimique	Gélatine modifiée avec groupement méthacrylate	(Nichol <i>et al.</i> 2010)
Par voie enzymatique	Transglutaminase (TGA)	(De Carvalho et Grosso 2004; McDermott <i>et al.</i> 2004; Orban <i>et al.</i> 2004)
	Tyrosinase	(Jus <i>et al.</i> 2012)

Tableau 3. Différentes techniques de réticulation de la gélatine.

1.5.3.1. La réticulation par voie chimique

La réticulation chimique se fait en utilisant un agent réticulant qui crée des ponts chimiques entre les différents groupements chimiques des chaînes de gélatine. Ce type de réticulation est généralement réalisé avec un composé chimique bifonctionnel comme le glutaraldéhyde ou les carbodiimides comme EDC.

Le glutaraldéhyde (GTA) est l'agent réticulant le plus utilisé car il est peu coûteux, il permet une réticulation rapide et il est très efficace pour stabiliser les matériaux à base de gélatine. La réticulation se fait par réaction entre les groupements amines des lysines ou des

hydroxylysines des chaînes de gélatine et les groupements aldéhydes du glutaraldéhyde (figure 47) (Bigi *et al.* 2001). Cependant, pour des applications biomédicales, cet agent réticulant possède quelques limitations. En effet, cet agent est cytotoxique et dans le cas d'implants, il peut provoquer à long terme une calcification. De plus, en cas de dégradation de l'implant, le GTA, qui est un agent toxique, est libéré dans l'organisme (Bigi *et al.* 2002).

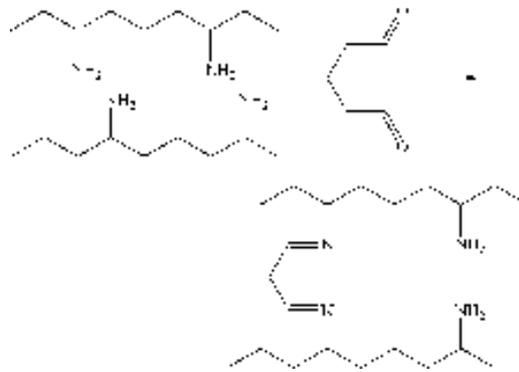


Figure 47. Réaction de réticulation entre la gélatine et le GTA (Argillier et Pasquier 2006).

Les carbodiimides (EDC) ont un mécanisme de réaction différent de celui du GTA. L'EDC est un réactif qui permet la réaction de condensation entre les groupements acide carboxylique et amine de deux chaînes différentes de gélatine permettant la formation de liaisons amides (Liang *et al.* 2004). La plupart du temps, l'EDC est utilisé en présence de NHS pour former une espèce acide intermédiaire très réactive (figure 48) (Sehgal et Vijay 1994). Les carbodiimides sont moins toxiques que le glutaraldéhyde mais possèdent tout de même un certain degré de cytotoxicité. Les résidus n'ayant pas réagi doivent être complètement éliminés avant toute utilisation du matériau pour des études biologiques.

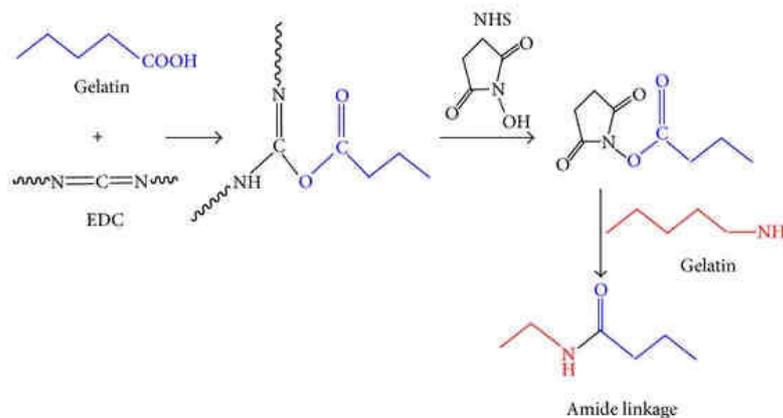


Figure 48. Réaction de réticulation entre la gélatine et le glutaraldéhyde (Argillier et Pasquier 2006).

Pour les applications biomédicales, il était nécessaire de trouver un agent réticulant qui permette l'obtention d'un matériau stable, biocompatible et non cytotoxique. Pour répondre à cette demande, l'utilisation de la génipine, qui est un agent réticulant naturel d'origine végétale, semble être une bonne alternative. En effet la génipine s'est révélée être un agent de réticulation efficace et non cytotoxique (Bigi *et al.* 2002). Le mécanisme de réaction de la génipine n'est encore pas parfaitement déterminé à ce jour. Hillberg *et al.* ont proposé un mécanisme de réaction entre la génipine et les groupements amines du chitosane (Hillberg *et al.* 2009). La génipine réagirait avec les fonctions amines du collagène et formerait des ponts entre les chaînes polypeptidiques. La gélatine conserve la majorité de la structure chimique du collagène et donc le mécanisme peut également s'appliquer à la gélatine (figure 49).

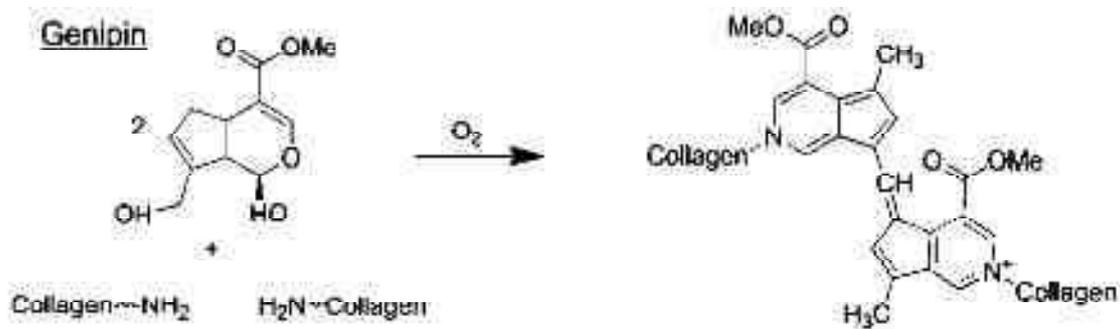


Figure 49. Mécanisme de réaction entre la génipine et le collagène (Hillberg *et al.* 2009).

1.5.3.2. La réticulation par voie photochimique

La réticulation par voie photochimique fait intervenir un groupement photosensible qui va être greffé sur les chaînes de gélatine. Ce groupement, une fois irradié, permet une polymérisation radicalaire et donc une réticulation de l'ensemble des chaînes de gélatine modifiée. Un des groupements photosensibles les plus utilisés avec la gélatine est le méthacrylate qui réticule la structure sous rayonnement UV (figure 50). Les propriétés du gel de gélatine obtenu sont variables en fonction du degré de méthacrylation des chaînes de gélatine. En effet, pour une concentration de gélatine à 15% (masse/volume), le module de Young de l'hydrogel peut varier de 8 kPa à 30 kPa en passant d'un degré de méthacrylation de 20% à 80%. Ce procédé permet un contrôle spatial de la réticulation et la création de réseaux microstructurés (« micropatterning ») en utilisant des masques lors de l'irradiation. Ces réseaux microstructurés permettent de modifier localement la topographie des gels et donc d'étudier *in vitro* le comportement des cellules (Nichol *et al.* 2010). Le seul

inconvénient de cette technique est la nécessité de modifier chimiquement la gélatine avant la réticulation.

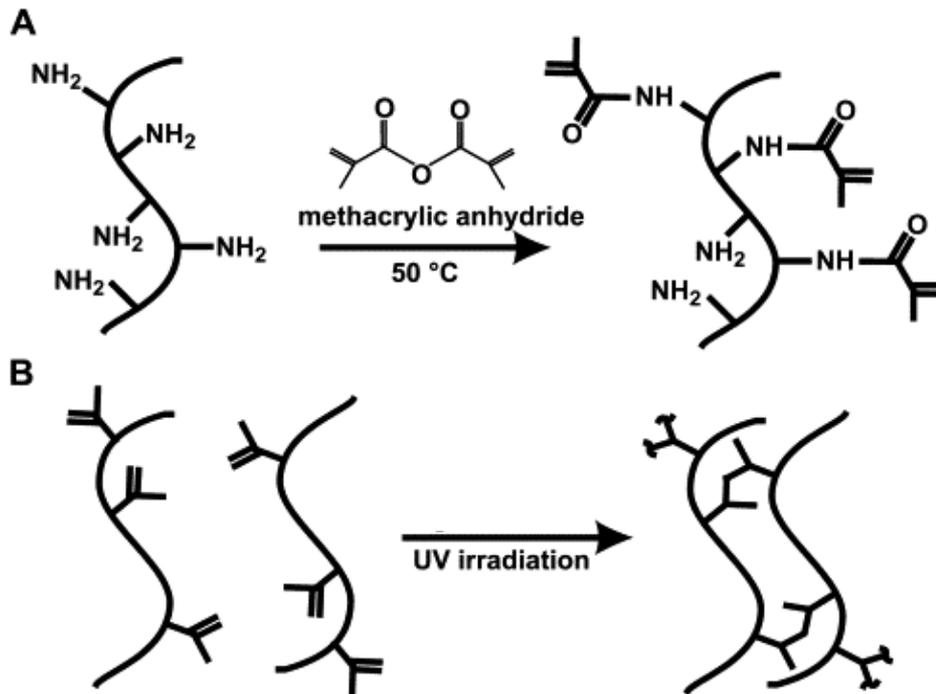


Figure 50. A) Synthèse de la gélatine modifiée avec les groupements méthacrylates. Les groupements amines de la gélatine réagissent avec l'anhydride méthacrylique pour créer des groupes méthacrylates. B) Réticulation de la gélatine modifiée par irradiation UV (Nichol *et al.* 2010).

1.5.3.3. La réticulation par voie enzymatique

Les approches traditionnelles pour réticuler la gélatine utilisent des réactifs chimiques. Ces agents de réticulation sont pour la plupart toxiques et leur principal inconvénient est leur libération incontrôlée dans l'organisme lors de la dégradation du matériau formé. L'utilisation d'enzymes, présentes naturellement chez les organismes, pour effectuer la réticulation semble être une bonne alternative à tous les problèmes de toxicité. De plus pour des applications biomédicales, la réticulation avec des enzymes peut se dérouler à pH physiologique ce qui représente un avantage certain. Deux enzymes sont connues pour réticuler la gélatine, la transglutaminase et la tyrosinase.

La tyrosinase est présente principalement chez les plantes, les animaux et les microorganismes. Cette enzyme catalyse la réaction entre les phénols des acides aminés tyrosines en présence d'oxygène. En effet elle catalyse la formation des composés o-quinones

qui peuvent ensuite se condenser entre eux ou réagir avec des groupements amines présents sur les chaînes polypeptidiques. Ces réactions aboutissent à la réticulation des différentes chaînes polypeptidiques (figure 51) (Jus *et al.* 2012).

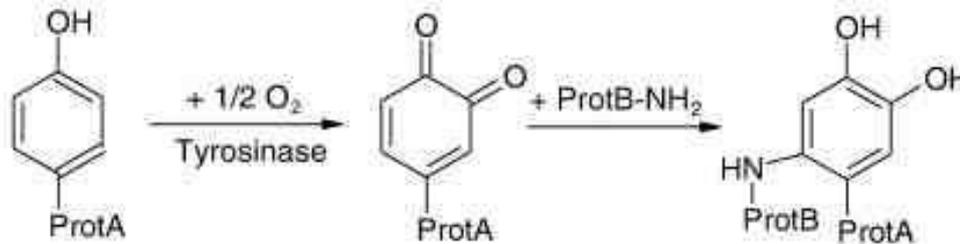


Figure 51. Principe de réticulation des protéines en utilisant la tyrosinase (Jus *et al.* 2012).

La transglutaminase est une enzyme présente dans de nombreux organismes vivants. Industriellement la transglutaminase peut être obtenue par extraction et purification de tissus (d'origine bovine, porcine ou à partir de poissons) ou de sang bovin, par manipulations génétiques de microorganismes ou par des techniques traditionnelles de fermentation à partir de microorganismes (De Carvalho et Grosso 2004). Cette enzyme intervient également dans des processus biologiques comme la coagulation sanguine (Greenberg *et al.* 1991) ou la cicatrisation (Jones *et al.* 1997). La transglutaminase catalyse la réaction entre les groupements carboxamides (RCONH₂) présents sur les résidus glutamine et les groupements amines présents sur les résidus lysine. Cette réaction aboutit à la formation d'une liaison covalente amide entre les deux acides aminés (figure 52) (Orban *et al.* 2004). Cette enzyme est également très utilisée dans l'industrie agroalimentaire en raison de sa non toxicité. La transglutaminase est donc un bon candidat pour réticuler les matériaux puisqu'elle respecte les exigences de non cytotoxicité et de biocompatibilité. Il existe actuellement deux types de transglutaminase : la transglutaminase issue des tissus (Collighan et Griffin 2009) et la transglutaminase issue des microorganismes qu'on appelle transglutaminase microbienne (McDermott *et al.* 2004). Pour effectuer nos travaux, nous nous sommes particulièrement intéressés à la transglutaminase microbienne car comparée à son homologue issu des tissus, elle permet la réticulation sans l'intervention de cofacteurs tels que Ca²⁺.

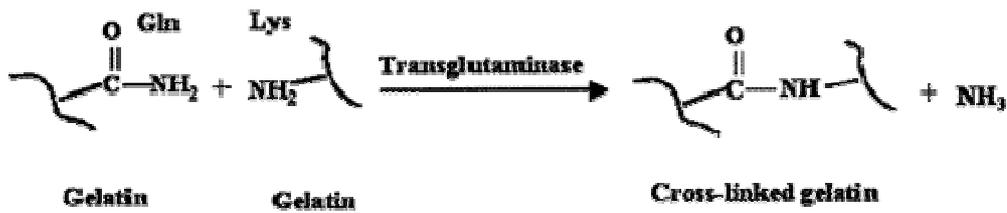


Figure 52. Mécanisme de réaction entre la transglutaminase et la gélatine (McDermott *et al.* 2004).

Pour réaliser la réticulation de la gélatine, il semble plus judicieux d'utiliser la transglutaminase plutôt que la tyrosinase car la gélatine possède plus d'acides aminés glutamine et lysine dans sa séquence que d'acides aminés tyrosine. Ainsi le taux de réticulation sera probablement plus élevé avec la transglutaminase ce qui devrait améliorer les propriétés mécaniques du matériau à base de gélatine.

1.5.4. Applications en tant que biomatériau

La gélatine possède d'excellentes propriétés de biodégradabilité et de biocompatibilité. De plus, la présence de groupements RGD dans sa structure confère aux matériaux à base de gélatine de très bonnes propriétés en termes d'attachement cellulaire. Toutes ces propriétés expliquent que les matériaux à base de gélatine soient utilisés dans de nombreuses applications biomédicales comme pour fabriquer des matériaux libérant des molécules bioactives, ou la mise au point de « scaffolds » pour l'ingénierie tissulaire. La gélatine, grâce à ses excellentes propriétés de mise en forme et de gélification, peut être utilisée en tant que biomatériau sous trois formes principales : hydrogel, film ou mousse.

Les hydrogels à base de gélatine trouvent de nombreuses applications dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Ils sont employés comme vecteurs de libération de médicaments, de facteurs de croissance ou comme structures tridimensionnelles capables d'organiser les cellules pour aboutir à la formation du tissu désiré (Drury et Mooney 2003). Pour les applications de libération de molécules bioactives, les « scaffolds » sont souvent utilisés pour stabiliser ces molécules (empêcher leur dénaturation en milieu aqueux) et ensuite les libérer sur une durée précise afin de promouvoir différents phénomènes biologiques tels que l'angiogenèse (libération de VEGF) ou l'ostéogenèse (libération de BMP) (Kempen *et al.* 2009). Les hydrogels de gélatine peuvent aussi être utilisés pour encapsuler des cellules et

permettre leur développement dans un environnement 3D. En effet les hydrogels de gélatine forment des réseaux 3D très hydratés fournissant un environnement propice au développement cellulaire (présence de groupements RGD par exemple) (Aubin *et al.* 2010). Les hydrogels peuvent fournir les signaux biochimiques, par l'incorporation de facteurs de croissance, ainsi que les signaux biophysiques, en apportant les propriétés mécaniques (réticulation) nécessaires au bon développement des cellules. Cet environnement propice au développement cellulaire permet la sécrétion, par ces dernières, de matrice extracellulaire et de nouvelles molécules de signalisation. Ces processus aboutiront à la formation de nouveaux tissus. On peut prendre l'exemple des cartilages qui sont des tissus très hydratés composés de chondrocytes encapsulés dans une matrice de collagène et de glycosaminoglycanes (GAGs). Les hydrogels de gélatine ont une structure macromoléculaire très proche des cartilages. Ce type d'approche peut donc constituer une bonne stratégie pour régénérer des cartilages (Awad *et al.* 2004).

L'élaboration d'hydrogels à base de gélatine se fait par chauffage d'une solution aqueuse de gélatine au dessus de 40°C afin d'obtenir une solution homogène. Ensuite, en fonction de la forme que l'on désire obtenir, il suffit d'utiliser différents moules et d'y verser la solution. En refroidissant, le gel thermoréversible va se former et ensuite différentes techniques de réticulation pourront être utilisées pour renforcer les propriétés mécaniques assez faibles de ce matériau.

Pour d'autres applications biomédicales comme la mise au point de peaux artificielles (substituts épidermiques) suite à des brûlures par exemple, la gélatine est utilisée sous forme de mousse qu'on appelle aussi éponge. La structure poreuse de l'éponge de gélatine permet le chargement de molécules bioactives comme des antibiotiques (Choi *et al.* 1999). Ces pansements sont appliqués localement sur la plaie et les molécules bioactives sont ensuite libérées pour lutter contre les possibles infections et favoriser la régénération de l'épiderme. En effet, pour ce type d'application, il est important de choisir des composants qui miment le plus possible les constituants de la peau et comme la gélatine correspond à du collagène dénaturé, son utilisation semble parfaitement adaptée à cette application. De plus, dans le domaine des pansements cicatrisants (« wound dressing »), il est important que le matériau choisi soit résorbable *in vivo* et qu'il ne possède pas de propriétés antigéniques. Ces deux critères sont remplis par la gélatine. La gélatine favorise également l'activation des macrophages ce qui est une étape nécessaire pour stimuler la réponse immunitaire. Pour améliorer les propriétés du substitut épidermique en termes de rétention d'eau, de porosité, de

prolifération cellulaire ou de lubrification, d'autres molécules comme l'acide hyaluronique, l'alginate ou le chitosane peuvent être ajoutées dans la formulation initiale de la mousse de gélatine (Choi *et al.* 1999; Mao *et al.* 2003). Des éponges de gélatine résorbables et stériles sont également utilisées dans le domaine chirurgical pour leur puissant effet hémostatique (Pua 2013). Pour fabriquer les mousses de gélatine, le principal procédé utilisé est la lyophilisation aussi appelée cryodessiccation. Ce procédé implique tout d'abord la fabrication classique d'un hydrogel de gélatine par chauffage d'une solution aqueuse de gélatine au dessus de 40°C et son refroidissement pour former le gel thermoréversible. Ensuite l'échantillon est congelé pour figer le solvant dans la structure du matériau. Pour finir le solvant va être sublimé laissant des vides dans le matériau ce qui créera la structure poreuse.

Les films à base de gélatine sont utilisés principalement pour des applications de libération de molécules bioactives (Draye *et al.* 1998) et pour le développement de substrats favorisant l'adhésion, la prolifération ou la différenciation cellulaires (Cheng *et al.* 2003). Cependant, la gélatine forme des films qui présentent des propriétés mécaniques faibles. Ainsi, on ajoute souvent à la formulation des composants comme l'alginate qui peut se réticuler en présence d'ions Ca^{2+} (Dong *et al.* 2006). Dans d'autres cas, la gélatine peut être formulée avec d'autres protéines comme la fibroïne pour favoriser les interactions avec les cellules (Taddei *et al.* 2013). En effet, certaines protéines ne possèdent pas de peptides bioactifs (peptide d'adhésion RGD par exemple) capables d'améliorer les fonctions cellulaires et donc la gélatine par sa propre composition remédie à ce défaut. Dans la majorité des cas, les films de gélatine sont fabriqués en utilisant la technique de dépôt par évaporation de solvant. Cette technique consiste à déposer la gélatine sous forme liquide (au dessus de 40°C) sur un substrat et ensuite le solvant (dans ce cas l'eau) est évaporé jusqu'à l'obtention d'un film. Cette technique ne permet généralement pas l'obtention de films très minces et homogènes. Pour en diminuer l'épaisseur et uniformiser les films de gélatine, une autre technique a été utilisée, il s'agit du « spin-coating » que l'on peut traduire en français par enduction centrifuge (Yakimets *et al.* 2005). Cette technique consiste à déposer un petit volume du matériau sur un substrat qui est lui-même maintenu par une pompe à vide sur un support tournant. Ensuite le support tournant est mis en rotation à haute vitesse constante pour étaler le matériau déposé grâce à la force centrifuge. Le solvant commence à s'évaporer pendant la phase d'étalement jusqu'à l'obtention d'un film mince (figure 53). L'épaisseur du film obtenu dépend de la vitesse de rotation, de l'accélération et du temps de rotation. Cette épaisseur dépend aussi de plusieurs facteurs liées au matériau lui-même comme sa

concentration en solution, sa masse molaire, sa viscosité ou encore la quantité de matériau déposée sur le substrat. Cette technique permet d'obtenir des films minces et uniformes allant de quelques nanomètres à quelques microns.

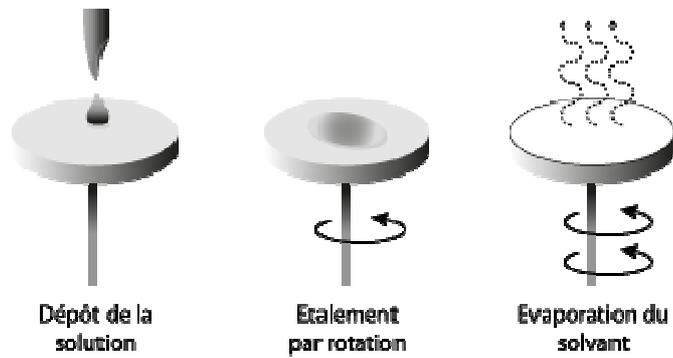


Figure 53 . Principe du « spin-coating ».

2. Matériels et Méthodes

2.1. Matériels

2.1.1. Matériels pour la construction et l'étirement des films multicouches de polyélectrolytes

2.1.1.1. Solutions de polyélectrolytes, enzymes et sondes fluorescentes

2.1.1.1.1. Solutions de polyélectrolytes

Les polyélectrolytes commerciaux utilisés pour construire les films multicouches se présentent sous forme lyophilisée et sont donc tout d'abord dissouts dans une solution tampon NaCl 0.15 M/Tris hydroxyméthyl aminométhane 10 mM (appelée "tampon NaCl/Tris") préparée avec de l'eau ultra-pure (de résistivité 18.2 MΩ.cm, système Milli-Q-plus, Millipore). Ces solutions de polyélectrolytes sont réalisées à une concentration de 1 mg.mL⁻¹ et le pH de ces solutions est ajusté à 7.4 avec des solutions concentrées de HCl et de NaOH. Les tableaux 4 et 5 récapitulent les polycations et les polyanions utilisés.

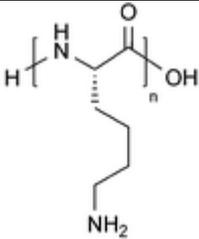
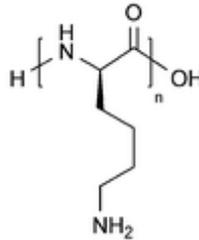
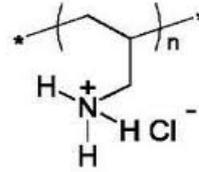
Nature du polyélectrolyte / Notation	Structure moléculaire	Mw (g.mol ⁻¹)	pKa	Fournisseur
Poly(L-lysine) PLL		3×10 ⁴ - 7×10 ⁴	10.5	Sigma-Aldrich (France)
Poly(D-lysine) PDL		3×10 ⁴ - 7×10 ⁴	10.5	Sigma-Aldrich (France)
Poly(allylamine) PAH		1.5×10 ⁴	9	Sigma-Aldrich (France)

Tableau 4. Polycations utilisés.

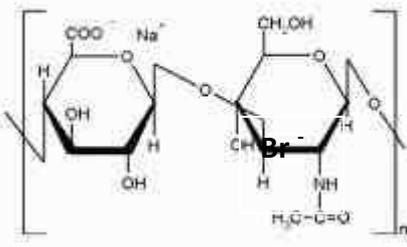
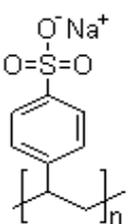
Nature du polyélectrolyte / Notation	Structure Moléculaire	Mw (g.mol ⁻¹)	pKa	Fournisseur
Acide hyaluronique HA		1.2×10 ⁵	2.9	Bioiberica Lifecore Biomedical (Etats Unis)
Poly(4-styrène sulfonate de sodium) PSS		7×10 ⁴	/	Sigma-Aldrich (France)

Tableau 5. Polyanions utilisés.

2.1.1.1.2. Polyélectrolytes fluorescents

Pour les expériences de microscopie confocale à balayage laser, des polyélectrolytes fluorescents ont été employés. Ces polymères d'origine commerciale ou préparés au laboratoire ont été marqués par couplage covalent avec des sondes fluorescentes : la fluorescéine isothiocyanate (FITC) qui émet dans le vert ou la rhodamine succinimidyl ester (Rho) qui émet dans le rouge (tableau 6).

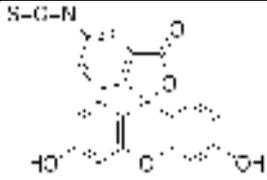
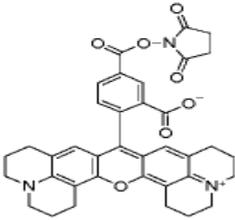
Nature de la sonde fluorescente / notation	Structure moléculaire	Mw (g.mol ⁻¹)	Longueur d'onde d'absorption	Longueur d'onde d'émission	Fournisseur
Fluorescéine-5-isothiocyanate / FITC (vert)		389.38	488 nm	520 nm	Invitrogen (France)
Red TM X succinimidyl ester 5-isomer / Rhodamine (rouge)		768.90	570 nm	595 nm	Sigma-Aldrich (France)

Tableau 6. Sondes fluorescentes utilisées.

Le couplage de ces sondes fluorescentes avec des polyélectrolytes comme la poly(L-lysine) (PLL) ou la poly(allylamine) (PAH) est obtenu par l'attaque nucléophile de ces polyamines sur le carbone électrophile du groupe isothiocyanate de la FITC ou du groupe ester de la rhodamine succinimidyl ester. Il en résulte la formation d'une liaison covalente reliant la sonde fluorescente et le polyélectrolyte. La poly(L-lysine) marquée à la fluorescéine isothiocyanate (PLL^{FITC}) a été obtenue commercialement (fournisseur Sigma Aldrich) alors que le marquage de la PAH avec la rhodamine succinimidyl ester a été réalisé au laboratoire. À cette fin, la quantité nécessaire de PAH est dissoute dans une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) (0.1 M, pH = 8.5) pour obtenir une solution à 1 mg.mL⁻¹. Parallèlement, la rhodamine succinimidyl ester est dissoute dans du diméthylesulfoxyde (DMSO) à une concentration de 2 mg.mL⁻¹. Les deux solutions sont mélangées avec un rapport de 1 mg de rhodamine (500µL de la solution à 2 mg.mL⁻¹) pour 100 mg de PAH (100 mL de la solution à 1 mg.mL⁻¹) (stoechiométrie Rho/PAH ~ 1/1) à température ambiante durant 2 heures sous agitation douce. Le polyélectrolyte PAH^{Rho} marqué est finalement purifié par dialyse (molecular "cut off" 12000-16000 g.mol⁻¹, Membra-Cel TM, Viskase Companies, Etats Unis) avec de l'eau ultra-pure pendant plusieurs jours en changeant régulièrement l'eau du dialysat. L'absence de rhodamine libre dans le dialysat est vérifiée au moyen d'un spectromètre

UV/visible. En ce qui concerne le poly(4-styrène sulfonate de sodium) marqué à la rhodamine (PSS^{Rho}), il a été préparé dans le cadre d'une collaboration avec un laboratoire allemand (C. Déjugnat, Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Potsdam) (Vodouhê *et al.* 2006). Toutes les solutions de polyélectrolytes marqués avec des sondes fluorescentes ont été ensuite préparées dans un tampon NaCl/Tris (0.15M/10mM) à 0.5 mg.mL⁻¹ (tableau 7).

Polyélectrolytes fluorescents	Fournisseur ou méthode de couplage	Mw (g.mol ⁻¹)	pKa
PLL ^{FITC}	Sigma Aldrich (France) Taux de substitution : 0.3 à 1% FITC par lysine	7×10 ⁴	10.5
PAH ^{Rho}	Réaction couplage avec la rhodamine succinimidyl ester Red TM -X	7×10 ⁴	9
PSS ^{Rho}	Réaction de polymérisation (Vodouhê <i>et al.</i> 2006)	Non renseigné	/

Tableau 7. Polyélectrolytes fluorescents utilisés.

2.1.1.1.3. Solution d'enzyme

Pour la dégradation des films multicouches par voie enzymatique, la trypsine bovine (Trypsin from bovine pancreas, Sigma-Aldrich, T1426) a été utilisée. Elle a été dissoute à une concentration de 0.25 mg.mL⁻¹ selon les mêmes conditions que celles indiquées précédemment (tampon NaCl/Tris, pH = 7.4) (tableau 8).

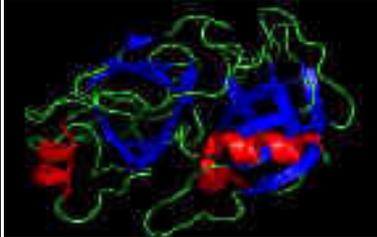
Enzyme	Structure 3D	Mw (g.mol ⁻¹)	Point isolélectrique (pI)	Séquence	Fournisseur
Trypsine bovine		2.3×10 ⁴	8.40	246 acides aminés	Sigma Aldrich (France)

Tableau 8. Structure de la trypsine.

Pour la visualisation de la trypsine en microscopie confocale à balayage laser, la sonde fluorescente rhodamine a été greffée sur cette enzyme. De la trypsine marquée à la rhodamine (notée TRY^{Rho}) a été obtenue en mélangeant l'enzyme dissoute à 3 mg.mL⁻¹ dans une solution de Na₂CO₃ (0.1 M, pH = 8.5) avec la rhodamine succinimidyl ester dissoute dans du DMSO (diméthylesulfoxyde) à 2.9 mg.mL⁻¹. Nous avons utilisé un ratio de 1 mg de rhodamine (345 µL de la solution à 2.9 mg.mL⁻¹) pour 15 mg d'enzyme (5 mL de la solution à 3 mg.mL⁻¹) (stoechiométrie Rho/trypsine ~ 2/1). Ces deux solutions ont été mélangées sous agitation magnétique à température ambiante pendant 2 heures. La TRY^{Rho} a été purifiée par dialyse pendant plusieurs jours et l'absence de rhodamine libre dans la solution a été vérifiée par spectroscopie UV/visible. Cependant, il semblerait que le marquage de la trypsine avec la sonde fluorescente rhodamine désactive l'enzyme. Pour les expériences de dégradation, nous utiliserons donc la trypsine non marquée. La trypsine marquée à la rhodamine ne sera utilisée que pour vérifier les propriétés de barrière des multicouches PAH/PSS vis-à-vis de cette enzyme et à évaluer la concentration de la trypsine dans le film grâce à une courbe étalon.

2.1.1.2. Construction des échantillons

2.1.1.2.1. Nature des substrats de dépôt utilisés

Pour des études préalables sans étirement mécanique, des lamelles de verre (à base de silice) chargées négativement en surface (diamètre 12 mm, VWR, France) ont été utilisées comme substrat des films multicouches de polyélectrolytes. Elles présentent une faible rugosité et leur transparence permet les observations optiques ce qui en fait de très bons supports d'étude. Les lamelles de verre sont préalablement nettoyées à l'aide d'une solution de

SDS 0.01 M (30 min, au bain marie), rincées à l'eau puis trempées dans une solution de HCl 0.1 M (30 min, au bain-marie). Enfin, elles sont à nouveau rincées abondamment à l'eau ultra-pure et séchées sous flux d'azote.

En ce qui concerne les expériences d'étirement mécanique, des feuilles de silicone d'épaisseur 254 μm (Specialty Manufacturing Inc., Saginaw, Michigan, Etats Unis) ont été utilisées comme substrat élastomérique. Ces feuilles de silicone, découpées en carrés de $18 \times 18 \text{ mm}^2$ sont plaquées sur des lamelles de verre carrées de même aire, de façon à pouvoir les manipuler aisément et les maintenir sur un portoir lors de la construction des échantillons. Elles sont nettoyées préalablement avec de l'éthanol (quelques minutes) puis rincées abondamment avec de l'eau.

2.1.1.2.2. Construction des assemblages multicouches

Pour la réalisation de films contenant un nombre élevé de couches, l'opération de dépôt sur les substrats est programmée à l'aide d'un bras automatisé (Dipping Robot, Riegler et Kirstein, GmbH, Berlin, Allemagne) (figure 54). Les substrats maintenus sur ce bras par un portoir sont séquentiellement plongés dans les solutions de polyélectrolytes et de rinçage. Ils sont tout d'abord immergés dans la solution de polycations puis sont rincés avec une solution de rinçage identique à la solution de dissolution des polyélectrolytes (tampon NaCl/Tris). Ils sont ensuite plongés dans la solution de polyanions et rincés en suivant le même protocole que pour le dépôt des polycations. Ces opérations d'immersions successives sont répétées jusqu'à l'obtention du nombre de couches souhaité. Pour la construction du réservoir PLL/HA les dépôts de polyélectrolytes étaient de 5 minutes alors que pour la construction de la barrière PSS/PAH les dépôts de polyélectrolytes n'étaient que de 4 minutes. Les rinçages sont les mêmes pour les deux procédures et ils consistent en deux cycles d'immersion de 5 minutes.



Figure 54. Construction des films multicouches à l'aide du bras automatisé (Dipping Robot, Riegler et Kirstein, GmbH, Berlin, Allemagne).

2.1.1.3. Dispositif d'étirement

Un dispositif d'étirement réalisé au laboratoire permet d'étirer de façon uniaxial les films multicouches solidaires de leur substrat élastomérique en silicone, directement sous le microscope confocal (figure 55). Le degré d'étirement (%) est défini par le paramètre $\alpha = (l - l_0)/l_0$ où l_0 et l correspondent respectivement aux longueurs initiale et étirée de la feuille de silicone. Le mouvement d'étirement est réalisé par un moteur électrique de précision à une vitesse de 0.74 mm.s^{-1} . Toutes les expériences d'étirement ont été réalisées à température ambiante.



Figure 55. Dispositif d'étirement adapté sur un cadre platine de microscopie confocale.

2.1.1.4. Chargement de biomolécules dans le film

La molécule thérapeutique choisie pour effectuer les expériences de libération à partir du film multicouche est le paclitaxel, commercialement appelé Taxol. Cette molécule anticancéreuse est principalement utilisée pour le traitement du cancer des ovaires et pour empêcher la recolonisation cellulaire des stents (effet antimétabolique). Pour étudier le chargement et la libération de cette molécule, nous avons utilisé le Paclitaxel Oregon Green 488 conjugué (paclitaxel commercial marqué avec une sonde fluorescente verte) (tableau 9). Le paclitaxel étant hydrophobe, il a été solubilisé dans un mélange éthanol/crémophore (BASF, Allemagne) qui ensuite le stabilise par des interactions hydrophobes.

Le chargement de la molécule dans le film multicouche a été réalisé en utilisant le protocole de Vodouhê et al, (Vodouhê *et al.* 2006). Après la construction de la strate réservoir PLL/HA, le Paclitaxel Oregon Green 488 conjugué a été adsorbé pendant une nuit à une concentration de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Après cette étape, la strate barrière PAH/PSS a été construite.

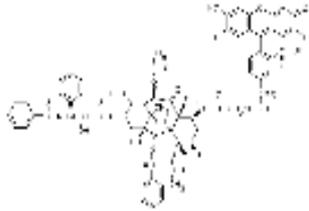
	Structure moléculaire	Mw (g.mol ⁻¹)	Fournisseur
Paclitaxel Oregon Green 488 conjugate		1.32×10 ³	Invitrogen (France)

Tableau 9. Structure du Paclitaxel Oregon Green 488 conjugate.

2.1.2. Matériels pour la construction, la réticulation, la modification biochimique et biophysique des films de gélatine

2.1.2.1. Solutions de gélatine et protéines fluorescentes

2.1.2.1.1. Solution de gélatine

La gélatine utilisée pour la construction des films est la gélatine de type B (acide). Les solutions de gélatine ont été préparées dans une solution tampon NaCl/Tris (0.15M/10 mM). Celle-ci été réalisée dans de l'eau ultra-pure (de résistivité 18.2 MΩ.cm, système Milli-Q-plus, Millipore). Les solutions de gélatine sont réalisées à une concentration en masse par volume de solvant de 15 % (1.5 g gélatine pour 10 mL de solution tampon). Pour dissoudre la gélatine dans la solution tampon, la solution est chauffée à 50°C sous agitation magnétique jusqu'à obtention d'une solution homogène. La structure de la gélatine de type B est détaillée dans le tableau 10.

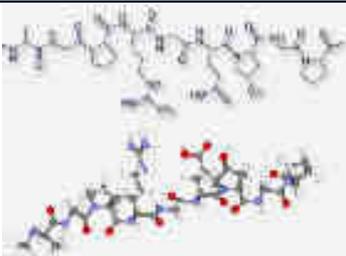
	Structure moléculaire	Mw (g.mol ⁻¹)	pI	Indice Bloom	Fournisseur
Gélatine type B (bovine)		2-2.5×10 ⁴	4.7 - 5.2	75	Sigma Aldrich (France)

Tableau 10. Structure de la gélatine.

2.1.2.1.2. Solutions de protéines fluorescentes

Pour les expériences de microscopie confocale à balayage laser et pour les expériences de libération de protéines par spectrofluorimètre, des protéines fluorescentes ont été employées. Les protéines fluorescentes sont d'origine commerciale ou préparées au laboratoire par couplage covalent avec des sondes fluorescentes : la fluorescéine isothiocyanate (FITC), ou encore la rhodamine succinimidyl ester (Rho) (tableau 6). Les protéines utilisées lors de notre projet sont l'albumine bovine (BSA) marqué avec la FITC ou le VEGF (Vascular endothelial growth factor) marqué avec la FITC ou la rhodamine (tableau 11). Toutes les solutions de protéines fluorescentes ont été préparées dans un tampon NaCl /Tris (0.15M/10mM). Pour les expériences de libération à partir du film de gélatine ou pour la visualisation par microscopie confocale, les solutions de BSA^{FITC} ont été préparées à une concentration 1 mg.mL⁻¹. Pour les expériences de libération avec le VEGF^{FITC}, les solutions ont été préparées à une concentration de 236 µg.mL⁻¹ tandis que pour les expériences de visualisation au microscope confocal, les solutions de VEGF^{Rho} ont été préparées à 0.5 mg.mL⁻¹.

Nature de la protéine fluorescente /Notation	Fournisseur ou méthode de couplage	Mw (g.mol ⁻¹)	pI
BSA ^{FITC}	Sigma aldrich (France) Taux de substitution : 7 à 12 moles de FITC par mole de BSA	6.6x10 ⁴	4.7
VEGF ^{FITC}	Réaction de couplage avec la fluorescéine-5 isothiocyanate (FITC, Invitrogen)	3.82x10 ⁴	8.5
VEGF ^{Rho}	Réaction de couplage avec la rhodamine succinimidyl ester Red TM -X (Molecular Probes)	3.82x10 ⁴	8.5

Tableau 11. Protéines fluorescentes utilisées.

2.1.2.2. Construction des films de gélatine par « spin-coating »

Les films de gélatine ont été construits sur des lamelles de verre (12 mm de diamètre, VWR). Les lamelles ont été préparées de la même manière que précédemment (cf. 2.1.1.2.1). Pour obtenir un film mince de gélatine, nous avons décidé d'utiliser la technique de « spin-coating » aussi appelée enduction centrifuge. La solution de gélatine à 15% (m/v) dans le tampon NaCl/Tris (0.15M/10mM) à pH = 7.4 est chauffée à 50°C sous agitation magnétique jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. A l'aide d'une pipette, 200 µL de cette solution sont prélevés et déposés sur la lamelle de verre. La lamelle de verre a été préalablement fixée sur le « spin-coater » par un système de vide. La lamelle de verre est ensuite soumise à une rotation à haute vitesse pour étaler la gélatine sous l'effet de la force centrifuge. Pendant le processus d'enduction, le solvant (dans notre cas l'eau) commence à s'évaporer. Plusieurs paramètres peuvent être modifiés pour faire varier l'épaisseur du film comme la vitesse de rotation, l'accélération, le temps du cycle, le volume de matériau déposé, la concentration du matériau ou encore la masse molaire du matériau.

Pour réaliser nos travaux, nous avons utilisé le « spin-coater » WS-650Mz-23NPP de la société Laurell (États Unis) (figure 56) et nous avons utilisé les paramètres suivants :

- vitesse de rotation : 2500 rpm (rotation par minute)
- accélération : 1250 rpm
- temps de cycle : 2 minutes
- volume déposé de gélatine : 200 µL
- concentration de la gélatine en solution : 15% (m/v)

Une fois le cycle fini, le film de gélatine non hydraté est mis à 4°C pendant au moins 3 heures sans rajouter de solvant (pour éviter que le film ne se dissolve) avant toute utilisation. A l'état sec, ces films peuvent être conservés pendant plusieurs semaines.



Figure 56. Spin-coater WS-650Mz-23NPP (Laurell, USA).

2.1.2.3. Réticulation enzymatique des films de gélatine

Pour renforcer les propriétés mécaniques des films de gélatine et pour éviter leur redissolution à 37°C lors des expériences avec les cellules, il est nécessaire de réticuler les films. À cette fin, nous avons utilisé la transglutaminase microbienne (tableau 12). Cette enzyme sous forme de poudre a été solubilisée à une concentration de 10% (m/v) soit 100 mg.mL⁻¹ dans un tampon PBS (« *phosphate buffer saline* » à pH = 7.4. La solution de transglutaminase est ensuite filtrée (0.22 µm) après dissolution dans la solution tampon. Le mode d'action de la transglutaminase est détaillé dans la partie 1.5.3.

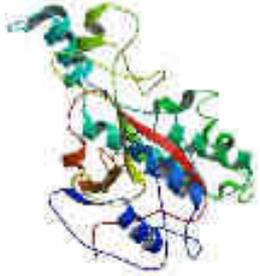
Enzyme	Structure 3D	Mw (g.mol ⁻¹)	pI	Fournisseur
Transglutaminase		3.8×10 ⁴	9	Ajinomoto (Japon)

Tableau 12. Structure de la transglutaminase microbienne.

Les films de gélatine sont réticulés juste avant leur utilisation. Pour cela 100µL de la solution de transglutaminase microbienne (10% m/v) sont incubés sur le film pendant 30 minutes. Ensuite deux rinçages de 5 minutes avec 100 µL de PBS sont réalisés pour éliminer l'enzyme restante.

2.1.2.4. Modification biochimique des films de gélatine pour la culture cellulaire

Pour conférer des propriétés biologiques spécifiques à nos films de gélatine et pour réaliser la culture cellulaire sans ajout de compléments dans le milieu de culture, nous avons incubé directement ces compléments dans le film avant la mise en culture des cellules. Ces compléments qui sont composés d'hormones, de facteurs de croissance et de cytokines sont différents d'un type cellulaire à l'autre. Nous avons choisi deux compléments différents : le complément pour les cellules endothéliales (Endothelial Cell Growth Medium

SupplementMix C-39215, Promocell, France) (tableau 13) et le complément pour les fibroblastes et les cellules épithéliales (SVF : sérum de veau foetal, GibcoBRL).

Composition	Concentration (mL^{-1} de supplément)
SVF	0.02 mL.mL^{-1}
Supplément de croissance de cellules endothéliales	0.004 mL.mL^{-1}
EGF	0.1 ng.mL^{-1}
bFGF	1 ng.mL^{-1}
Héparine	$90 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$
Hydrocortisone	$1 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$

Tableau 13. Composition Endothelial Cell Growth Medium SupplementMix C-39215 (Promocell).

En fonction du type cellulaire étudié, ces suppléments sont incubés sur le film de gélatine après l'étape de réticulation et avant la phase d'ensemencement des cellules. Dans ce but, $100 \text{ }\mu\text{L}$ du supplément sont incubés pendant 30 minutes sur le film et ensuite deux rinçages de 5 minutes avec $100 \text{ }\mu\text{L}$ de PBS sont réalisés pour éliminer les protéines et autres facteurs non adsorbés.

2.1.2.5. Modification biophysique des films de gélatine par ajout de particules

Pour modifier les propriétés biophysiques des films de gélatine et plus particulièrement pour faire varier leur rigidité, des nanoparticules de polystyrène de 100 nm de diamètre ont été incubées sur la surface du film. Deux types de particules ont été utilisées, des nanoparticules de polystyrène non marqués pour les expériences cellulaires (Polyspherex) et des nanoparticules de polystyrène marquées avec une sonde fluorescente verte (Fluorophorex) pour la visualisation au microscope confocal (tableau 14).

Type de particule	Diamètre (nm)	Concentration	Densité (g.mL ⁻¹)	Excitation/ Emission	Fournisseur
Polyspherex	100	10 mg.mL ⁻¹ (1.82 x10 ¹³ particules.mL ⁻¹)	1.05-1.06	/	Phosphorex (US)
Fluorophorex (fluorescence verte)	100	10 mg.mL ⁻¹	1.05-1.06	(445/500 nm)	Phosphorex (US)

Tableau 14. Propriétés des nanoparticules de polystyrène utilisées.

Les particules ont été préparées dans un tampon PBS à différentes dilutions (de 1/1000 à 1/50) à partir de la solution mère à 10 mg.mL⁻¹ et elles ont été incubées (100 µL) sur le film pendant 30 minutes avant l'étape de réticulation. Ensuite deux étapes de rinçage de 5 minutes avec 100 µL de PBS ont été réalisées pour éliminer les particules non adsorbées. La répartition des particules dans le film a été caractérisée par microscopie électronique à balayage.

2.1.2.6. Chargement d'antimicrobiens dans les films de gélatine

Pour conférer une activité antimicrobienne aux films de gélatine et donc pour pouvoir effectuer des expériences de culture cellulaire sans ajout d'antimicrobiens/antifongiques dans le milieu de culture, nous avons décidé d'incuber ces molécules antimicrobiennes directement dans le film de gélatine. A cet effet deux antimicrobiens différents ont été testés.

Dans un cas, 100µL du mélange pénicilline/streptomycine (GibcoBRL) à 100 µg.mL⁻¹ a été incubé pendant 1 heure sur le film de gélatine. Ce mélange est couramment utilisé comme ajout dans le milieu de culture lors des expériences de culture cellulaire.

La seconde molécule antimicrobienne testée est la catestatine. Cette molécule est un peptide antimicrobien cationique d'une longueur de 21 acides aminés et ce peptide est synthétisé dans notre laboratoire (Aslam *et al.* 2012). Pour réaliser l'expérience, 100 µL de catestatine à 100 µmol.L⁻¹ dans du PBS ont été incubés pendant 1 heure sur le film de gélatine.

2.2. Analyses biologiques

2.2.1. Culture cellulaire

Les cellules sont entretenues dans des boîtes de culture à fond plat T75 cm² provenant de la société Corning et placées dans une étuve thermostatée à 37°C sous une atmosphère humide à 5% de CO₂. A chaque passage, les cellules sont lavées avec une solution de phosphate salin 1X stérile, puis une solution de trypsine (TrypLE Express, Gibco) est déposée pour détacher les cellules de la boîte. La boîte est alors placée dans l'incubateur environ 5 minutes, le temps nécessaire pour que l'enzyme hydrolyse les protéines membranaires des cellules au niveau des résidus lysine et arginine. Du milieu de culture est ajouté dans la boîte afin de stopper l'activité de l'enzyme. Les cellules sont ensuite dissociées et homogénéisées, puis une fraction de cette solution est remise dans une nouvelle boîte de culture contenant du milieu de culture frais.

2.2.1.1. Culture des cellules endothéliales (HUVEC)

Les cellules endothéliales (HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell, Promocell) sont cultivées (passages 4 à 6) dans le milieu de culture « Endothelial cell growth medium » (Promocell) supplémenté avec 1% d'antibiotiques pénicilline/streptomycine (GibcoBRL) à 100 µg/mL et 12.5 mL de « Endothelial Cell Growth Medium SupplementMix C-39215 » (Promocell).

2.2.1.2. Culture des fibroblastes (3T3)

Les fibroblastes de souris NIH 3T3 (ATCC, Etats Unis) sont cultivés (passages 4 à 6) dans le milieu de culture « DMEM High glucose » (GE Healthcare LifeSciences) 4.5 g/L de glucose supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (v/v) (GibcoBRL) et 1% d'antibiotiques pénicilline/streptomycine (v/v) (GibcoBRL).

2.2.1.3. Culture des cellules Ptk2

Les cellules épithéliales de rein de kangourou, PtK2 (« *Potorous Tridactylis Kidney* », ATCC), sont cultivées (passages 6 à 10) dans le milieu de culture « *Eagles Minimum Essential Medium* » (EMEM, de ATCC) supplémenté avec 10% de SVF (v/v) et 1% d'antibiotiques pénicilline/streptomycine (v/v).

2.2.1.4. Culture des fibroblastes gingivaux humains (HGF)

Les fibroblastes gingivaux humains (HGF, Human Gingival Fibroblast) sont cultivés (passages 8 à 13) dans le milieu de culture « DMEM low glucose » (GibcoBRL) supplémenté avec 10% de SVF (v/v) et 1% d'antibiotiques pénicilline/streptomycine (v/v). Les cellules HGF ont été isolées à partir de gencives de patients après consentement et en accord avec le comité éthique de régulation de la faculté de chirurgie dentaire de Strasbourg.

2.2.2. Ensemencement des cellules sur les films de gélatine

Pour toutes les expériences cellulaires, un seul protocole d'ensemencement des cellules est utilisé. Les films de gélatine sont d'abord réticulés dans des boîtes de 24 puits (ou incubés avec des particules avant la réticulation pour certaines expériences) sous le PSM (poste sécurité microbiologique) pour travailler en condition stérile. Ensuite, en fonction des conditions testées, le sérum (SVF ou « Endothelial Cell Growth Medium SupplementMix C-39215 ») est incubé sur le film. Cette condition de culture cellulaire sans ajout de sérum dans le milieu de culture est dénommée « **Starvation Medium + serum released** » lorsque le film de gélatine est préalablement chargé en supplément. Si le sérum est ajouté dans le milieu de culture ce qui correspond aux conditions normales de culture cellulaire avec un film de gélatine non chargé, la condition est dénommée « **Normal Medium** ». Enfin si le sérum n'est pas ajouté dans le milieu de culture et que les films de gélatine ne sont pas chargés, on dénomme la condition « **Starvation Medium** ». Tous les films sont ensuite stérilisés 15 minutes sous rayonnement UV (tableau 15).

Nom de la condition expérimentale	Abréviation	Milieu de culture sans sérum	Milieu de culture avec sérum	Film de gélatine non chargé en sérum	Film de gélatine chargé en sérum
Normal medium	NM		X	X	
Starvation Medium + serum released	SM + serum released	X			X
Starvation medium	SM	X		X	

Tableau 15. Différentes conditions pour la culture cellulaire.

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de 75 cm³ jusqu'à confluence. Ensuite elles sont détachées par trypsination (TrypLE Express, Gibco) en ajoutant 4 mL de trypsine et en mettant les cellules 5 minutes à 37°C. Pour stopper l'action de la trypsine, 6 mL de milieu de culture sont ajoutés et les cellules sont centrifugées (5 minutes, 1200 rpm). Après la centrifugation, les cellules sont reconcentrées dans 1 mL de milieu de culture, elles sont comptées à l'aide d'une cellule de Neubauer et elles sontensemencées à une concentration de 5×10⁴ cellules par film (soit 4.42×10⁴ cellules/cm²). Les films sont mis 15 minutes à l'étuve (37°C, 5% CO₂) pour permettre l'adhésion; pour terminer, 500 mL de milieu de culture (avec ou sans supplément en fonction des conditions testées) sont ajoutés dans chaque puits de culture. L'expérience se déroule pendant 3 jours sans renouveler le milieu de culture.

Dans le cas des expériences avec les cellules HGF, les cellules sont cultivées sur les films de différentes rigidités (en fonction du nombre de nanoparticules incubées sur le film) pendant seulement 24 heures. Ensuite des marquages du cytosquelette sont effectués et l'aire des cellules est mesurée en fonction de la rigidité du substrat.

2.2.3. Activité métabolique des cellules

Pour tester l'activité métabolique des cellules, nous avons utilisé un kit à base de résazurine «*In vitro* Toxicology Assay Kit, Resazurin based test » (Sigma-Aldrich). La résazurine est un composé initialement non fluorescent qui va être réduit par l'activité métabolique mitochondriale des cellules en résorufine, un composé rouge et fluorescent (figure 57). Ce test réalisé sur des cellules vivantes présente l'avantage de ne pas être destructif pour les cellules, les échantillons peuvent alors être conservés et réutilisés pour des temps de culture plus longs.

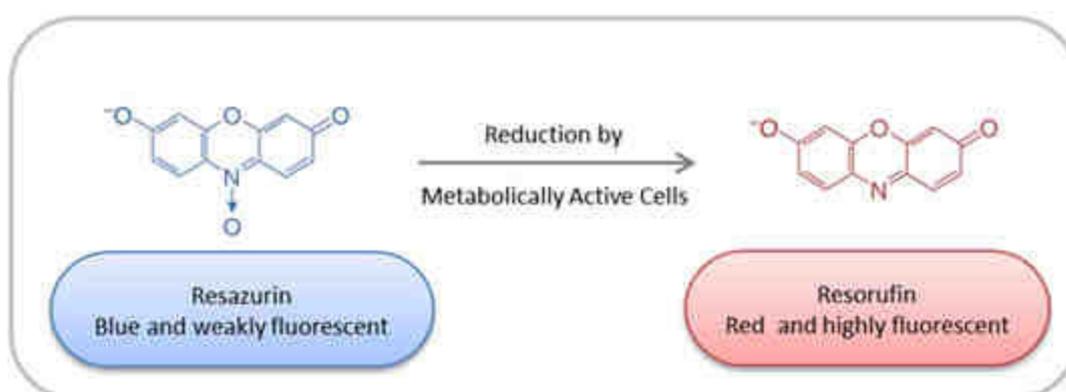


Figure 57. Principe de fonctionnement du test résazurine basé sur une réaction d'oxydo-réduction.

Dans le cadre de nos travaux, ces tests ont été réalisés après le jour 1 et le jour 3 de culture cellulaire. Pour cela une solution de résazurine à 10% (v/v) dans du milieu de culture a été préparée et 500 μ L de cette solution ont été déposés dans chaque puits. La plaque de 24 puits a été mise pendant 2 heures à l'étuve et la fluorescence a été relevée à l'aide d'un spectrofluorimètre ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 560/590$ nm).

2.2.4. Viabilité cellulaire

Pour étudier la viabilité cellulaire durant nos expériences, nous avons utilisé un kit permettant de quantifier simultanément l'apoptose, la nécrose et les cellules vivantes «Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit » (Promokine). En effet, il existe deux types de mort cellulaire différents. La nécrose apparaît généralement après une lésion cellulaire d'origine chimique ou physique et résulte d'un processus dégénératif. L'apoptose, quant à

elle, est une mort cellulaire programmée qui est dépendante de l'expression de gènes spécifiques conduisant à l'autodestruction cellulaire. On peut la définir comme un « suicide cellulaire » génétiquement programmée. La migration de certains phospholipides comme la phosphatidylserine (PS) de l'intérieur de la membrane cytoplasmique vers l'extérieur est caractéristique de l'apoptose. Ce kit utilise l'annexine V marquée avec de la FITC (fluorescence verte), qui se lie spécifiquement à la PS pour identifier les cellules apoptotiques. Le même kit utilise également l'éthidium homodimère III qui marque les cellules nécrotiques en rouge. Enfin la solution Hoechst 33 358 également intégrée dans le kit est utilisée pour marquer le noyau de toutes les cellules (fluorescence bleue).

Ce test est réalisé après 3 jours d'expérience juste après le test résazurine. Le film est rincé deux fois avec du PBS pour éliminer les traces de résazurine. Ensuite la solution de marquage est préparée en mélangeant 5 μ L de chaque marqueur dans 100 μ L de solution tampon fournie dans le kit. 50 μ L de la solution de marquage sont déposés sur chaque film qui est rincé deux fois avec du PBS après 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite observées après fixation avec le PFA (paraformaldéhyde) avec un microscope à épifluorescence (Nikon TE200) équipé de filtres appropriés pour observer les fluorescences verte, rouge et bleue.

2.2.5. Fixation / perméabilisation

Avant d'effectuer des marquages immuno-fluorescents, les cellules sont rincés deux fois avec du PBS et elles sont fixées dans du PFA (Sigma-Aldrich). La solution de PFA (300 μ L) à 3.7% (v/v) est incubée sur chaque film avec les cellules pendant 15 minutes à température ambiante. Après deux lavages au PBS, les cellules fixées sont perméabilisées avec une solution à 0.1% (v/v) de triton X-100 (t-octylphenoxy polyethoxyethanol, Sigma-Aldrich) dans le PBS pendant 15 minutes à température ambiante. Pour finir, les cellules sont incubées pendant une nuit à 4°C avec une solution de SVF (10% v/v).

2.2.6. Marquages fluorescents

2.2.6.1. Marquages fluorescents des HUVECs

2.2.6.1.1. PECAM-1

PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule) est une glycoprotéine exprimée sur la surface des cellules et responsable de l'adhésion ces cellules. Nous avons utilisé des anticorps de cette protéine marqués avec un fluorophore pour visualiser les contacts entre les différentes cellules. Ainsi, 90 μL d'anticorps primaire PECAM-1 (PECAM-1 goat antibody, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Santa Cruz) à une dilution de 1/50 dans du PBS ont été incubés pendant 90 minutes sur chaque échantillon et deux rinçages avec du PBS ont été réalisés. Ensuite 300 μL d'anticorps secondaire (goat anti donkey FITC, 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Santa Cruz) à une dilution de 1/100 dans du PBS ont été incubés pendant 30 minutes. Après cette étape, les contacts entre les cellules sont visualisés grâce à la fluorescence émise par la FITC.

2.2.6.1.2. Marquage du cytosquelette (rhodamine-phalloïdine)

Après le marquage PECAM, un marqueur est utilisé pour visualiser le cytosquelette des cellules : la phalloïdine. En effet, la phalloïdine possède une forte affinité pour les filaments d'actine, situés dans le cytosquelette, et donc en couplant cette molécule avec de la rhodamine on peut observer ces filaments au microscope à épi-fluorescence (fluorescence rouge). Après deux rinçages avec du PBS, 300 μL de solution de rhodamine-phalloïdine (0.5 mg.mL^{-1} , Sigma-Aldrich) à une dilution de 1/100 dans du PBS ont été incubés pendant 15 minutes sur chaque film.

2.2.6.1.3. Marquage du noyau

Le marquage du noyau ou plus précisément de la chromatine est réalisé à l'aide d'une solution colorée Hoechst 33 358 (fluorescence bleue) qui rentre dans la cellule (fixée ou non), par libre diffusion. 300 μL de solution Hoechst 33 358 (1 mg.mL^{-1} , Sigma-Aldrich) à une dilution de 1/50 dans du PBS ont été incubés pendant 5 minutes sur chaque film.

L'ensemble de ces marquages est observé avec le microscope à épi-fluorescence (Nikon TE200) équipé avec les filtres appropriés pour observer les fluorescences verte, rouge et bleue. Jusqu'à l'observation, les échantillons sont maintenus à 4°C dans du PBS.

2.2.6.2. Marquages fluorescents des fibroblastes

Pour marquer les cellules 3T3 et les cellules HGF, les mêmes marquages fluorescents ont été réalisés à l'exception du PECAM-1 qui n'a pas été utilisé.

2.2.6.3. Marquages fluorescents des Ptk2

Pour marquer les cellules Ptk2, tous les marquages sont les mêmes à l'exception du PECAM qui est remplacé par le marquage à la vinculine. La vinculine est un marqueur des contacts focaux et permet d'observer le cytosquelette et les points d'ancrage de la cellule sur la surface. Ce marquage permet d'obtenir des informations sur la morphologie et le comportement des cellules.

Pour réaliser ce marquage, 90 µL d'anticorps primaire vinculine (vinculin mouse antibody, 1mg.mL⁻¹, Sigma-Aldrich) à une dilution de 1/100 dans le PBS ont été incubés pendant 90 minutes. Après deux rinçages avec du PBS, 300 µL d'anticorps secondaire (Alexa Fluor 488 goat anti mouse, 2 mg.mL⁻¹, Invitrogen) à une dilution de 1/500 dans du PBS ont été incubés pendant 35 minutes. Après cette étape, les contacts focaux sont marqués en vert (Alexa Fluor 488).

2.2.7. Activité antimicrobienne

Pour tester l'activité antimicrobienne des films de gélatine contenant soit la catestatine soit le mélange pénicilline/streptomycine, nous avons utilisé la souche bactérienne *S. aureus* (ATCC 25923). Les activités antimicrobiennes ont été testées aux jours 1 et 2 après mise en contact avec les bactéries. À cette fin, les souches bactériennes ont été précultivées de manière aérobie à 37°C dans du milieu MBH (Mueller Hinton Broth, Merck, Allemagne) à

pH 7.3. Ensuite une colonie a été transférée dans 10 mL de milieu MBH à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité de 10^6 bactéries.mL⁻¹. Enfin 250 µL de solution pathogène ont été incubés sur les différents films de gélatine à 37°C et la mesure de la croissance bactérienne a été réalisée par lecture de la densité optique à 620 nm après 1 et 2 jours d'expérience. Les contrôles positifs ont été réalisés avec une solution contenant de la tétracycline (10 µg.mL⁻¹) et de la céfotaxime (0.1µg.mL⁻¹).

2.2.8. Quantification de la dégradation des films de gélatine

Pour évaluer la dégradation des films de gélatine, nous avons utilisé un kit « Sirius Red/Fast Green Collagen Staining Kit » (Chondrex) permettant de déterminer la quantité de collagène d'un échantillon. En effet, comme la gélatine est du collagène dénaturé, ce kit peut également s'appliquer pour quantifier la masse de gélatine présente dans l'échantillon. Ce kit est composé de deux pigments, un pigment qui se lie spécifiquement au collagène (Sirius Red) et un autre qui se lie aux protéines autres que le collagène (Fast Green). Sirius Red et Fast Green absorbent respectivement à 540 et 605 nm. La masse de gélatine se déduit des mesures d'absorbance par la relation suivante :

$$\text{Masse de gélatine } (\mu\text{g}) = (\text{OD}_{540} - \text{OD}_{605} \times 0.291)/0.0378 \quad (1)$$

Avant de réaliser ce test, les films de gélatine réticulés et non réticulés ont été placés pendant 3 jours dans 2 mL de PBS à 37°C. Ensuite, 0.2 mL de la solution colorée (dye solution) est incubé sur chaque film pendant 30 minutes. Puis la solution est retirée et le film est rincé abondamment avec de l'eau distillée. Pour terminer 1 mL de solution tampon d'extraction est ajouté (solution basique) pour dissoudre le film et l'absorbance de la solution est lue à 540 et 605nm à l'aide d'un spectrofluorimètre.

Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus pour un film de gélatine non dégradé (film non incubé dans PBS) et permettent le calcul du pourcentage de dégradation.

2.3. Méthodes d'analyse et caractérisation des films multicouches, des films de gélatine et des cellules

2.3.1. Microscopie confocale

2.3.1.1. 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 58). Soumise à une excitation lumineuse de longueur d'onde donnée, la molécule fluorescente est portée dans un état vibronique excité (S_2). 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).

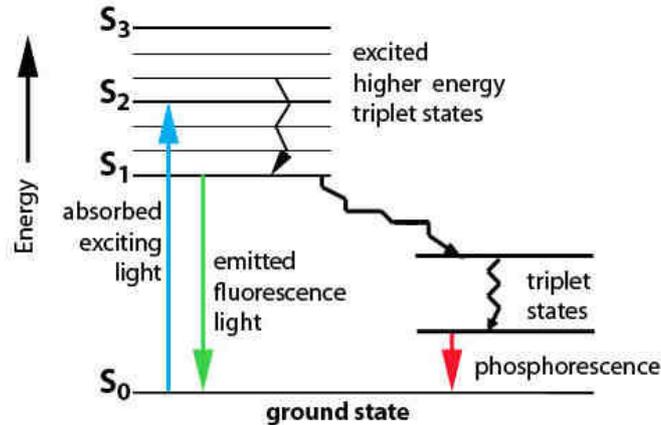


Figure 58. Diagramme de Jablonski. La molécule fluorescente initialement à l'état fondamental S_0 absorbe de l'énergie lumineuse (1) et se retrouve à l'état excité S_2 . Lors de la désexcitation, la molécule perd d'abord de l'énergie par conversion interne (2) (vibrations, chocs moléculaires) et se retrouve 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).

2.3.1.2. 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.

2.3.1.3. 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, une ouverture de filtrage appelée pinhole (« trou d'aiguille ») est placée en amont du détecteur et ne laisse passer que la lumière en provenance du point focal (figure 59). L'image ainsi obtenue présente un bon rapport signal/bruit.

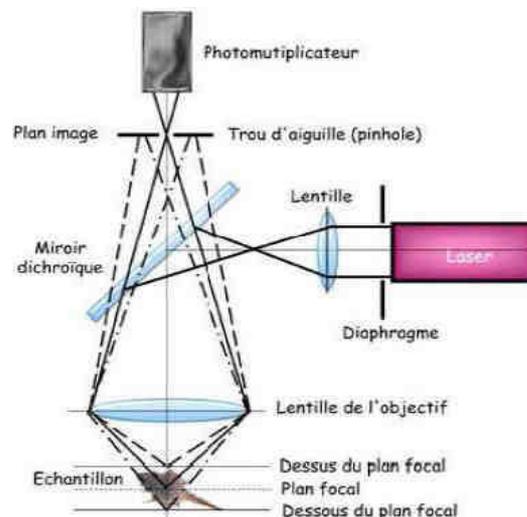


Figure 59. Schéma de principe d'un microscope confocal à balayage laser. La source laser est condensée par l'intermédiaire d'une première lentille, d'un miroir dichroïque et de l'objectif en un point focal. La fluorescence émise par l'échantillon est ensuite recueillie par un photomultiplicateur. Pour éliminer la fluorescence parasite (ligne en pointillés; il n'y a pas de ligne en pointillés), l'ouverture de filtrage (pinhole) est disposée au niveau du plan image de l'objectif.

Le balayage de l'échantillon par le laser, en tout point (x, y) de l'échantillon 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 focaux de l'échantillon et de reconstituer la structure de l'objet en trois dimensions avec une résolution latérale et normale respectivement de 0.15 μm et 0.5 μm 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 du microscope est le mode réflexion que nous avons utilisé pour l'observation des films multicouches. Dans ce mode, la même lentille sert à focaliser la source et à former l'image sur le détecteur.

2.3.1.4. Reconstitution d'images

Le faisceau laser se déplace par lignes pour imager un plan (xy). 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 (xy) du film est prise successivement pour chaque position. L'image tridimensionnelle peut alors être reconstituée et l'objet peut être visualisé par tranches, dans différents plans à l'aide du logiciel Zeiss LSM Image Browser (figure 60).

Les lasers les plus couramment utilisés sont :

- Laser Argon émettant à trois longueurs d'onde : 459 nm, 488 nm (bleu) et 514 nm (bleu-vert),
- Laser Hélium Néon I: 543 nm (vert),
- Laser Hélium Néon II: 633 nm (rouge).

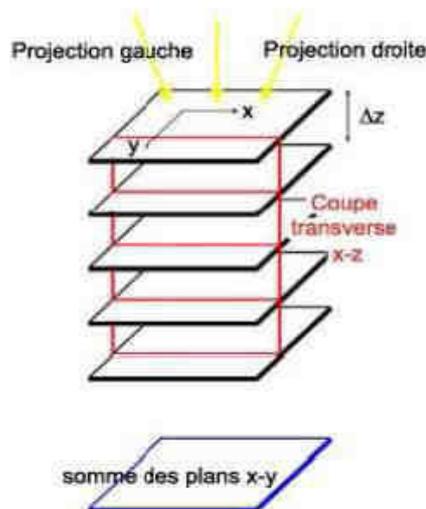


Figure 60. Principe de reconstitution d'images en 3D. Une image numérique (x,y) est réalisée à différentes hauteurs en z avec un pas de déplacement constant Δz et l'image en 3D est reconstituée en effectuant la somme de tous ces plans. On peut alors accéder aux coupes transversales suivant les plans verticaux (x,z) et (y,z). La résolution verticale du microscope confocal dépend de la longueur d'onde utilisée et se situe à environ 500 nm.

2.3.1.5. Procédure

Au cours des expériences de microscopie confocale, nous avons utilisé la raie 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 avec des sondes fluorescentes, généralement la fluorescéine isothiocyanate (FITC, excitation 488 nm/émission 520 nm) ou bien la rhodamine (Rho, excitation 570 nm/émission 595 nm).

Sur les films multicouches dont au moins l'un des polyélectrolytes diffuse à travers l'ensemble de la construction, le dépôt d'un polyélectrolyte marqué permet de visualiser l'intégralité du film et donc d'estimer son épaisseur. Ainsi, pour obtenir un marquage complet du film, le polyélectrolyte est déposé en couche terminale pendant 15 minutes. Le microscope confocal utilisé disposant de plusieurs lasers, il est possible de co-marquer les films multicouches à l'aide de deux sondes fluorescentes différentes.

Le même principe est utilisé pour visualiser les films de gélatine et estimer leur épaisseur. Pour cela, de la PLL^{FITC} ou de la BSA^{FITC} est incubée sur le film pendant 30 minutes pour permettre sa diffusion dans tout le film; ensuite le film peut être visualisé au

microscope confocal. Le microscope confocal est aussi utilisé pour vérifier le chargement uniforme d'une protéine (par exemple le VEGF^{Rho} et la BSA^{FITC}) dans le film de gélatine.

2.3.2. Fluorimètre et spectrofluorimètre

2.3.2.1. Fluorimétrie

2.3.2.1.1. Principe

La théorie concernant le fluorimètre est basée sur le phénomène de fluorescence expliqué ci-dessus. Le principe de fonctionnement de cet appareil est le suivant : la lumière d'une source d'excitation passe par un filtre ou un monochromateur, puis par l'échantillon (figure 61). Une partie de cette lumière peut être absorbée, induisant la fluorescence de certaines molécules de l'échantillon. Une partie de la lumière de fluorescence est ensuite concentrée sur un filtre ou un monochromateur, qui est parfois placé à un angle de 90 par rapport à la lumière d'excitation. La lumière est ensuite recueillie par un détecteur. Cette technique nous permet l'analyse quantitative de l'intensité de fluorescence contenue dans un échantillon.

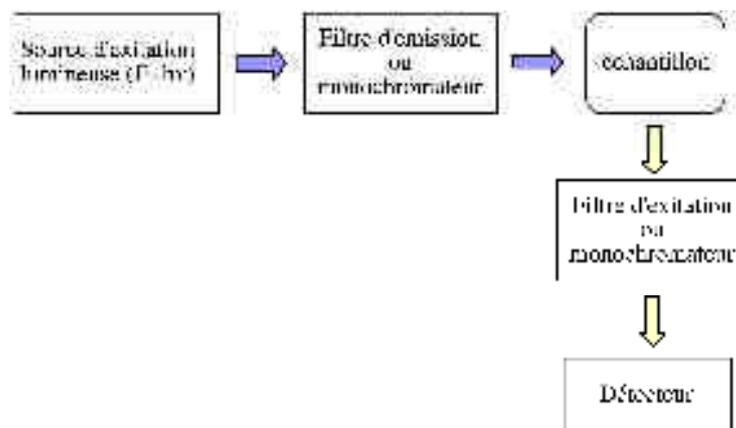


Figure 61. Principe de fonctionnement du fluorimètre.

2.3.2.1.2. Procédure

Pour les expériences de libération de molécules à partir des films multicouches de polyélectrolytes (concerne les molécules de paclitaxel Oregon Green 488 conjugate et PLL^{FITC}), nous avons utilisé le fluorimètre Bio-RAD Versafluor (France) (figure 62). La source d'excitation est une lampe halogène avec un spectre d'émission entre 350-900 nm. Ce fluorimètre nous permet d'analyser la fluorescence émise dans des longueurs d'onde "vertes"

car il possède un filtre d'excitation entre 485 et 489 nm et un filtre d'émission entre 515 et 525 nm. Il est parfaitement adapté à la détection de la fluorescéine (FITC) puisque cette sonde fluorescente absorbe à 488 nm et émet à 520 nm.



Figure 62. Fluorimètre Bio-RAD Versafluor.

Pour effectuer nos analyses, nous transférons la solution à analyser dans une cuvette (environ 300 μ L) et nous réglons la sensibilité de l'appareil sur « medium » pour éviter la saturation par le signal de fluorescence émis par nos échantillons. Après chaque relevé, le surnageant (solution tampon NaCl/Tris) est intégralement renouvelé.

2.3.2.2. Spectrofluorimétrie

2.3.2.2.1. Principe

Le principe du spectrofluorimètre est le même que celui du fluorimètre présenté ci-dessus en ce qui concerne la mesure de l'intensité de fluorescence. Cependant, il permet de travailler sur une plage spectrale plus importante à l'excitation et à l'émission (de 200 nm à 1000 nm) ce qui rend possible l'analyse de fluorophores différents et cela même simultanément. De plus, la sensibilité peut être ajustée en faisant varier la tension du photomultiplicateur (détecteur de photons) ce qui permet de travailler à des concentrations très faibles. Pour réaliser nos expériences, nous avons utilisé le spectrofluorimètre Xenius XC (SAFAS, Monaco) (figure 63). Cet appareil permet la lecture de la fluorescence en cuve ou en microplaque.



Figure 63. Spectrofluorimètre Xenius XC SAFAS.

2.3.2.2.2. Procédure

Dans le cadre du s projet concernant les films de gélatine, le spectrofluorimètre a été tout d'abord utilisé pour les expériences de libération d'une seule protéine en utilisant des protéines marquées comme la BSA^{FITC} et le VEGF^{FITC}. Dans cette étude, les protéines ont été incubées pendant 30 minutes sur les films de gélatine à 1 mg.mL⁻¹ pour la BSA^{FITC} (200 µL) et à 236 µg.mL⁻¹ pour le VEGF^{FITC} (50 µL). Deux rinçages avec du PBS ont été réalisés; ensuite les échantillons ont été mis à 37°C dans du PBS. Pour chaque relevé, l'intensité de fluorescence de 300 µL du surnageant a été mesurée; ensuite le surnageant est intégralement renouvelé. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission utilisées pour les deux protéines marquées sont les suivantes :

- BSA^{FITC} : $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 495 \text{ nm} / 520 \text{ nm}$
- VEGF^{FITC} : $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 488 \text{ nm} / 520 \text{ nm}$

Le spectrofluorimètre a également été utilisé pour la mesure de l'activité métabolique des cellules. L'intensité de fluorescence de 100 µL de la solution de résazurine (préalablement incubée pendant 2 heures à 37°C) a été mesurée à la longueur d'onde de 590nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 560 \text{ nm} / 590 \text{ nm}$).

2.3.2.2.3. Mesure de l'absorbance

Le spectrofluorimètre Xénius XC est également équipé pour la mesure de l'absorbance dans le domaine UV-Visible-IR (de 200 nm à 900 nm) et donc nous l'avons utilisé pour la mesure de la dégradation des films de gélatine avec le kit « Sirius Red/Fast Green Collagen Staining ». Dans ce but, l'absorbance de 300 µL de la solution récupérée après le test a été mesurée aux longueurs d'ondes 540 nm et 605 nm et ensuite la formule (1) a été appliquée pour calculer la masse restante de gélatine dans l'échantillon. Le même spectromètre a été utilisé pour lire l'absorbance à 620 nm dans les expériences d'activité microbienne.

2.3.3. Microscopie à épi-fluorescence

2.3.3.1. Principe

Le microscope optique à épi-fluorescence permet d'observer des objets de petite taille (résolution $0.2 \mu\text{m}$) et de séparer des détails de cette image indiscernables à l'œil nu (résolution de l'œil : $100 \mu\text{m}$). Par exemple, le microscope à épi-fluorescence équipé d'une caméra permet de détecter la lumière émise par des échantillons auto-fluorescents ou des échantillons marqués avec des sondes fluorescentes. Un tel microscope permet de soustraire la lumière excitatrice émise par la source lumineuse pour ne visualiser que la fluorescence propre de l'échantillon.

Pour réaliser nos expériences, nous avons utilisé le microscope Nikon Ellipse TE200 (figure 64) qui est équipé en champ clair en épi-fluorescence. La source lumineuse émettant un spectre caractéristique dans le visible est une lampe à arc HBO (remplie de mercure à haute pression). Le microscope est équipé de filtres pour la FITC (488 / 520 nm), pour la rhodamine (560 / 590 nm) et pour le DAPI (377 / 447 nm). Les images sont capturées à l'aide d'une caméra numérique (DMX1200, Nikon).



Figure 64. Microscope à épi-fluorescence Nikon TE200.

2.3.3.2. Procédure

Le microscope à épi-fluorescence Nikon a été utilisé pour visualiser les différentes cellules étudiées (HUVEC, 3T3, PtK2, HGF) au cours des tests de viabilité et de marquage fluorescent du cytosquelette et du noyau. Lors des tests effectués avec les cellules HGF, les images des filaments d'actine obtenues avec le microscope ont été analysées avec le logiciel

ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014) pour calculer l'aire des cellules et ainsi étudier l'influence de la rigidité du substrat sur l'étalement cellulaire.

2.3.4. Microbalance à cristal de quartz

2.3.4.1. Principe

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. Le cristal se présente sous la forme d'un disque de quartz de 0.3 mm d'épaisseur, entouré de deux électrodes en or, l'une d'entre elles étant recouverte de silice (figure 65).

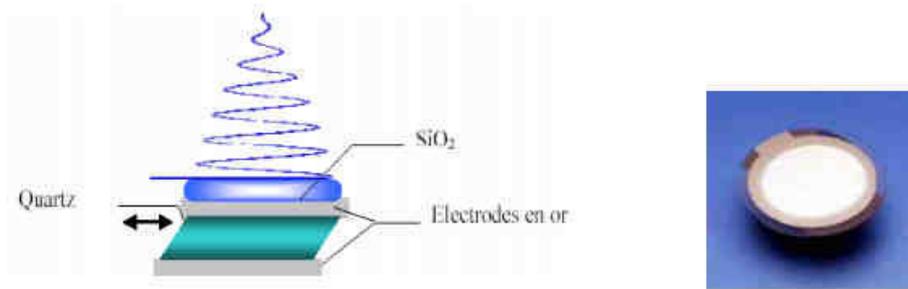


Figure 65. A) Schéma de principe d'un cristal de quartz entouré par deux électrodes en or et recouvert d'une couche de SiO₂. La différence de potentiel appliquée entre les électrodes induit une contrainte de cisaillement sur le cristal perpendiculairement au champ électrique appliqué. (B) cristal de quartz.

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 :

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

où M représente la masse de l'oscillateur (le cristal de quartz) et k sa constante de raideur. Lors du 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 :

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{M+m}} \approx f_r \left(1 - \frac{m}{2M}\right) \quad (3)$$

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 :

$$\Delta f = f - f_r = \frac{-mf_r}{2M} = -\frac{m}{C} \quad (4)$$

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

$$C = \frac{2M}{f_r} \quad (5)$$

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 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$. 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 (νf 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_ν par la relation de Sauerbrey:

$$m = -C \frac{\Delta f_\nu}{\nu} \quad (6)$$

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. Pour cela, on tiendra compte d'un nouveau

paramètre expérimental mesuré : le facteur de dissipation visqueuse noté D qui est lié aux propriétés viscoélastiques du film déposé et qui est donné par la relation :

$$D = \frac{1}{\pi f \tau} \quad (7)$$

où f représente la fréquence d'oscillation et τ le temps caractéristique d'amortissement de l'oscillation de l'ensemble quartz-dépôt liquide.

On parle alors de microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation (QCM-D). A partir des mesures de l'évolution des fréquences et de la dissipation, une analyse peut être réalisée grâce au modèle proposé par Voinova et al. (Voinova et al. 1999). Un programme d'ordinateur a été élaboré au laboratoire pour déterminer l'évolution de l'épaisseur des dépôts ainsi que la viscosité et le module élastique de cisaillement pour des films multicouches de polyélectrolytes (Zhang *et al.* 2005; Boisseau et Lahmani 2009).

2.3.4.2. 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 66).



Figure 66. Microbalance à cristal de quartz 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 du cristal (~ 5 MHz) et

de ses harmoniques ($\sim 15, 25$ et 35 MHz). L'excitation du cristal est imposée sur une durée très brève (quelques μs). 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 subissent un amortissement dû à l'énergie dissipée dans le cristal, 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 quatre fréquences d'excitation ($5, 15, 25$ et 35 MHz). Cette dissipation renseigne en principe sur les propriétés viscoélastiques des films.

2.3.4.3. Procédure

Cette technique de QCM-D a été utilisée dans ce travail pour mettre en évidence la dégradation enzymatique des films PLL/HA par la trypsine. Un film (PLL/HA)₅ a été construit *in situ* dans l'appareil et ensuite une solution de trypsine a été injectée. Les mesures de la fréquence de résonance ont été effectuées pour trois harmoniques ($\nu = 3, 5$ et 7). En première approximation, nous pouvons dire qu'une diminution de la fréquence de résonance équivaut à une augmentation de la masse adsorbée sur le cristal et vice versa.

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 polyélectrolytes se fait dans la chambre de mesure de l'appareil où se trouve le cristal de quartz. Tout d'abord, on injecte $600\ \mu\text{L}$ de la solution de polycation (PLL) 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 (solution tampon NaCl/Tris) puis la solution de polyanion (HA) est injectée de façon similaire. Les étapes d'injection ($250\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) et de rinçage sont poursuivies jusqu'à obtenir le nombre de couches voulu (dans notre cas 5).

2.3.5. Microscopie à force atomique

2.3.5.1. Principe microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique (AFM, Atomic Force Microscopy) est une microscopie à champ proche développée dans les années 1980 avec la microscopie à effet tunnel (Binnig et Rohrer 1983). 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). Cette technique permet de balayer la surface de l'échantillon avec une pointe très fine de nitrure de silicium (Si_3N_4) qui joue le rôle d'une sonde. On obtient ainsi des données sur la topographie de l'échantillon. L'AFM est 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 données de topographie sont obtenues par la détection des interactions entre la pointe et la surface. La pointe est installée à l'extrémité d'un levier de constante de raideur connue et l'ensemble forme le micro-levier aussi appelé cantilever (figure 67). L'échantillon est fixé sur un tube piézo-électrique 3D qui permet le mouvement dans les trois 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 quadrants. La différence de potentiel entre les différents quadrants indique avec précision la déflexion 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 :

$$F = - k_c \Delta d \quad (8)$$

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

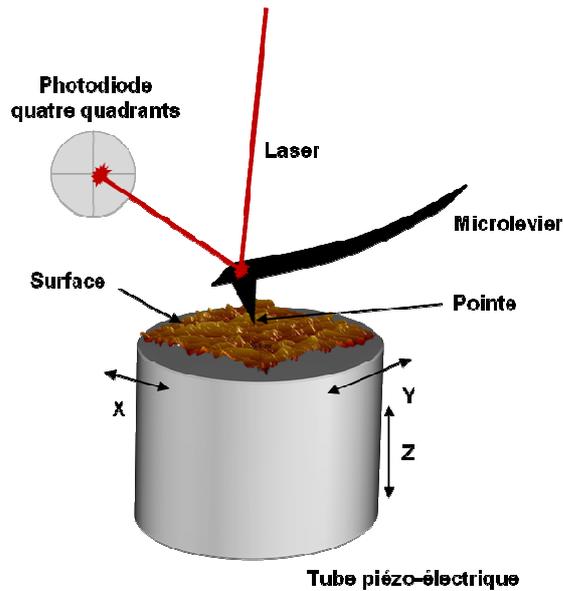


Figure 67. Principe de fonctionnement de l'AFM. L'échantillon est fixé sur un tube piézo-électrique. Les interactions entre la pointe et la surface génèrent la déflexion du micro-levier qui est mesurée optiquement grâce au laser. Le faisceau laser est réfléchi par l'extrémité du cantilever sur une photodiode. La tension mesurée par la photodiode indique la déflexion du micro-levier (Biophy Research).

2.3.5.2. Principe de la microscopie atomique par nano-indentation

Ces dernières années, une nouvelle utilisation de l'AFM a été développée pour déterminer les propriétés mécaniques de substrats et plus particulièrement leur rigidité exprimée par le module de Young (E). Cette technique est appelée AFM par nano-indentation (figure 68). La pointe sur le cantilever est généralement remplacée par une sonde colloïdale sphérique. Grâce au moteur piézoélectrique de l'AFM, des cycles de compression vont être appliqués localement sur l'échantillon. Ainsi, la sonde colloïdale applique une force de compression perpendiculaire à la surface de l'échantillon. Pour éviter d'endommager l'échantillon et le micro-levier, la force maximale est fixée. Le mouvement du quartz piézo-électrique est interrompu lorsque cette force est atteinte.

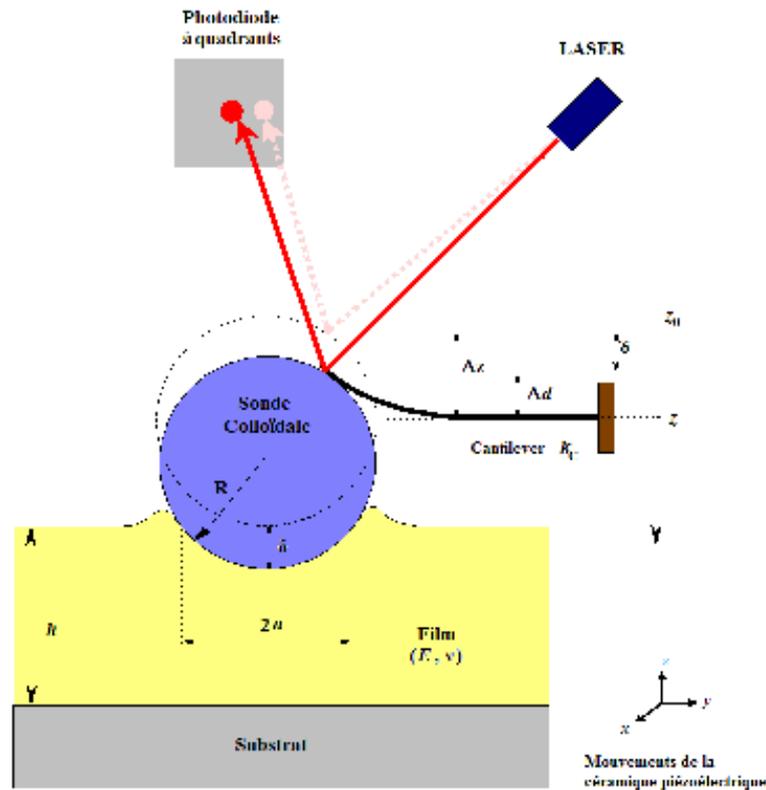


Figure 68. Principe fonctionnement de l'AFM par nanoindentation (schéma issu de la thèse de Grégory Francius, 2006).

Le module de Young (E) est calculé avec le modèle de Hertz (Francius *et al.* 2006; Guo et Akhremitchev 2006) en utilisant la relation reliant la force à l'indentation mesurée dans le cas d'un indenteur sphérique et un milieu supposé parfaitement élastique :

$$F = \frac{4ER^{1/2}}{3(1-\sigma^2)} \delta^{3/2} \quad (9)$$

où F est la force appliquée par le cantilever, R le rayon de la sonde colloïdale, σ le coefficient de Poisson ($\sigma = 0.5$ pour un milieu incompressible) et δ l'indentation. L'indentation est calculée par la différence entre le déplacement du quartz piézoélectrique Δz et la déflexion du cantilever Δd :

$$\delta = \Delta z - \Delta d \dots (10)$$

2.3.5.3. Procédure

Cette technique a été utilisée pour déterminer le module de Young des films de gélatine incubés avec des particules à différentes concentrations. Nous avons dilué la solution de nanoparticules de polystyrène de 1/50 à 1/1000 par rapport à la concentration initiale (10 mg.mL^{-1} soit $1.82 \times 10^{13} \text{ particules.mL}^{-1}$) dans du PBS et nous avons cherché à étudier l'influence de ce paramètre sur le module de Young du film de gélatine. Cette technique a également servi à déterminer la différence de module de Young entre un film de gélatine non réticulé et un film de gélatine réticulé avec de la transglutaminase. Ces expériences ont été menées par le groupe de Grégory Francius (LCPME : laboratoire de chimie physique et microbiologie pour l'environnement, CNRS, Nancy).

2.3.6. Microscopie électronique à balayage

2.3.6.1. Principe

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy) est une technique de microscopie basée sur les interactions électrons-matière. Un faisceau d'électrons balaie la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, émet des électrons secondaires et des rayons X). Ces particules et rayonnements sont analysés par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface (figure 69).

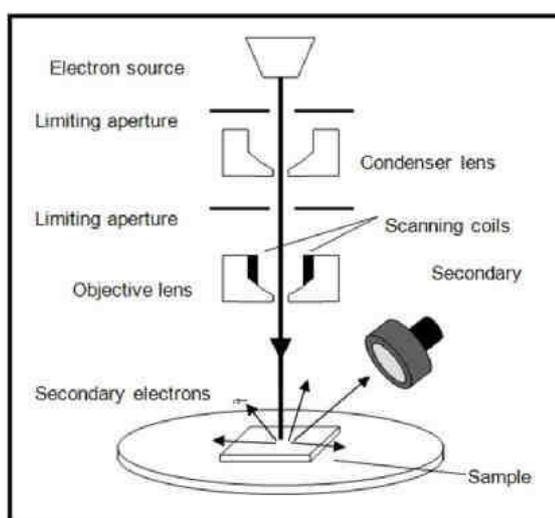


Figure 69. Principe de fonctionnement de la microscopie électronique à balayage (Université Warwick, Angleterre).

2.3.6.2. Procédure

Cette technique de microscopie a été utilisée pour caractériser la surface des films de gélatine (réticulé et non réticulé) et pour étudier la distribution des nanoparticules de polystyrène dans le film de gélatine. Les analyses ont été réalisées avec un microscope électronique à balayage environnemental (MEB Quanta, FEI, Etats Unis) (figure 70). La métallisation de l'échantillon pour rendre la surface conductrice n'est pas nécessaire avec un MEB environnemental.



Figure 70. MEB environnemental Quanta (FEI).

2.3.7. Couplage Spectrométrie de masse/ Electrophorèse capillaire

2.3.7.1. Principe de la spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules ou atomes par mesure de leur masse. L'échantillon est ionisé (création de molécules chargées) et les molécules sont séparées en fonction de leur rapport m/z (m est la masse de la molécule ou de l'atome et z le nombre de charges portées par la molécule ou l'atome). Le principe physique mis en œuvre pour déterminer le rapport m/z dépend du type d'analyseur équipant le spectromètre : les ions peuvent être soumis à un champ électrique (analyseur quadripolaire), un champ magnétique (analyseur FT-ICR) ou encore leur temps de vol libre peut être mesuré (analyseur TOF).

Les étapes de l'analyse par spectrométrie de masse sont les suivantes :

- **ionisation** : l'échantillon est porté à l'état gazeux et ionisé dans la source de l'appareil. Ce procédé conduit à un mélange statistique d'ions de fragmentation.
- **accélération** : les ions sont extraits de la source puis accélérés et focalisés par des lentilles électroniques (champ électrique).

- **séparation** : les ions sont ensuite séparés suivant leur rapport m/z par l'analyseur.
- **détection** : les ions sont recueillis par un détecteur.
- **identification** : les spectres correspondant aux différents peptides fragmentés sont ensuite entrés dans une des bases de données regroupant les protéines existantes et les composés sont identifiés.

2.3.7.2. Principe de l'électrophorèse capillaire (CE)

L'électrophorèse capillaire est une technique de séparation d'espèces ioniques. Les molécules chargées migrent dans un capillaire rempli d'un électrolyte sous l'effet d'un champ électrique. Les cations sont attirés lors de l'électrolyse par la cathode et les anions par l'anode. Les espèces chimiques sont séparées en fonction de leur charge et leur taille. En effet à état de charge équivalent, les espèces chimiques migrent à vitesse différente en fonction de leur rayon hydrodynamique.

2.3.7.3. Couplage CE-MS

L'analyse de mélanges complexes par MS nécessite l'utilisation d'une technique séparative. Positionnée en amont du spectromètre, une méthode séparative a pour principal intérêt de permettre le transfert progressif au spectromètre des différentes espèces du mélange. Dans notre cas, l'électrophorèse capillaire a été utilisée comme technique séparative en amont du spectromètre.

2.3.7.4. Procédure

Ces expériences ont été réalisées pour identifier les protéines présentes dans le supplément utilisé pour la culture cellulaire des HUVECs (« Endothelial Cell Growth Medium Supplement Mix C-39215 ») et pour suivre leur libération à partir du film de gélatine par l'analyse protéomique du surnageant aux jours 1 et 3. Ces expériences ont été menées par le groupe d'Emmanuelle Leize (LSINS : laboratoire de spectrométrie de masse des interactions et des systèmes, Strasbourg).

3.Elaboration de surfaces mécano-sensibles à base de films multicouches de polyélectrolytes pour libérer des molécules bioactives

3.1. Contexte et résumé

Dans ce chapitre, la méthode de dépôt de polyélectrolytes "couche par couche" a été utilisée pour concevoir des films répondant à des stimuli mécaniques pour libérer des molécules bioactives. En effet, depuis quelques années, l'utilisation de structures polymériques répondant à des stimuli externes est devenu un sujet de grand intérêt pour des applications de libération d'agents bioactifs. Parmi les structures polymériques utilisées, les films multicouches de polyélectrolytes présentent de nombreux avantages comme leur facilité de mise en œuvre, leurs propriétés (épaisseur, porosité, densité de charge) facilement modulables et leur application potentielle dans le domaine biomédical. De nombreux stimuli ont déjà été utilisés pour libérer des molécules bioactives à partir des films multicouches de polyélectrolytes comme la lumière, la température ou le changement de pH. Cependant, le stimulus mécanique n'a jamais été utilisé jusqu'à présent pour déclencher la libération de molécules bioactives bien que les contraintes mécaniques soient omniprésentes dans le corps humain avec par exemple la vasodilatation ou la vasoconstriction. L'objectif de ce travail est donc d'utiliser des contraintes mécaniques pour déclencher la libération de molécules bioactives.

Pour réaliser ses travaux, nous avons utilisé les films multicouches de polyélectrolytes constitués d'une strate « réservoir » poly(L-lysine)/acide hyaluronique (PLL/HA) et d'une strate « barrière » mécano-sensible constituée de poly(4-styrène sulfonate de sodium)/poly(allylamine) (PSS/PAH). Le film est composé de 30 bicouches de PLL/HA et 10 bicouches de PSS/PAH (notées respectivement (PLL/HA)₃₀ et (PSS/PAH)₁₀). La stratégie choisie consiste à étirer longitudinalement le film pour créer des fissures dans la barrière PSS/PAH et permettre la diffusion de molécules au sein du film pour ensuite déclencher sa dégradation. Une enzyme, la trypsine, présente initialement dans le surnageant, a été utilisée pour dégrader le film PLL/HA. En effet cette enzyme clive spécifiquement les liaisons amides entre les résidus lysines de la PLL. Ainsi, le film ne sera plus constitué de PLL mais seulement d'oligomères de lysine ce qui aboutira à la dissolution du film puis à sa complète dégradation. Ce processus ne se réalisera qu'après étirement du film lorsque la barrière PAH/PSS sera fissurée et que la trypsine pénétrera dans la couche « réservoir » PLL/HA. Pour permettre son étirement, le film est construit sur un support élastomérique, le silicone.

La première partie des travaux s'est basée sur la caractérisation du film « réservoir-barrière » et sur l'étude de la dégradation enzymatique du film sous étirement mécanique. Pour visualiser le film au microscope confocal et pour étudier la diffusion de l'enzyme sous étirement mécanique dans le film PLL/HA, la strate « réservoir » a été marquée avec la PLL^{FITC} (marquage du réservoir en vert) et la trypine a été marquée en rouge (TRY^{Rho}). Ces marquages ont permis d'une part de visualiser la structuration du film en strate et barrière et d'autre part suite à l'application d'une contrainte mécanique d'étirement ($\alpha = 30\%$), l'apparition des fissures dans la barrière PAH/PSS a pu être observée.

La libération des oligomères de PLL^{FITC} résultant de la dégradation enzymatique du film par la trypine a été étudiée par microscopie confocale et par fluométrie. Le film de structure (PLL/HA)₃₀-PLL^{FITC}/HA-(PAH/PSS)₉/(PAH/PSS)^{Rho} avec cette fois la barrière marquée en rouge (PSS^{Rho}) a été mis au contact d'une solution de trypine et étirée longitudinalement à un degré $\alpha = 30\%$. L'expérience a été menée sur une durée de 8 heures, la dégradation du film a été démontrée par microscopie confocale en imageant le film tout au long de l'expérience. La fluorescence verte correspondant à la libération des oligomères de PLL^{FITC} dans le surnageant suite à la dégradation du film a été également suivie par fluorimétrie. La fluorescence verte du film diminue tout au long de l'expérience pour disparaître complètement au bout de 8 h, le film ayant alors été complètement dégradé. En même temps la fluorescence verte dans le surnageant augmente tout au long de l'expérience ce qui traduit également la dégradation du film. Nous avons réalisé une expérience contrôle en l'absence d'étirement et dans ce cas, la dégradation n'a pas eu lieu car l'enzyme n'a pas pu diffuser dans le film, d'où l'absence de molécules libérées dans le surnageant.

La deuxième partie de l'étude s'est axée sur la validation de cette stratégie pour libérer un agent thérapeutique. Pour cela, une molécule anticancéreuse (le paclitaxel, de nom commercial Taxol) a été choisie. Cette molécule a été chargée par incubation directe sur le film PLL/HA avant la construction de la barrière. Ensuite la barrière PAH/PSS a été construite et la même stratégie de libération a été utilisée c'est-à-dire étirement de la structure, pénétration de la trypine, dégradation du film et libération du paclitaxel dans le surnageant.

Ce travail constitue un des premiers exemples de libération de molécules bioactives contrôlée par un stimulus mécanique à partir d'un film multicouche de polyélectrolytes. Ces films pourraient être utilisés comme revêtement pour les stents actifs. En effet la libération de molécules à effets antiprolifératifs comme le paclitaxel (antimitotique) est nécessaire pour

empêcher la resténose. Ainsi, comme le stent est soumis à de nombreuses contraintes mécaniques (vasodilatation, vasoconstriction), on pourrait imaginer le recouvrir de notre film multicouche et utiliser ses contraintes mécaniques pour libérer le paclitaxel.

3.2. Article

Langmuir

Stretch-induced biodegradation of polyelectrolyte Multilayer films for drug release

Journal:	LANGMUIR
Manuscript ID:	la-2012-02550q
Manuscript Type:	Letter
Date Submitted by the Author:	24-Jun-2012
Complete List of Authors:	Barthes, Julien; INSERM U977 / University of Strasbourg, Biomaterials and Tissue Engineering, Mertz, Damien; INSERM U977 / University of Strasbourg, Biomaterials and Tissue Engineering, Bach, Charlotte; INSERM U977 / University of Strasbourg, Biomaterials and Tissue Engineering, Metz-Boutigue, Marie-Hélène; INSERM U977 / University of Strasbourg, Biomaterials and Tissue Engineering, Senger, Bernard; INSERM, U.977 Voegel, Jean-Claude; INSERM U977 / University of Strasbourg, Biomaterials and Tissue Engineering, Schaaf, Pierre; Institut Charles Sadron, CNRS, Université de Strasbourg Laval, Philippe; INSERM U977 / University of Strasbourg, Biomaterials and Tissue Engineering

SCHOLARONE™
Manuscripts

Stretch-induced Biodegradation of Polyelectrolyte Multilayer Films for Drug Release

*Julien Barthes^{a,b, ‡}, Damien Mertz^{a,b, ‡}, Charlotte Bach^{a,b}, Marie-Hélène Metz-Boutigue^{a,b},
Bernard Senger^{a,b}, Jean-Claude Voegel^{a,b}, Pierre Schaaf^{c*}, Philippe Laval^{a,b,*}*

^a Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM Unité 977, 11 rue Humann,
67085 Strasbourg Cedex, France.

^b Faculté de Chirurgie Dentaire, Université Louis Pasteur, 1 Place de l'Hôpital, 67000
Strasbourg, France.

^c Centre National de la Recherche Scientifique, UPR22, Institut Charles Sadron, 23 rue du Loess,
BP 84047, 67034 Strasbourg, Cedex 2, France.

Page 131-144 :
Publication
soumise à droit d'auteur

SUPPORTING INFORMATION

Stretch-induced Biodegradation of Polyelectrolyte Multilayer Films for Drug Release

By Julien Barthes, Damien Mertz, Charlotte Bach, Marie-Hélène Metz-Boutigue, Bernard Senger, Jean-Claude Voegel, Pierre Schaaf, Philippe Lavalle

Materials

Poly(L-lysine) (PLL, $M_w = 3.0-7.0 \times 10^4$ Da), poly(D-lysine) (PDL, $M_w = 3.0-7.0 \times 10^4$ Da), poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS, $M_w = 7.0 \times 10^4$ Da), poly(allylamine) (PAH, $M_w = 1.5 \times 10^4$ Da), Trypsin (TRY) from bovin pancreas ($M_w = 2.3 \times 10^4$ Da), fluorescein isothiocyanate labeled poly(L-lysine) (PLL^{FITC}, $M_w = 3.0-7.0 \times 10^4$ Da) were purchased from Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Hyaluronic acid (HA, $M_w = 1.2 \times 10^5$ Da) was obtained from BioIberica (Barcelona, Spain). Rhodamine RedTM-X, succinimidyl ester (Rho, $M_w = 7.69 \times 10^2$ Da), fluorescein-5-isothiocyanate (FITC, $M_w = 3.89 \times 10^2$ Da) and paclitaxel Oregon Green 488 conjugate (paclitaxel^{Oregon Green}, $M_w = 1.32 \times 10^3$ Da) were purchased from Invitrogen (France). Paclitaxel^{Oregon Green} was dissolved within an ethanol/Cremophor (BASF, Ludwigshaffen, Germany) emulsion to stabilize this drug via hydrophobic interactions. Rhodamine labeled poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS^{Rho}) was prepared at Max Planck Institute of Colloids and Interfaces (Potsdam, Germany).¹ Silicon sheets (thickness = 254 μm) was purchased from SMI (Saginaw, Michigan, USA).

Characterization Methods

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). Confocal laser scanning microscopy (CLSM) observations were carried out with a Zeiss LSM 510 microscope using a $\times 40$ (Zeiss Achromplan) objective and with 0.4 μm z-section intervals. FITC fluorescence was detected

after excitation at $\lambda = 488$ nm with a cut-off dichroic mirror of 488 nm and an emission band-pass filter of 505-530 nm (green emission). Rhodamine fluorescence was detected after excitation at $\lambda = 543$ nm, dichroic mirror of 543 nm, and an emission long pass filter of 585 nm (red emission). Virtual vertical sections can be visualized, hence allowing the determination of the thickness of the film. All the experiments are performed in liquid condition (0.15 M NaCl/10 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane), pH = 7.4) and the multilayer films were never dried.

Fluorimetry. Fluorimetry analyses were carried out with a Bio-Rad Versafluor fluorimeter. The device is equipped with an excitation filter between 485 and 489 nm and an emission filter between 515 and 525 nm (suited for FITC probes). 300 μ L of supernatant was added for analysis in a fluorimeter cuvette and measurement of the fluorescence intensity was performed.

Quartz crystal Microbalance. The build-up process of multilayer films and enzyme degradation was monitored in situ by quartz crystal microbalance-dissipation using the Q-Sense 401 flow module (QCM-D, E1, Q-Sense, Västra Frölunda, Sweden). The QCM technique consists in measuring the resonance frequency f of a quartz crystal induced by molecule adsorption on the crystal, in comparison with the crystal in contact with buffer solution. The crystal used here is a QSX 303 (Q-Sense), it is coated with a 100 nm thick SiO_2 film. The quartz crystal is excited at its fundamental frequency, 5 MHz, and at its harmonic frequencies, 15, 25, 35, 45, 55 and 65 MHz. Changes in the resonance frequency, f during each adsorption step are measured for each excitation frequency. A decrease in f can be associated, in first approximation, with an increase of the mass adsorbed on the crystal.

High Performance Liquid Chromatography gel-filtration (HPLC gel-filtration). HPLC gel-filtration is a size exclusion chromatographic method in which the sample is transported through the column with an aqueous solution. This method is used to separate molecules by their size and in our case by their molecular weight. The lower the molecular weight is, the higher is the retention time in the column. It is usually applied to large molecules or macromolecular complexes such as proteins or polypeptides. This device gives the molar mass distribution (Mw). In our study, this method was used to analyze the size of PLL fragments after enzymatic degradation by TRY.

Experimental Methods - Detailed Procedures

Polyelectrolyte and Enzyme Solutions. Polyelectrolyte and enzyme solutions were prepared by dissolution of adequate amounts of polyelectrolyte and enzyme powders in 0.15 M NaCl/10 mM Tris solutions (pH = 7.4). The final concentrations were 1 mg.mL⁻¹ for polyelectrolyte solutions and 0.25 mg.mL⁻¹ for enzyme solution. All solutions with labeled polyelectrolytes (PLL^{FITC}, PDL^{FITC}, PSS^{Rho}) were prepared at 0.5 mg.mL⁻¹. All solutions were prepared using ultrapure water (Milli Q-plus system, Millipore) with a resistivity of 18.2 MΩ.cm.

Fluorescently labeled Polyelectrolyte and Enzyme (PDL^{FITC}TRY^{Rho}). Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) was coupled to PDL. An appropriate amount of PDL (3 mg.mL⁻¹) was dissolved in a Na₂CO₃ solution (0.05 M, pH = 8.5). FITC at 5 mg.mL⁻¹ was dissolved in DMSO (dimethylsulfoxide). We used a ratio of 1 mg of FITC for 50 mg of PDL.

The solutions were gently mixed at room temperature for 2 h. PDL^{FITC} was then purified by dialysis (Cut off 2 kDa, Membra-Cel TM, Viskase Companies, US6) in ultrapure water for 3 days, and then the absence of free FITC in the solution was checked by UV spectroscopy. Rhodamine RedTM-X, succinimidyl ester was coupled to TRY. The same protocol was used with a ratio of 3.2 mg of rhodamine for 50 mg of TRY. The final concentrations of PDL^{FITC} and TRY^{Rho} was respectively adjusted to 0.5 mg.mL⁻¹ and 0.25 mg.mL⁻¹ using 0.15 M NaCl/10 mM Tris buffer solution (pH = 7.4)

Build-up of Polyelectrolyte Multilayers. Multilayers were built with an automated dipping robot (Riegler & Kirstein GmbH, Berlin, Germany) on silicone sheets of 254 μm thickness. Silicone sheets of 18×18 mm² were previously cleaned with ethanol and then extensively rinsed with water. Silicon substrates were first dipped in a PLL solution (polycation) for 5 min. Then, two rinsing steps were performed by dipping the sheets two times for 5 min in 15 M NaCl/10 mM Tris solution. The polyanion (HA) was then deposited in the same manner. The buildup process was pursued by the alternated deposition of PLL and HA. After deposition of n bilayers, the film is denoted (PLL/HA) _{n} . The same method was applied for PSS (polyanion) and PAH (polycation) deposition but with a deposition time of 4 min leading to (PAH/PSS) _{m} multilayers. PLL^{FITC} and PDL^{FITC} were adsorbed on the top of the reservoir (PLL/HA) _{n} for 5 min and PSS^{Rho} was adsorbed on the top of the capping barrier for 4 min.

Stretching device. A homemade stretching device allowed elongating silicon substrates in the longitudinal direction directly under the confocal microscope.^[31] The stretching motion is achieved by a precision electric motor at a velocity of 0.74 mm.s⁻¹.

Stretch-induced enzymatic degradation. A TRY solution at 0.25 mg.mL^{-1} ($600 \text{ }\mu\text{L}$) was brought in contact with $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{FITC}}/\text{HA}/(\text{PAH}/\text{PSS})_9/\text{PAH}/\text{PSS}^{\text{Rho}}$ film. A uniaxial stretch of $\alpha = 30\%$ was applied to the film in order to crack the capping barrier (PAH/PSS). Every 30 min, the LbL film was observed with a confocal microscope and the intensity of green fluorescence (release of lysine oligomer fragments) was measured in the supernatant by fluorimetry. After each observation, fresh TRY solution ($600 \text{ }\mu\text{L}$) was added in order to prevent any evaporation of the supernatant. The enzymatic degradation was followed for 8 h.

Paclitaxel Release. We used paclitaxel to evaluate the release of a biologically active compound from a PLL/HA film. The paclitaxel solution was prepared using a protocol described by Vohouhê et al.^[38] After the buildup of a $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}$ compartment, paclitaxel^{Oregon Green} was adsorbed ($200 \text{ }\mu\text{L}$) overnight at $50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. After this step, a $(\text{PAH}/\text{PSS})_9/\text{PAH}/\text{PSS}^{\text{Rho}}$ capping barrier was deposited. To perform this experiment, the same protocol than in the enzymatic degradation experiment was used and the release of paclitaxel was followed for 8 h by fluorimetry and CLSM microscopy.

S1. Determination of TRY concentration within a PLL/HA film

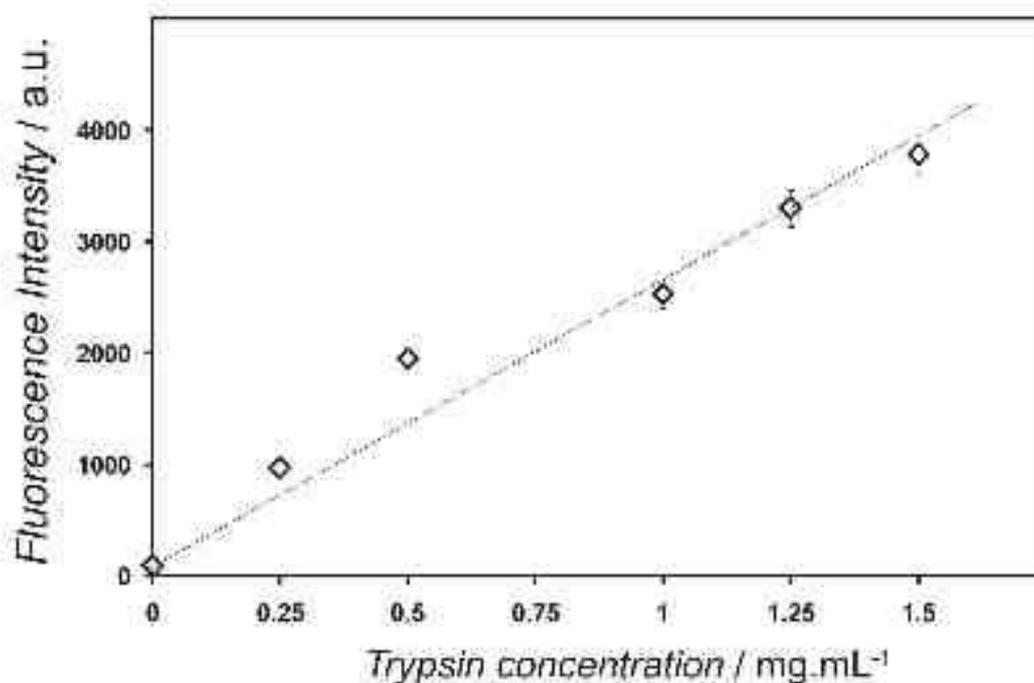


Figure S1.A Calibration curve for TRY^{Rho} in solution representing fluorescence intensity (a.u.) vs TRY^{Rho} concentration in aqueous solution.



Figure S1.B CLSM (x,z) vertical section of a (PLL/HA)₃₀ reservoir in the red emission channel incubated 30 min. with TRY^{Rho} solution at 0.25 mg.mL⁻¹. White dashed line indicates the film-silicone interface. Scale bar is 5 μm. Concentration of TRY^{Rho} within the PLL/HA film, was estimated using this image and the calibration curve in figure S1A. A concentration of TRY^{Rho} ca. 0.50 mg.mL⁻¹ within the PLL/HA film was estimated.

S2. Control experiment without stretching after 8 h incubation with TRY



Figure S2. CLSM (x,z) section image of $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{FITC}}/\text{HA}/(\text{PAH}/\text{PSS})_{10}$ incubated with TRY solution at $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 8 h without stretching. Scale bar is $7 \mu\text{m}$

S3. CLSM images of PLL/HA and PDL/HA films incubated with TRY

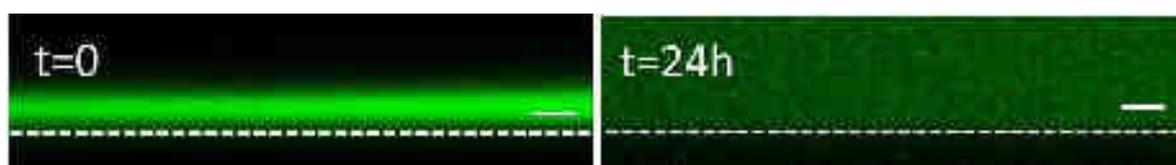


Figure S3.A CLSM (x,z) section images of a PLL/HA film labeled with PLL^{FITC} incubated with a TRY solution at $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ at t_0 (left image) and $t_{24\text{h}}$ (right image). Scale bar = $7 \mu\text{m}$.

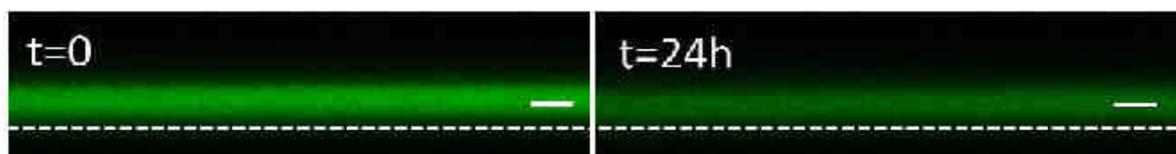


Figure S3.B CLSM (x,z) section images of a PDL/HA film labeled with PDL^{FITC} incubated with a TRY solution at $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ at t_0 (left image) and $t_{24\text{h}}$ (right image). Scale bar = $7 \mu\text{m}$.

S4. HPLC analysis of a PLL/HA film degraded by TRY

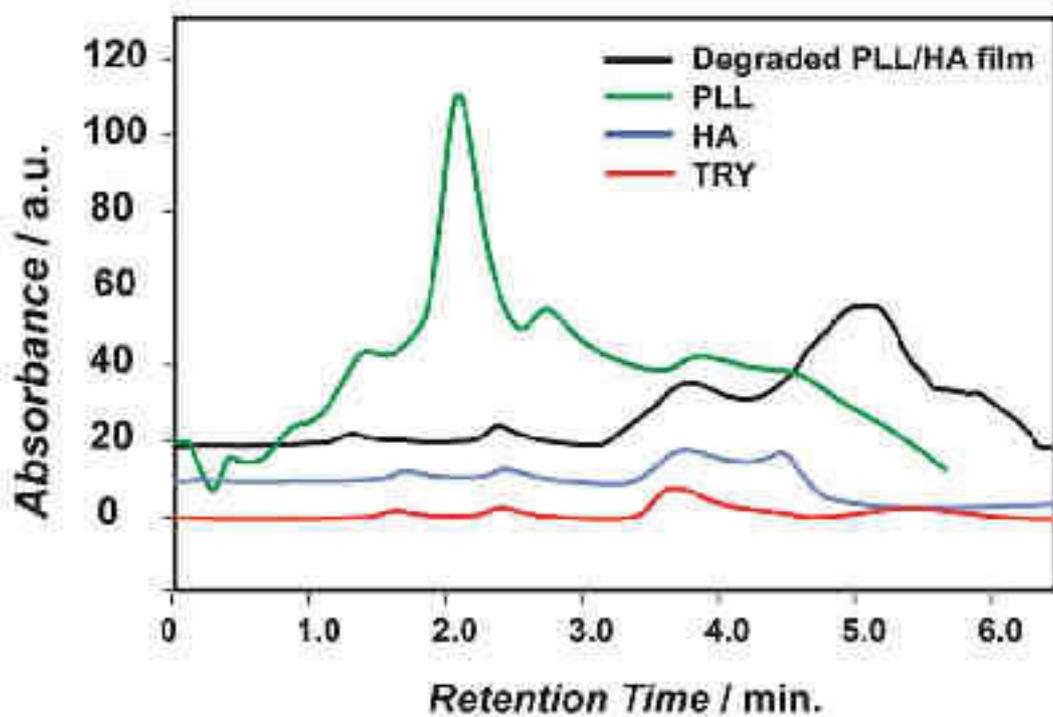


Figure S4. HPLC chromatograms of the control solutions (PLL, HA and TRY) and of the solution resulting from PLL/HA films degraded by TRY (24 h).

S5. Quartz crystal microbalance monitoring the buildup of the PLL/HA film and film degradation by TRY

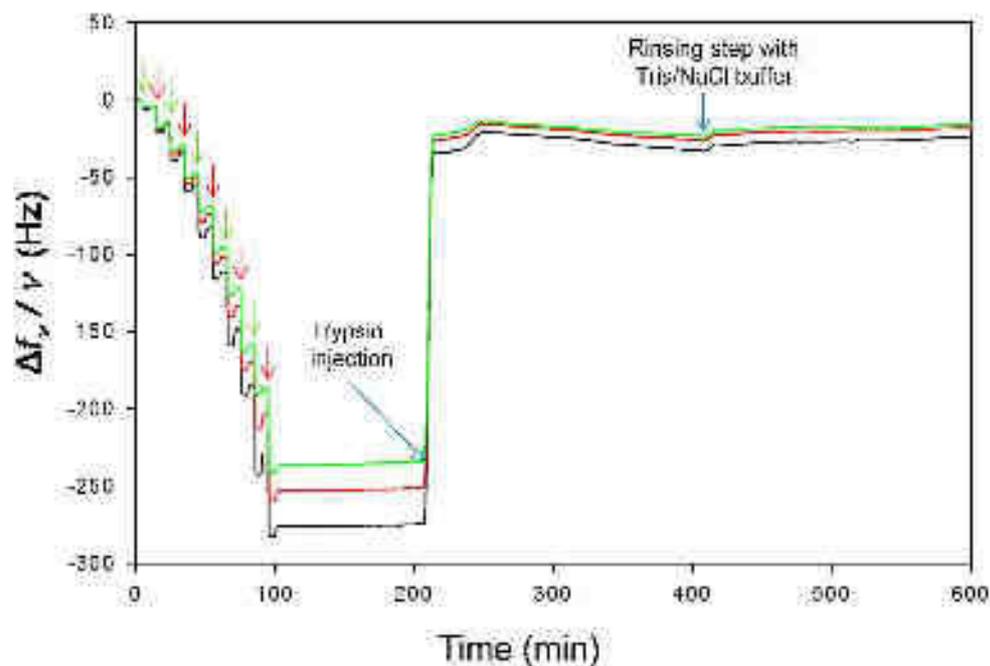


Figure S5. Quartz crystal microbalance (QCM) monitoring the buildup of the PLL/HA film (blue arrows correspond to PLL injections and red arrows to HA injections) and the final injection of TRY and film degradation. Measurements were performed at three overtones: 3 MHz (—), 5 MHz (—) and 7 MHz (—).

References

1. Vodouhe, C.; Le Guen, E.; Garza, J. M.; Francius, G.; Dejugnat, C.; Ogier, J.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Lavallo, P., Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* **2006**, 27 (22), 4149-4156.

4. Contrôle physique et biochimique du microenvironnement cellulaire par un film nourricier à base de gélatine

4.1. Contexte et résumé

La culture cellulaire est le point de départ de nombreuses recherches se focalisant sur des applications dans le domaine de l'ingénierie biomédicale. La demande croissante de thérapies basées sur la médecine régénérative et l'identification de molécules thérapeutiques nécessite l'amélioration des conditions de culture cellulaire et l'identification de modalités bien définies. Ainsi contrôler le microenvironnement cellulaire *in vitro* est un paramètre crucial dans ces étapes. Au cours de ce travail, un film mince de gélatine mimant la matrice extracellulaire a été élaboré en utilisant la méthode de « spin-coating » puis a subi une réticulation enzymatique par la transglutaminase. Les propriétés biochimiques, biophysiques et antimicrobiennes de ce substrat ont pu être modulées pour répondre aux besoins spécifiques des cultures cellulaires (figure 71).

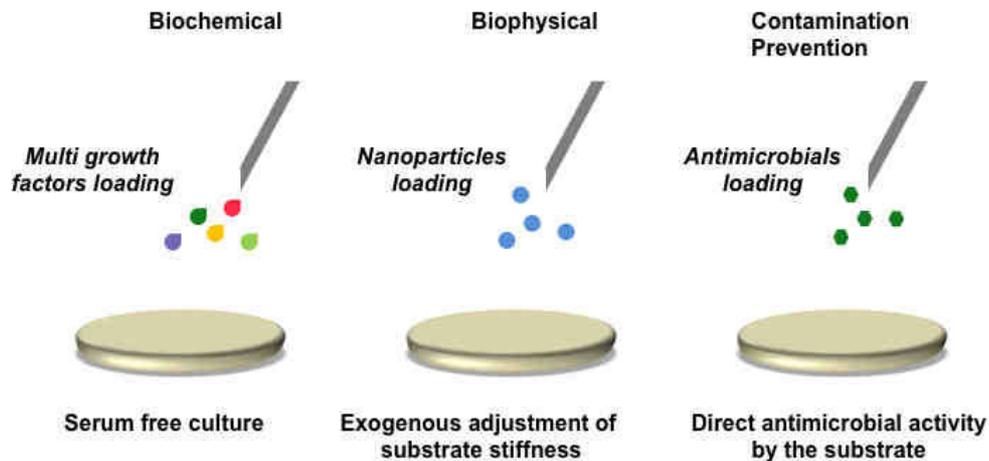


Figure 71. Schéma du principe du "gel-feeder", substrat nourricier modulaire constitué de divers éléments permettant le contrôle précis du microenvironnement cellulaire.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés au contrôle du microenvironnement cellulaire par voie biochimique. Pour les expériences de culture cellulaire classique, les biologistes utilisent du milieu de culture à base principalement de glutamine et de glucose. Ils rajoutent ensuite des suppléments de culture à base de sérum bovin ou de compositions spécifiques pour répondre aux besoins des cellules. Ces compléments contiennent généralement des facteurs de croissance, des cytokines et des hormones. L'ajout de ces nutriments représente la partie la plus onéreuse de la culture cellulaire. De plus, le maintien de l'activité de ces molécules en solution aqueuse est difficilement réalisable. Notre stratégie

s'est attachée à développer un matériau capable de stocker ces facteurs de croissance afin de les maintenir actifs et de les libérer de manière contrôlée.

La gélatine est une forme dénaturée du collagène, lui-même étant le composant majeur de la matrice extracellulaire. La réticulation enzymatique du film de gélatine permet d'éviter sa dégradation trop rapide par les cellules et de travailler sur des temps de culture de 3 à 5 jours. Les composants du sérum ont été incubés sur le substrat de gélatine avant l'ensemencement des cellules. Habituellement, ces composés sont ajoutés dans le milieu de culture à intervalles de temps réguliers pour permettre le renouvellement des facteurs dégradés en solution. La libération de ces facteurs de croissance au cours du temps a pu être mise en évidence par des expériences de spectrométrie de masse et de spectrofluométrie après marquage fluorescent de protéines modèles. Ce substrat "nourricier" a permis de réaliser les expériences de culture cellulaire sans ajout de sérum supplémentaire dans le milieu ce qui réduit considérablement le volume de sérum utilisé et donc le coût de la culture. Le changement de milieu de culture tous les 2 jours pour chaque culture cellulaire n'est donc plus nécessaire. De plus, comme nous avons utilisé la gélatine pour élaborer le film, un composant issu de la matrice extracellulaire, les facteurs de croissance sont capables d'interagir avec la gélatine et ainsi sont maintenus biologiquement actifs. Les expériences de libération ont été réalisées sur 3 jours avec différents types cellulaires tels que les cellules endothéliales (HUVECs) ou les fibroblastes (3T3). Nous avons vérifié la viabilité cellulaire après 3 jours de culture sur les films pour deux conditions : 1) avec sérum préalablement incubé sur le film de gélatine avant le début de la culture cellulaire (condition "SM + serum released" : Starvation Medium+ serum released) et 2) sans sérum incubé sur le film (condition "SM" : Starvation Medium) (tableau 16). Nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus dans des conditions de culture classique c'est-à-dire lorsque le sérum se trouve dans le milieu de culture pendant toute l'expérience (condition "NM" : Normal médium). Nous avons ainsi pu remarquer que les cellules cultivées sur le film avec le sérum incubé (SM + serum released) présentaient une meilleure activité métabolique et une fréquence de mort cellulaire (apoptose/nécrose) plus faible que sans sérum incubé (SM) ce qui démontre que les facteurs de croissance sont libérés du film sous une forme active.

Notation	Film sans sérum pré-incubé	Film avec sérum pré-incubé	Milieu sans sérum	Milieu avec sérum
"NM"	X			X
"SM"	X		X	
"SM serum released"		X	X	

Tableau 16. Différentes conditions testées pour les expériences cellulaires.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au contrôle du microenvironnement cellulaire par voie biophysique en modulant la rigidité du substrat par ajout de nanoparticules de polystyrène dans le film de gélatine. En effet il est connu que le comportement des cellules peut être modulé en jouant sur les propriétés physiques du substrat et plus précisément sur sa rigidité. Pour mettre cette modulation en évidence, nous avons déterminé le module de Young des films de gélatine incubés avec des particules à différentes concentrations et nous avons étudié l'étalement cellulaire sur ces films. Nous avons pu constater que l'étalement cellulaire augmentait avec la rigidité du film et donc que nos substrats de gélatine, en plus de leur fonction de réservoir de facteurs de croissance, possédaient une propriété mécanique modulable et donc adaptable au type cellulaire que l'on souhaite cultiver.

Dans un troisième temps, nous avons travaillé sur les propriétés antimicrobiennes du film en l'incubant en présence d'agents antimicrobiens/antifongiques. Ces travaux avaient pour but de limiter l'ajout constant de ces agents dans le milieu de culture qui finit par provoquer des résistances bactériennes rendant ces molécules inefficaces. Nous avons pu constater une activité antimicrobienne sur au moins les deux premiers jours de culture.

En conclusion, ce substrat élaboré à base de composants matriciels et dont les propriétés biochimiques, biophysiques et antimicrobiennes peuvent être modulées, est susceptible de répondre aux exigences de la culture cellulaire. Il s'agit d'un substrat simple à mettre en œuvre et qui permet un contrôle précis du microenvironnement cellulaire, donc son adaptation à chaque type cellulaire. Ce type plateforme devrait répondre à la demande croissante de substrats de culture cellulaire aux conditions bien définies et nécessaires pour la production tissulaire *in vitro* à des fins thérapeutiques et pour cribler de nouvelles molécules bioactives.

4.2. Article (en soumission)

**Priming the Cells for Their Final Destination:
Microenvironment Controlled Cell Culture by a Modular
ECM-mimicking Feeder Layer**

Abstract

Mammalian cell culture is the starting point in many researches focusing on biomedical applications. However, researchers have little control over the standardized cell microenvironment parameters. Here a modular ECM-mimicking surface coating for cell culture environments is designed. This culture substrate is a new and versatile thin film obtained by spin-coating of concentrated gelatin crosslinked through transglutaminase, a natural enzyme. It can be modified with respect to the biochemical and biophysical needs of the final cell destination, *i.e.* it delivers loaded multi-growth factors and serum components and allows for cell culture in a serum-free culture medium. Also, a well-known cell behavior modulator, substrate stiffness is controlled exogenously by addition of nanoparticles. In addition to growth factors, antimicrobial agents such as natural peptides are added to the substrate for limiting the constant addition of antimicrobial agents to the culture medium and to prevent the raise of resistant bacterial strains in the culture environment. This substrate acts as an "all-in-one" platform containing ECM components, growth factors, stiffening elements and antimicrobial agents and provides a favorable biochemical and biophysical microenvironment in sterile conditions. It is a free of maintenance system, as cells will grow without addition of serum or antimicrobial cocktails. This low cost and easy-to-use substrate could emerge as a new standard for cell culture.

1. Introduction

Human body is composed of over 200 different types of differentiated cells with wide range of functions and phenotypes. Since the early days of *in vitro* cell culturing, having a microenvironment that would enable the maintenance of different cell types has been a primary goal. Moreover, future increasing demands in regenerative medicine and drug screening need improvement in culture substrates with well established conditions and with a reasonable production cost [1].

For this end, three kinds of specific conditions are necessary: *i*) a favorable biochemical microenvironment, *ii*) an appropriate biophysical microenvironment, and *iii*) the sterility of the microenvironment. Aside from having a medium with the right amount of nutrients, pH and essential biomolecules, it is important to provide specific growth factors and cytokines for a given cell type. Recent years also saw a tremendous increase in studies demonstrating the crucial effects of the biophysical properties of the culture substrate on cell behavior [2]. Also, in areas where long-term cultures are necessary such as in regenerative medicine, there is an increased risk of bacterial and fungal contaminations.

For biochemical control, the required components have been provided by serum derived from fetuses of animals (primarily calf) added to the cell medium. However, batch to batch differences and a general uncertainty of the contents of a given serum pushed the research toward development of “defined media” for each cell type [3]. This line of work has resulted in many defined media for different cell types that are available commercially [4].

However, there are some inherent problems with this method of maintaining cells. Firstly, whether it is a serum or a defined mixture of growth factors, such additives are very expensive and can be considered the biggest money sink in cell culture experiments. Moreover, these molecules are fragile chemicals with very short half-lives particularly in the presence of cells, thus their long-term activity in an aqueous environment cannot be ensured. Frequent renewal of the medium is thus necessary and depending on the frequency, the impact on cell adhesion, proliferation, differentiation, can induce heterogeneities between experiments. Also, as their half lives and rates of degradation are different, it cannot be said with certainty that at a given time during a cell culture experiment, the constituents of the medium are in the same ratio as in the beginning [5]. For these reasons, introduction of the necessary growth factors through the liquid medium is a satisfactory but an imprecise and inefficient method.

In human body, ECM surrounds cells and most of the growth factors are trapped and associated with proteoglycans from ECM. For example, heparan sulfate, a proteoglycan from ECM, is known to interact with growth factors like VEGF (vascular endothelial growth factor), FGF (fibroblast growth factor), BMP (bone morphogenic protein) [6-9]. These interactions have three main results: *i*) they prolongs their half-life by protecting them against degradation; *ii*) they control their release and in turn their concentration in the microenvironment; and *iii*) they synchronize the cellular response as tethering of the growth factors on ECM directs the respective location of focal adhesion points and expression of membrane receptors for the growth factors [10]. This has implications on the downstream simultaneous processing of signals coming from ECM and growth factors. Most of the growth factors such as FGF, VEGF, PDGF (platelet-derived growth factor), EGF (epidermal growth factor) are known to interact with extracellular matrix molecules such as collagen, fibronectin, hyaluronic acid, heparin, etc. If this environment and this interaction can be reproduced *in vitro*, the quality of cell maintenance and expansion would be increased, while a substantial decrease in the amount of required growth factors in cell medium can be attained. This will mimic *in vivo* behavior and moreover it will reduce the overall cost of cell culturing.

The other crucial aspect of cell culture with mammalian cells is the culture substrate [2]. For this end generally, gamma irradiated and plasma treated stiff polystyrene surfaces are used. One downside of these synthetic substrates is the absence of any biochemical factors on their surface and their total dependence to passive adsorption of these molecules from the cell culture medium. Moreover, such standardization generally ignores the substantial difference between the natural microenvironments of the cells from different tissues from brain to bone [11]. Substrate stiffness has been shown to have as strong effect as of soluble growth factors, particularly for the direction of stem cell differentiation [12]. Thus having the extra control over substrate stiffness during the expansion phase of cell culture would be advantageous.

For this end we design thin films of ECM components stabilized with an enzymatic crosslinking step in a dual role of microcarriers for growth factors and substrate with exogenous stiffness control for cell culture. As ECM molecules are natural substrates of the cells, it will be advantageous compared to tissue culture polystyrene which needs to be further coated by synthetic poly(lysine) for several cell types already. Introduction of growth factors through the coating and control of the substrate stiffness would improve the influence over the cells *in vitro*. Moreover, such a system can be frozen, stored and transferred in a frozen state. The ECM-based substrate designed will ensure the stability of the growth factors for longer

periods and also the reproducibility of the cellular microenvironment by keeping the growth factors in an effective and non-denatured conformation.[13] This "gel-feeder" system would not only provide a controlled release of multiple growth factors but it will also obviate the necessity to use of growth factors in the medium thus decreasing the overall price of cell culturing.

To prove this concept we prepared spin coated gelatin based thin ECM mimics that are crosslinked with a natural enzyme, transglutaminase, to ensure stability. These films were then loaded with defined cocktails of growth factors known to improve the proliferation of specific cells. Cells like endothelial cells or fibroblasts are grown on these films in the absence of any growth factors or serum in the liquid medium. Addition of nanoparticles to this gel-feeder system allows to finely tune film stiffness and as a consequence to modify cell attachment and spreading. The ability of the coating to load and release antimicrobial agents was also shown. Finally, this substrate acts as an "all-in-one" platform containing ECM components, growth factors, stiffening elements and antimicrobial agents which lead to an optimization of biochemical and biophysical parameters for cell culture (scheme 1).

2. Results and Discussion

2.1. Build up of the spin coated film

Gelatin type B, a well-known biocompatible material derived from collagen, was used as the main component to build up the film. A gelatin solution heated to 50 °C was deposited on a glass substrate and was spin coated for 2 minutes at ambient temperature. The spin-coating method applied to build up gelatin films is an original method never used previously for this purpose to our knowledge. The cooling and spinning of the gelatin produce a homogenous film on the surface. Then, the film was crosslinked by a natural enzyme, transglutaminase, to improve its mechanical properties.

A first characterization of the crosslinked film was performed with confocal microscope (CLSM). Before imaging, labeling of the whole film was obtained through 15 min incubation of a poly(L-lysine)^{FITC} (green fluorescent dye FITC, fluorescein isothiocyanate) on the film. 3D image depict a homogenous 5 micrometer thick film (**Figure 1a**). Presence of the homogenous film was confirmed by scratching the film with a needle (**Supplementary**

Information Figure S1). The remarkable homogeneity of the top surface and thickness of the film was also confirmed by ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy) (**Figure 1b**).

By crosslinking the spin coated gelatin films enzymatically their stability was increased up to 3 days as quantified by spectrofluorimetry through measurement of the total amount of gelatin left after incubation in PBS at 37 °C (**Figure 2a, b**). Also crosslinking resulted in a significant increase in the stiffness (Young modulus) of the film layer as quantified by nanoindentation experiments with AFM (Atomic Force Microscopy) (**Figure 2c**). These measurements indicate that film stiffness (elastic modulus or Young modulus) is about 0.9 kPa for non-crosslinked gelatin films and they increase up to about 1.5 kPa. The increase in Young modulus could provide a better surface for initial cell attachment whereas improvement in film stability could ensure a slower release of the growth factors rather than a fast one due to film degradation under culture conditions.

2.2. Loading and release of serum components

Then, the loading and release of model proteins, namely positively and negatively charged proteins were checked. For this end we used FITC labelled BSA (bovine serum albumin, BSA^{FITC}) and Rho (rhodamine) labelled VEGF (vascular endothelial growth factor, VEGF^{Rho}), which are two proteins negatively and positively charged respectively. Incubations of each protein on crosslinked gelatin films depict a homogenous distribution through the whole film sections as evidenced by cross-section images obtained by confocal laser scanning microscopy (CLSM) (**Insets of Figure 3a, b**). The passive release of both molecules mainly occurs during the first 24 hours (**Figure 3a, b**). When HUVECs are seeded on these films loaded with labeled proteins, delivery was again observed by confocal microscopy: BSA^{FITC} and VEGF^{Rho} were observed in cytoplasm and on membranes. This suggests that the crosslinked gelatin film designed is appropriated to deliver specific proteins and growth factors which are then captured by cells seeded on top of the film.

Multiple growth factor delivery systems are generally limited to sequential or simultaneous delivery of two factors. For example it has been shown *in vivo* that sequential delivery of VEGF and PDGF from injectable polymeric system results in better perfusion in ischemic mice [14]. Sequential release of BMP2 and BMP7 from poly(ϵ -caprolactone) scaffolds has

been shown to improve both *in vitro* and *in vivo* bone tissue formation [15]. However, these kinds of studies have not been extended to more growth factors, particularly due to the difficulty in monitoring and quantifying their loading and release. In the present study, in order to monitor the loading in the gelatin film and release out of this film a mixture of growth factors and proteins from serum, we performed a bottom-up proteomic analysis using capillary electrophoresis (CE) coupled to electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) [16] (**Table 1**). Commercially available endothelial cell growth medium has been incubated with the spin-coated crosslinked gelatin film for 30 minutes. This medium contains a mixture of supplements, mainly a cocktail of growth factors. The film was incubated in PBS for 3 days and the release of proteins at day 1 and 3 was monitored with ESI-MS. Release of proteins (serum albumin, serotransferrin, alpha-2-HS-glycoprotein) and growth factors (FGF, EGF) was detected at day 1 and 3. Moreover, collagen alpha-1-chain and collagen alpha-2-chain were also monitored at day 1 and 3. These two chains correspond to release of components from gelatin itself.

2.3. Gel-feeder as a favorable biochemical microenvironment

The next step was to demonstrate that the loading of a multi-growth factor cocktail can maintain cells in serum free culture conditions. For this end we selected a well-known cell type, HUVEC cells. Endothelial cell growth medium was incubated on the crosslinked gelatin films for 30 minutes to allow loading of growth factors into the film. Then, cells were seeded on loaded films and they were cultured in 500 microliters of starvation medium (SM) for three days (condition called "SM + serum released"). This starvation medium corresponds to a medium without serum supplements, free of proteins and growth factors. As a negative control, a similar cell culture was performed on unloaded films (condition called "SM") and as a positive control, cells were grown on unloaded films but with normal medium conditions (normal medium conditions with serum supplement) ("NM" condition). After 1 day of culture, cell viability in the SM+serum released condition was nearly identical to NM conditions: about 85% of cells were alive on SM+serum released condition, whereas on SM conditions, 45% of cells were necrotic or apoptotic cells (**Figure 4a**). At day 3, alive cells represent 55% of the total cells in SM+serum released condition whereas SM condition decreased to 15% (**Figure 4b**). Alive cell number in positive control is slightly higher than SM+serum released condition (70% versus 50% but without significant differences). This clearly indicates that the

loaded gelatin films are efficient to maintain cells up to 3 days in a favourable environment without the need to use a serum or a supplemented medium. From cell staining with live/dead kit, significantly more necrotic cells in SM conditions were observed compared to SM+serum released condition, whereas the alive cell numbers were similar for normal medium and release conditions (**Figure 4c**).

To demonstrate the potentiality of the crosslinked gelatin substrate compared to more conventional substrates for cell culture, we measured metabolic activity of cells on glass slide in starvation medium (**Supplementary Information, Figure S2**). For cells culture on glass slide in serum free culture conditions, a weak metabolic activity was monitored at day 3, however when glass was replaced with non-loaded crosslinked gelatin films (SM condition), metabolic activity increase by a factor of four. Gelatin film loaded with medium (SM+serum released condition) shows the highest metabolic activity, about 5 times higher compared to glass slide. This suggests that the gelatin crosslinked substrate by itself is already a satisfactory environment for cell metabolism in starvation medium. Moreover cell-cell contacts between the HUVEC cells was checked with F-actin and PECAM labeling (**Supplementary Information, Figure S3**). PECAM is an important cell-cell adhesion molecule for endothelial cells and also it is an important modulator of endothelial cell function [17]. After 3 days of culture, SM+serum released condition show near confluent well spread layers of HUVECs with high number of cell-cell contacts (PECAM in green) whereas in the case of SM conditions, there were only occasional islands of cells.

To emphasize the importance of the release, we perform an experiment where the enzymatic crosslinking step was done after the loading of the growth factors. Probably most of the growth factors should be crosslinked and consequently are not released and/or loose their activity. The release of the factors is essential as most of the cells were apoptotic or necrotic after 1 day of culture (**Supplementary Information, Figure S4**).

Finally, having a crosslinked ECM layer was advantageous by itself; it was previously shown in the use of Matrigel® which is known to contain tethered growth factors in its structure.[18] Matrigel®, a trade name of a protein mixture originates from Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse sarcoma cells, is often used by biologist as a culturing substrate for very specific cell culture and with a complete serum in the supernatant. Nonetheless, some drawbacks limit the utilization of Matrigel®, the most serious of which include (i) difficulty of use, (ii) lack of experimental control of composition, (iii) batch-to-batch variability.

Another important aspect of loading growth factors into the culture substrate is the prevention of growth factor degradation. In aqueous conditions, most of the growth factors are highly fragile and even in 4°C they slowly degrade. Finally, a supplemented culture medium has a gradually decreasing bioactivity due to this degradation. In order to see whether growth factor activity can be kept in the gelatin substrates after prolonged storage, films were dried and stored at -20°C for a week. Afterwards, cells were seeded 3 days on defrozed gelatin substrates with (SM+ serum released) or without (SM) growth factors in starvation medium conditions. There was a significantly higher number of cells on growth factor containing films and necrotic and apoptotic cells were two times smaller (**Figure 5 a, b**). Metabolic activity was also strongly increased in SM+serum released condition compared to SM condition (**Supplementary Information, Figure S5**). This underlines the potential of the designed substrate in term of improvement of cell attachment and it provides a better environment for cellular attachment. Moreover, the storage of these substrates at low temperature can be achieved without damaging the embedded growth factors.

In order to see whether this system can be generalized, one more cell model was selected, a fibroblastic one, to show that the concept can work with undefined serum too. 3T3, known as the standard fibroblast cell line (mouse fibroblasts) were seeded on FBS (Fetal Bovine Serum) loaded films. After three days there was a significant difference in 3T3 cell metabolic activity in SM+released conditions compared to SM. Moreover, most of the cells in SM conditions were necrotic (**Supplementary Information, Figure S6**).

2.4. Gel-feeder as a favorable biophysical microenvironment

We demonstrated that the biochemical properties of the feeder layer can be adjusted by loading individual proteins, growth factors or complete mediums. The next step consisted in the modulation of physical properties of the designed feeder layer. Mechanical properties of cellular environment play a major role in cell attachment, proliferation and differentiation [2, 19]. Moreover each cell types need substrates of specific Young moduli to grow optimally. Addition of the nanoparticles in a gel-feeder system could be advantageous as this would not intervene with the release and could confer novel mechanical properties. Polystyrene nanoparticles with a diameter of 100 nm were incubated for 30 min at the 1/500 dilution (corresponding to 3.6×10^{10} particules.mL⁻¹) on the spin-coated gelatin films before reticulation with transglutaminase. Then, distribution of nanoparticles in gelatin film was

checked using ESEM and CLSM and an homogenous distribution of nanoparticles on and in the film was observed (**Figure 6a, b**).

To quantify the changes in adhered cells with respect to particle loading, 3 different cell types were tested, Human Gingival Fibroblasts (HGF), 3T3 fibroblasts and HUVECs (**Figure S7**). Primary fibroblasts HGF were the most sensitive cells to the presence of nanoparticles concentration and the primary endothelial cells were the least sensitive with respect to cell density and cell area (**Figure S7**). In order to determine optimum attachment for cells with respect to the changes in nanoparticle concentration, nanoparticle gradients were established and HGF cells were tested at different nanoparticle concentrations (**Figure 7**). When nanoparticle concentration in gelatin increases, we observe a strong increase in cell spreading (**Figure 7a, c**) and a moderate increase in cell density (**Figure 7b**). Gelatin enzymatically crosslinked without loading any nanoparticles allow HGF cells to attach but is not sufficient to promote a spreading of the cells.

To determine the origin of the effect of nanoparticles and if it can be attributed to a change in mechanical properties of the film, nanoindentation experiments with AFM were performed (**Figure 8 and Supplementary Information Figure S8**). These measurements indicate that film stiffness (elastic modulus or Young modulus) is about 1.5 kPa for enzymatically crosslinked gelatin films and loading of nanoparticles further improve this Young modulus to 3 kPa (gelatin crosslinked with nanoparticules deposited at a dilution 1/1000) up to 15.5 kPa (gelatin crosslinked with nanoparticules deposited at the dilution 1/50). Finally a direct correlation between the increase in elastic modulus of the film and the improvement of spreading and adhesion of cells can be made.

2.5. Gel-feeder to ensure sterility of the microenvironment

Another crucial aspect in cell culture concerns the sterility of the microenvironment. A cocktail of antibiotics like penicillin/streptomycin are currently added in conventional cell culture medium to avoid bacterial or fungal contaminations. In addition to growth factors, antimicrobial agents as antibiotics or synthetic antimicrobial peptides [20] have been added to the gelatin substrate for limiting the constant addition of antimicrobial agents to the culture medium and to prevent the raise of resistant bacterial strains in the culture environment. Penicillin/streptomycin mixture as antibiotics or catestatin as antimicrobial peptide [21] were

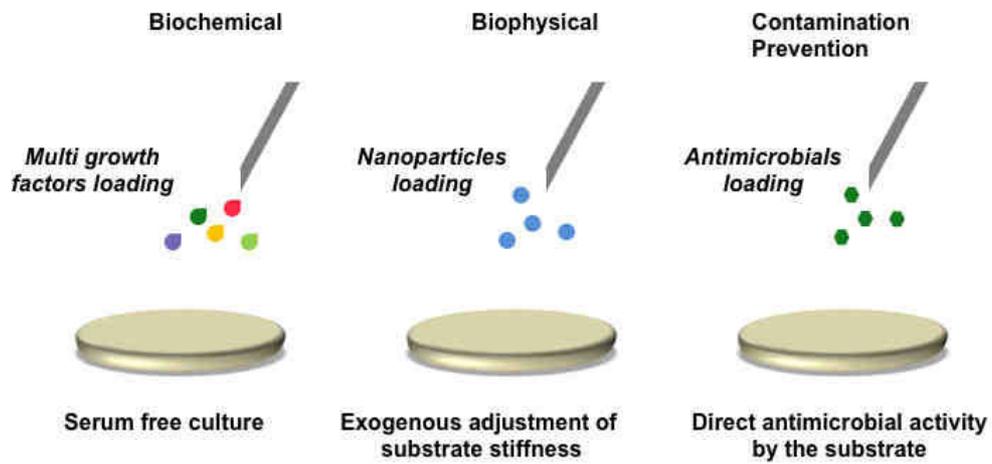
loaded on crosslinked gelatin films. Then, *S. aureus* strains were incubated on the films for 1 or 2 days and efficiency of the films towards bacteria proliferation was checked (**Figure 9**). After one day, bacteria growth is strongly inhibited by the presence of antibiotics in the substrate and to a lesser extent catestatin has a similar effect. After two days, the efficiency of the film to prevent bacterial growth is reduced probably because the loading rate is not sufficient to ensure the presence of antibiotics and antimicrobial peptides more than one day. However, the number of incubated bacteria in these experiments was huge compared to what occur for a contamination during a cell culture. Our gel-feeder system should thus be optimized to prevent local contaminations during cell culture protocols.

3. Conclusion

An enzymatically crosslinked ECM based-substrate which is amenable to cell growth was shown to be able to contain and release multiple growth factor at the same time. Moreover, stiffness of this substrate is adjustable due to the presence of nanoparticles without damaging activity growth factors loaded. This gel-feeder system can be used as a generic, storable, growth factor containing substrate for biotechnology applications. This would not only decrease the cost of growth factor use but also provide a different means to study cellular activity without the presence of exogenous growth factors and also high level of control over substrate stiffness with respect to the nanoparticle concentration. Moreover this film layer can be used for phenotype modulation and differentiation [22]. This system could be also useful for embryonic stem cell based test systems where the expensive chemicals such as LIF (Leukemia inhibitory factor) can be directly released from the substrate [23].

The gel-feeder designed provides direct linkage of the growth factors to the ECM structure and offers cells with a better microenvironment. Moreover, direct contact between the cells and the ECM molecules would also provide the opportunity to remove the cells from the culture with ECM specific enzymes instead of trypsin or milder enzyme based products which also cuts the cell surface proteins and causes stress to the cells. A recent proteomic study showed that trypsin treatment causes significant changes in expression of several proteins related to apoptosis, cell metabolism, cell adhesion and growth regulation[24].

Finally, such a system could be applicable for cell amplification, cell sheet engineering and also to design kits with specific cell selective surfaces for preferentially binding tumoral cells, or sub-cell phenotypes.



Scheme 1. Concept of the ECM-based substrate "gel-feeder": microenvironment controlled cell culture via a modular cell feeder layer.

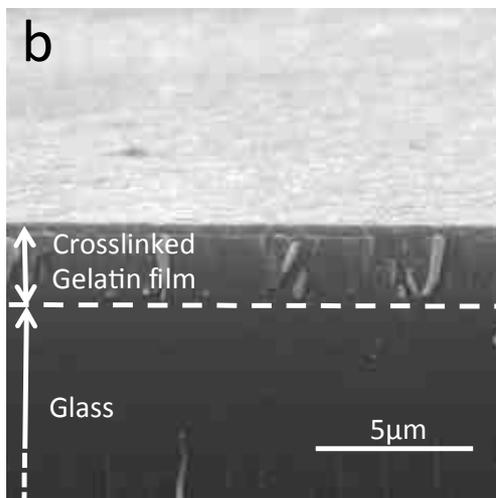
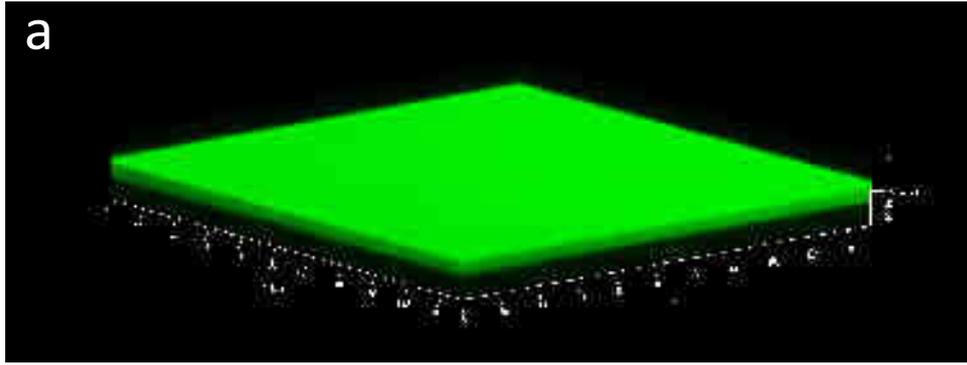


Figure 1. a) 3D CLSM image of the spin-coated crosslinked gelatin film labelled with PLL^{FITC}. b) 3D ESEM images of a spin-coated crosslinked gelatin film in semi-hydrated conditions.

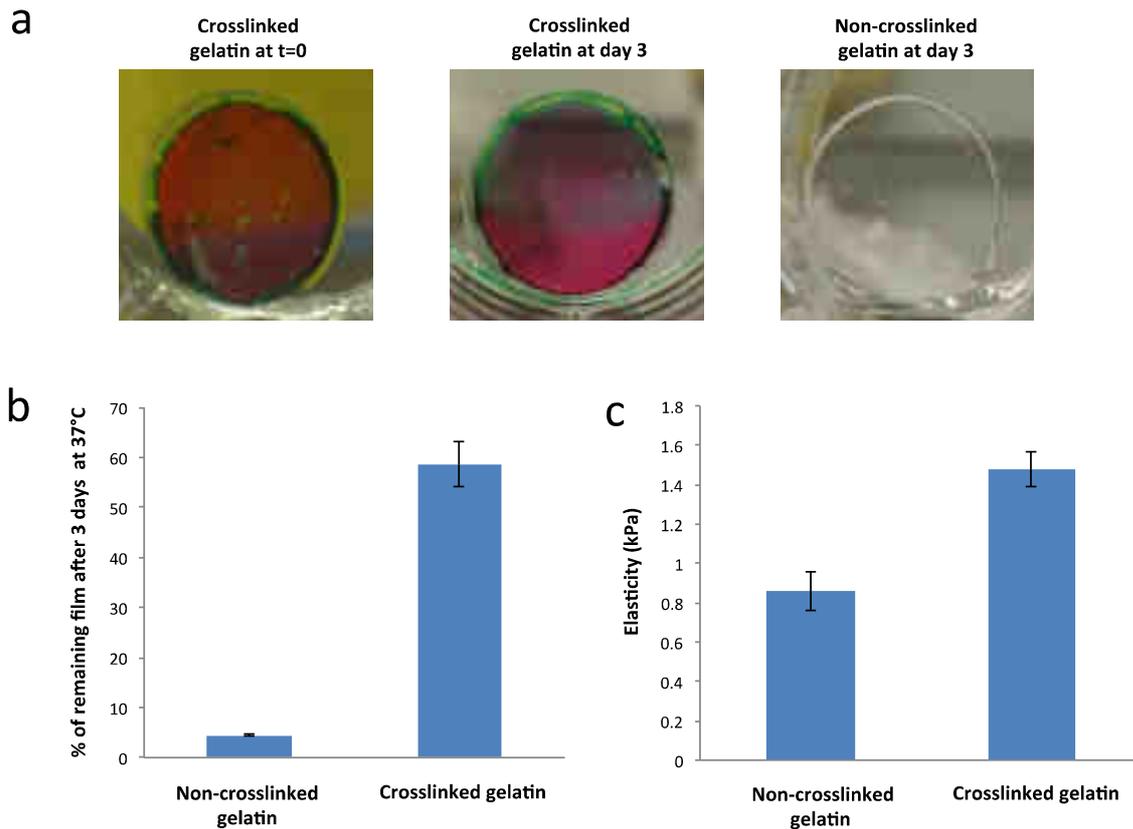


Figure 2. Stability of the crosslinked gelatin layer and changes in mechanical properties following crosslinking step. a) After 3 days of incubation, the crosslinked films stay intact whereas the non-crosslinked films are completely removed, as evidenced by sirius red/fast green staining. b) Quantification of the degradation of the non-crosslinked and crosslinked films after incubation 3 days at 37°C in PBS. c) Measurement of the stiffnesses (Young's moduli) of the non-crosslinked and crosslinked films performed by AFM nanoindentation experiments.

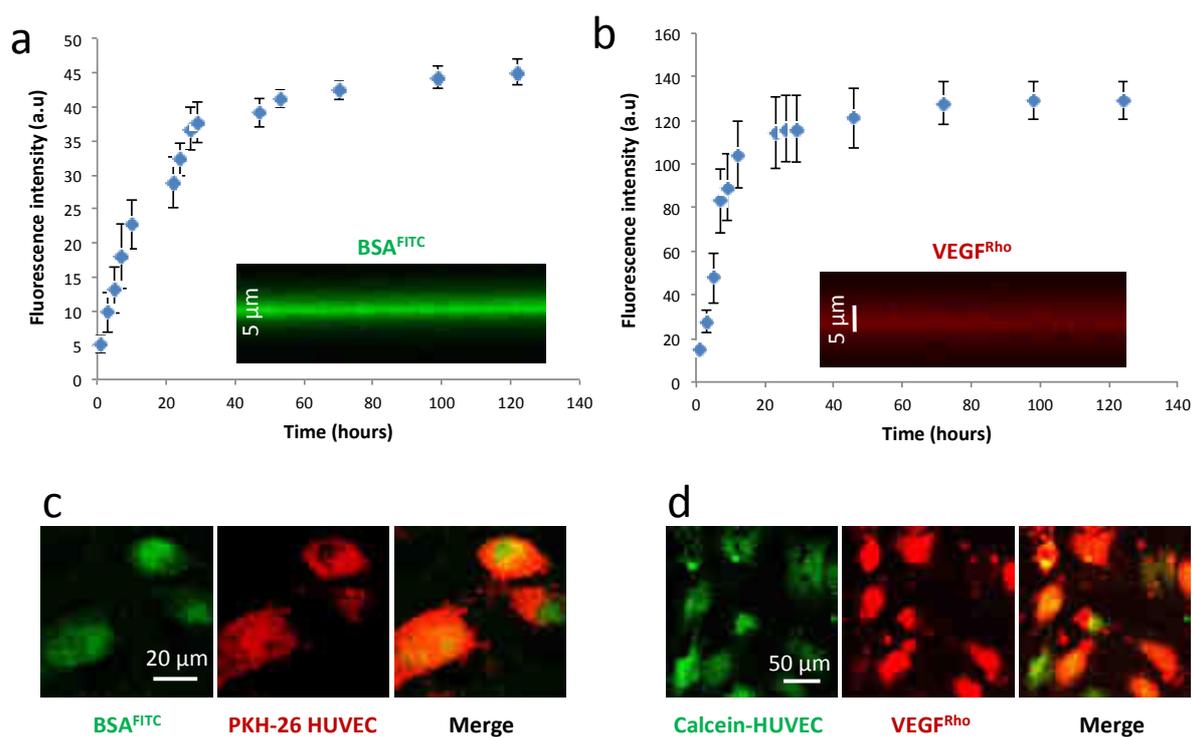


Figure 3. Loading and release of FITC-BSA (a) and Rhodamine-VEGF (b) proteins in/from the crosslinked films. Error bars correspond to standard deviations. Cross-section images (x,z) of the loading were obtained with CLSM (Insets of a) and b) respectively) and release over time was determined with fluorescence microplate reader. This release is calculated relatively to the total amount of proteins loaded in the film. In the presence of HUVECs after 1 day of growth, the released FITC-BSA (c) and rhodamine-VEGF molecules (d) were captured by the cells. HUVECs were previously labeled with PKH26 labeled (c) and (d) calcein-AM.

Serum		Release day 1		Release day 3	
Protein	amino acid number	Protein	amino acid number	Protein	amino acid number
serum albumin	9	serum albumin	42	serum albumin	23
alpha-2-HS-glycoprotein	16	alpha-2-HS-glycoprotein	11	alpha-2-HS-glycoprotein	6
serotransferrin	14	serotransferrin	12	serotransferrin	4
human FGF	10	human FGF	6	human FGF	6
human EGF	8	human EGF	2	human EGF	4
		collagen alpha-1-chain	13	collagen alpha-1-chain	12
		collagen alpha-2-chain	8	collagen alpha-2-chain	8

Table 1. Monitoring loading and release of proteins from gelatin films pre-incubated with endothelial cell growth medium. Capillary electrophoresis (CE) coupled to electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) is used to determine the release of proteins at day 1 and day 3. First the serum components were separated and each peak was characterized with protein sequencing. The protein content at day 1 and day 3 was monitored by the collection of the supernatant and analyzed by comparison with the protein contents of the original endothelial cell growth medium. The number of the identified amino acid for each component detected is also mentioned.

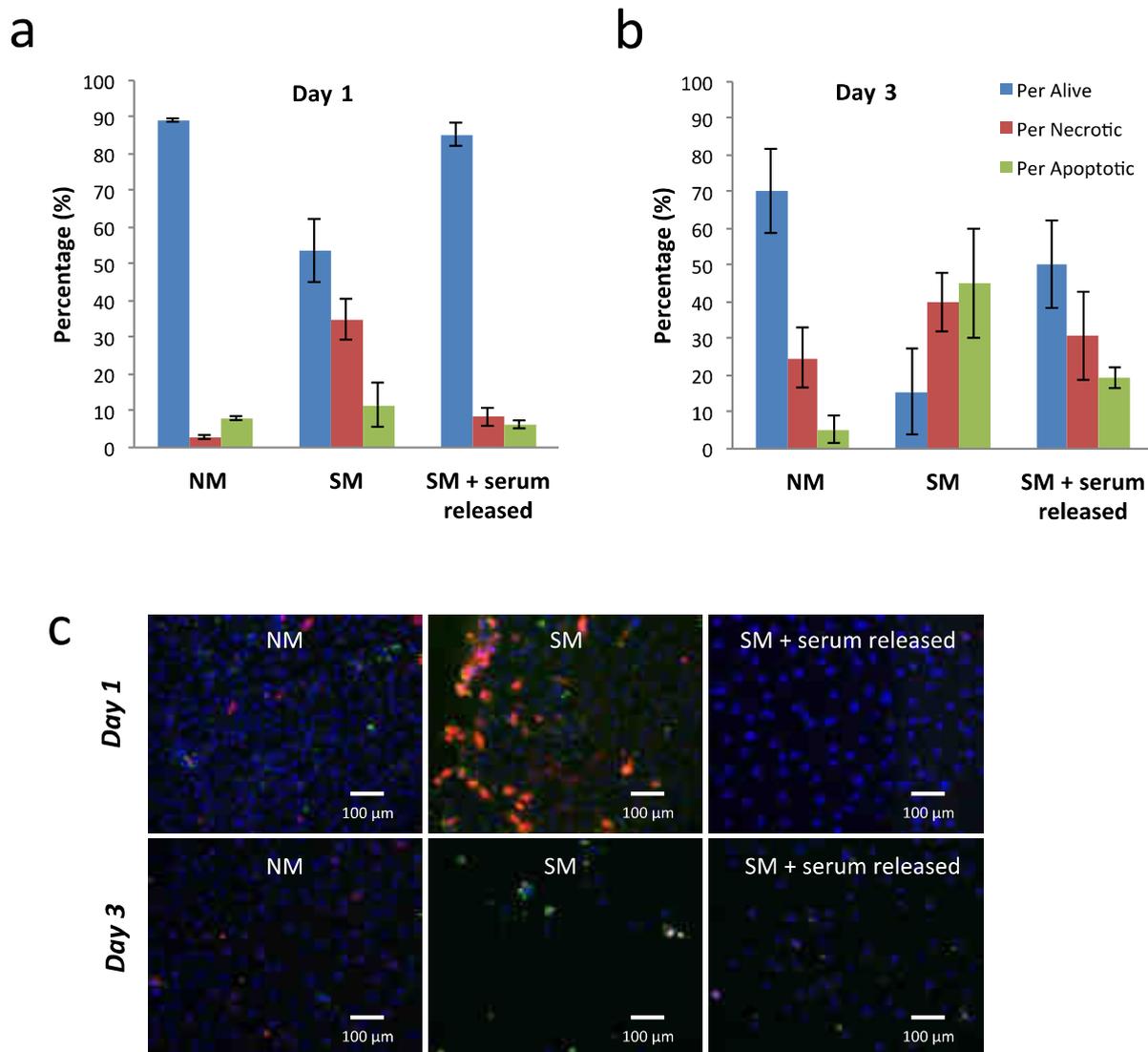


Figure 4. Maintenance of HUVECs on gel-feeder substrate. a) percentage of HUVECs alive (blue), necrotic (red) or apoptotic (green) at day 1 on gelatin substrate with a normal medium conditions with serum supplement (NM), or in starvation conditions (SM), or on the gelatin film pre-incubated with growth factors (SM+serum released). b) *idem* as a) at day 3. Error bars in a) and b) correspond to standard deviations. c) Microscopy observations of alive (blue), necrotic (red) and apoptotic (green) cells for the three conditions (NM, SM, SM+released serum) at day 1 and day 3.

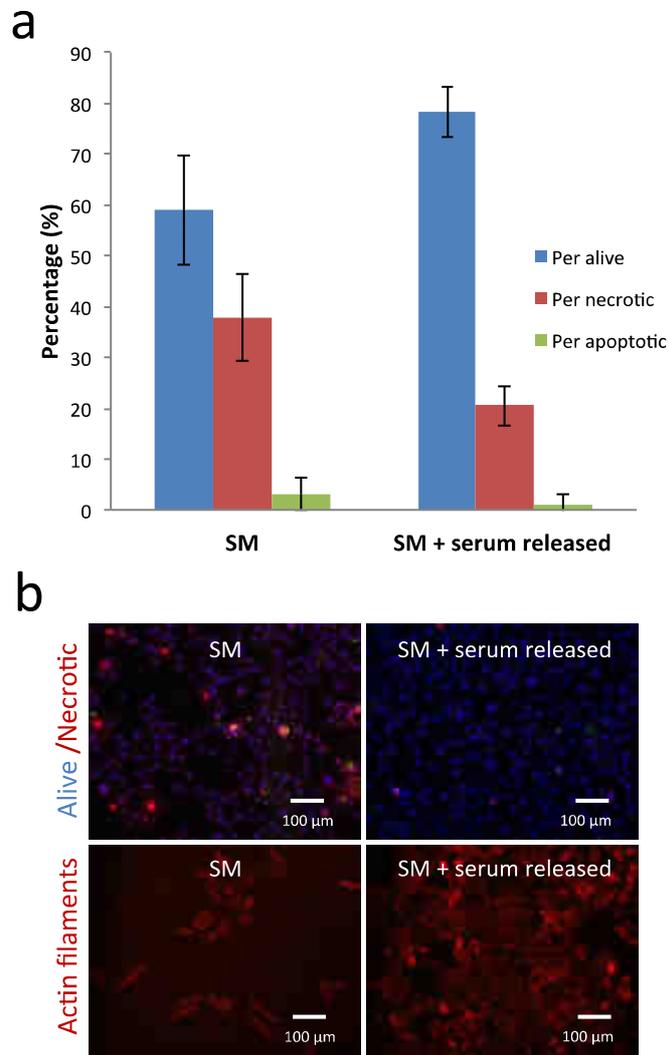


Figure 5. Effectiveness of the gel-feeder substrate loaded with growth factors after storage in frozen conditions. a) Significantly more HUVECs attached at day 3 to the gelatin films pre-incubated with growth factors (SM+serum released) compared to non-loaded films (SM). Error bars correspond to standard deviations. b) HUVECs were more spread and established more cell-to-cell contacts in the growth factor containing gelatin films after 3 days of culture. Top images: alive (blue), necrotic (red) and apoptotic (green) cells. Bottom images: actin labelling (red).

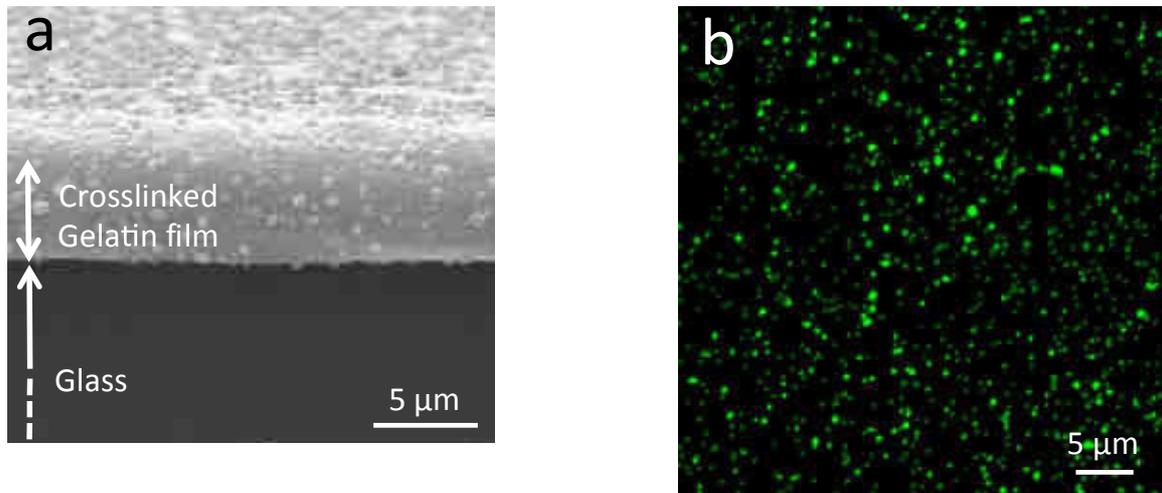


Figure 6. a) 3D ESEM image in semi-hydrated conditions of the spin-coated crosslinked gelatin film loaded with 100 nm nanoparticles (dilution 1/500). b) CLSM (x,y) images inside the structure of a spin-coated crosslinked gelatin film loaded with 100 nm green labeled nanoparticles.

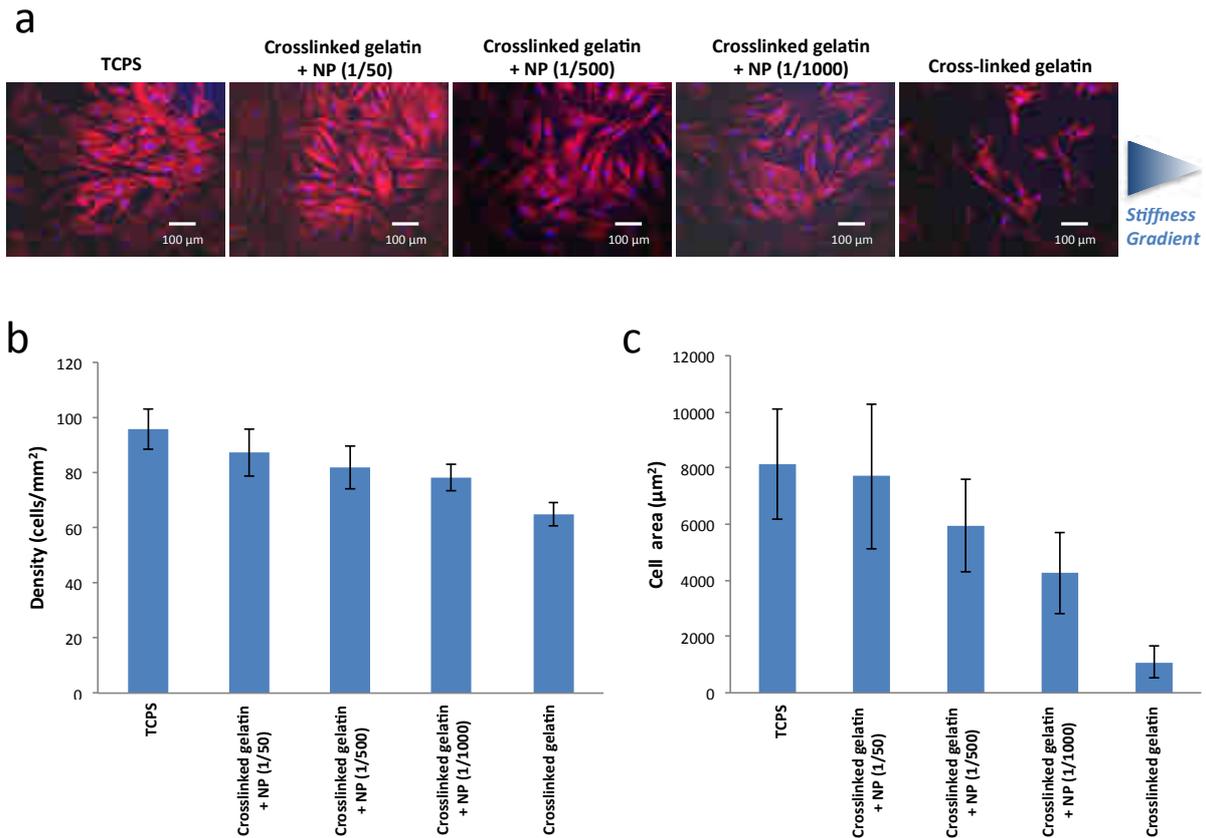


Figure 7. Differential Attachment of primary fibroblasts HGF on gelatin films loaded with various concentrations of nanoparticles (loading from solutions diluted at 1/50, 1/500, 1/1000). a) HGF actin filaments (phalloidin labeling, red) and nucleus (Hoechst labeling, blue) observed on various substrates TCPS used as control is considered as the more rigid substrate of the series and gelatin (enzymatically crosslinked) the softest one. b) Cell density and c) cell area determined for HGF on various substrates. Error bars correspond to standard deviations.

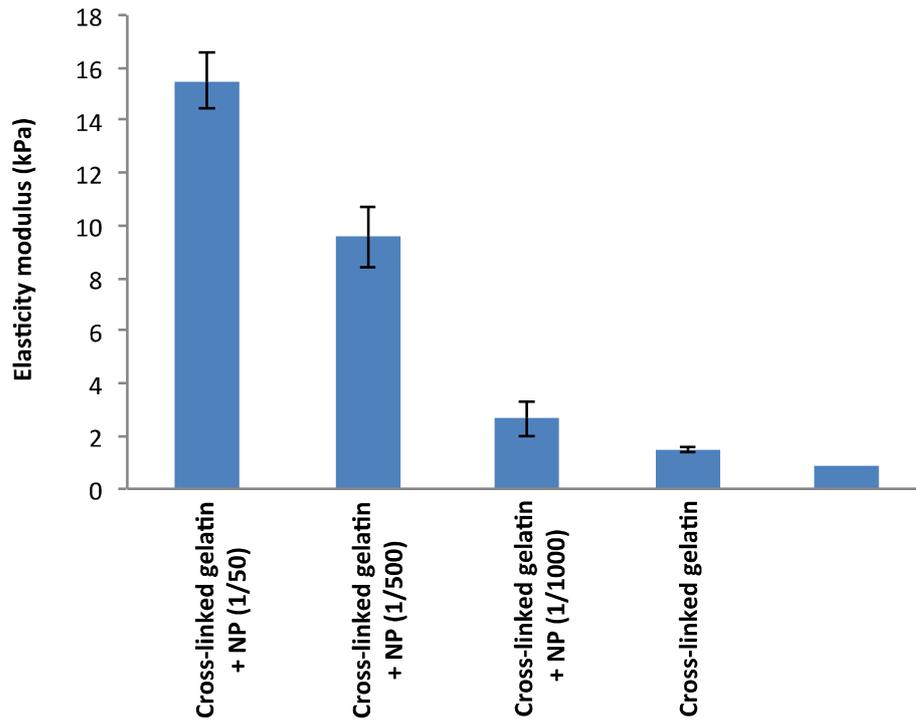


Figure 8. Average elastic moduli measured by AFM for *i*) non-crosslinked gelatin films, *ii*) gelatin films enzymatically crosslinked and *iii*) gelatin films enzymatically crosslinked and loaded with various amounts of nanoparticles (loading from solutions diluted at 1/50, 1/500, 1/1000). Error bars correspond to standard deviation.

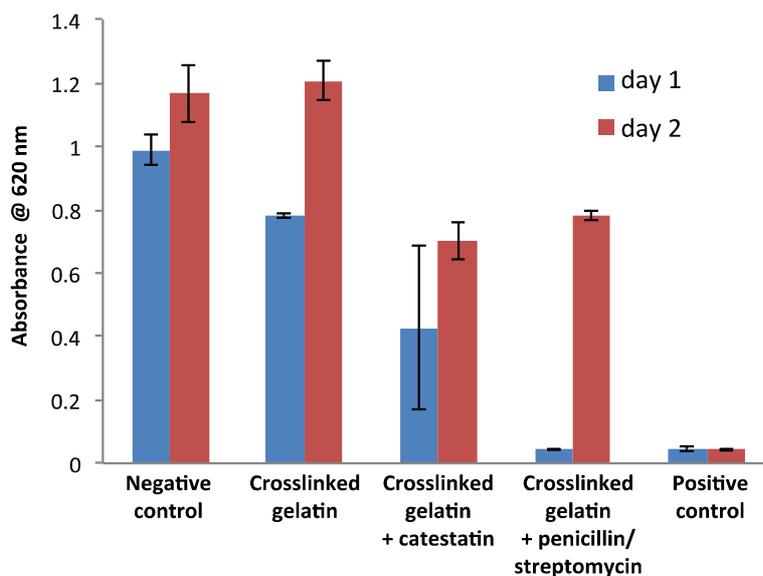


Figure 9. Absorbance at 620 nm to monitor *S. aureus* growth in solution at day 1 and 3 : *i*) without gelatin (negative control); *ii*) with a crosslinked gelatin film without any loading; *iii*) with a loading of either catestatin or penicillin/streptomycin. Positive control corresponds to a cocktail of tetracycline and cefotaxime in solution. Error bars correspond to standard deviations.

4. Experimental Section

Material

Gelatin type B ($M_w = 2-2.5 \times 10^4$ Da, $pI = 4.7-5.2$) from bovine skin, fluorescein isothiocyanate labeled Bovine Serum Albumin (BSA^{FITC} , $M_w = 6.6 \times 10^4$ Da, $pI = 4.7-4.9$) were purchased from Sigma Aldrich (France). Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) and Rhodamine Red-X succinimidyl ester were purchased from Invitrogen (France). Microbial taminase ($M_w = 3.8 \times 10^4$ Da, $pI = 9$) was purchased from Ajinomoto (Japan). Polystyrene nanoparticles 100 nm in diameter (Polysphere) and green labeled (Fluorophorex) were purchased from Phosphorex (USA). Recombinant human VEGF (recombinant Human VEGF165, $M_w = 3.82 \times 10^4$ Da, $pI = 8.5$) was purchased from Promocell (Germany).

Protein labelling

Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) and Rhodamine Red-X succinimidyl ester (Invitrogen, France) were covalently bound to VEGF. VEGF was dissolved in a Na_2CO_3 solution (0.1 M, $pH = 8.5$) at a concentration of 5 mg.mL^{-1} . FITC was dissolved in DMSO (dimethylsulfoxide) at a concentration of 10 mg.mL^{-1} . The solutions were gently mixed at room temperature for 2 hours. $VEGF^{FITC}$ was purified by dialysis over 3 days and then the absence of free FITC in the solution was checked by UV spectroscopy. The same protocol was used to synthesize $VEGF^{Rho}$ [25].

Spin-coating of gelatin films

To build up gelatin films, a spin coater WS-650Mz-23NPP from Laurell (USA) was used. Gelatin was prepared by dissolution of adequate amount of gelatin powder (15% w/v) in 0.15 M NaCl/10 mM Tris solutions ($pH = 7.4$). The solution was heated to 50°C with constant stirring. Then 200 μL of gelatin solution was deposited on a glass slide previously installed in the spin coater and the spin-coating program was started. The parameters were 2500 rpm with an acceleration of 1250 rpm for 2 minutes. Then the film was kept dry at 4°C for at least 3 hours before use. All solutions were prepared using ultrapure water (Milli Q-plus system, Millipore) with a resistivity of $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$.

Crosslinking of gelatin film

A solution of 10% (w/v) of transglutaminase in PBS (phosphate buffer saline) was prepared. 100 μL of this solution was incubated on gelatin film for 30 minutes. Then two rinsing steps of 5 minutes were performed by adding 100 μL of PBS each time.

Loading of proteins and serum in gelatin film

For release experiments of single proteins, fluorescently labeled proteins were loaded in gelatin film after crosslinking step. 200 μL of BSA^{FITC} solution at 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ or 50 μL of VEGF^{FITC} solution at 236 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, both prepared in 0.15 M NaCl/10 mM Tris solutions (pH = 7.4) were incubated on gelatin film for 30 minutes and then two rinsing steps of 5 minutes with PBS solution were performed

For release experiments of multiple proteins, “Endothelial Cell Growth Medium Supplement Mix C-39215” (Promocell, France) was loaded in gelatine film after crosslinking step. 100 μL of this mixture was incubated for 30 minutes and then two rinsing steps of 5 minutes with PBS solution were performed.

Addition of polystyrene nanoparticles to Gelatin film

Before crosslinking with transglutaminase, 100 μL of particles (100 nm) diluted in PBS (solutions with initial solutions at concentration of 1.82×10^{13} particules. mL^{-1} diluted at 1/50 or 1/500 or 1/1000) were incubated on gelatin film for 30 minutes. Then two rinsing steps of 5 minutes were performed by adding 100 μL of PBS each time. Distribution of nanoparticles in gelatin film was checked using an Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM (Quanta, FEI) and confocal laser scanning microscopy when green labeled nanoparticles were used (see next section).

Visualization of gelatin film using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) observations were carried out with a Zeiss LSM 510 microscope using a $\times 40$ (Zeiss Achroplan) objective and with 0.4 μm z-section intervals. In order to visualize the gelatin film and estimate its thickness, BSA^{FITC} solution was loaded in the film. BSA^{FITC} solution was prepared in 0.15 M NaCl/10 mM Tris buffer at 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. 200 μL of this solution was deposited for 30 minutes on a gelatin film previously crosslinked with a 10% transglutaminase solution and then two rinsing steps of 5 minutes with buffer solution were performed. FITC fluorescence was detected after excitation at $\lambda = 488$ nm with

a cut-off dichroic mirror of 488 nm and an emission band-pass filter of 505-530 nm (green emission). The same method was also used to visualize green labelled nanoparticles loaded in gelatin films.

To visualize gelatin loaded with VEGF^{Rho}. Rhodamine fluorescence was detected after excitation at $\lambda = 543$ nm, dichroic mirror of 543 nm, and an emission long pass filter of 585 nm (red emission). Virtual vertical sections can be visualized, hence allowing the determination of the thickness of the film. All the CLSM observations were performed in liquid condition (0.15 M NaCl/10 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane), pH = 7.4) and the films were never dried.

Release experiments using measured with spectrophotometer, spectrofluorimeter and CLSM

Release experiments of single fluorescently labelled proteins were carried out with a SAFAS Genius XC spectrofluorimeter (Monaco). Gelatin film was previously crosslinked with transglutaminase solution (cf *Crosslinking of gelatin film*) and incubated with BSA^{FITC} solution or with VEGF^{FITC} (cf *Loading of proteins and serum in gelatin film*). The release experiments were performed at 37°C in PBS solution. The supernatant was analysed with the spectrofluorimeter. New PBS solution (2mL) was added after each analysis so a cumulative release was performed. For BSA^{FITC} and VEGF^{FITC} the wavelength parameters were respectively the following:

$$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 495\text{nm} / 520\text{nm} \text{ and } \lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 488\text{nm} / 520\text{nm}$$

Another release experiment was performed with crosslinked gelatin film loaded with BSA^{FITC} and seeded with labeled HUVEC cells (red labeling PKH26 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 551\text{nm}/567\text{nm}$). 2mL of Endothelial cell growth medium (Promocell) was added and the experiment was carried out for 1 day at 37°C. The internalization of BSA^{FITC} was visualized using confocal microscope. The same experiment was performed with VEGF^{Rho} but this time HUVEC cells were labeled with Calcein (green dye). This experiment was performed for 1 day at 37°C and the fixation of VEGF on cell membrane was visualized using confocal microscope.

Determination of Young Modulus with Atomic Force Microscope (AFM) Nanoindentation

To study the effect of loading polystyrene nanoparticules on gelatin film, AFM nanoindentation experiments were performed to determine a change in rigidity of the film through Young's modulus measurements. AFM experiments were carried out using a MFP3D-BIO instrument (Asylum Research Technology, Atomic Force F & E GmbH, Germany). The nanoindentation method provides the Young's modulus calculated from the force vs. indentation curve (FVI). Triangular cantilevers with colloidal probe (SiO₂ particle with radius of 300 nm) were purchased from Novascan (Novascan Technologies, USA). The spring constants of the cantilevers measured using a thermal noise method were found to be 10 pN.nm⁻¹. Experiments were performed in PBS at room temperature. Maps of mechanical properties were obtained by recording a grid map of 32-by-32 force curves at different locations of the film surface. The maximal loading force was 6 nN. Elasticity maps and the corresponding histograms (statistic distribution) were estimated from the analysis of the approach curves according to the Dimitriadis model [26]:

$$F = \frac{4E}{3(1-\nu^2)} R^{1/2} \delta^{3/2} [1 + 1,133\chi + 1,283\chi^2 + 0,769\chi^3 - 0,0975\chi^4]$$

where δ is the indentation depth, ν the Poisson coefficient, R is the colloids radius and h the sample thickness. The Dimitriadis correction for finite thickness is defined by χ parameter:

$$\chi = \frac{\sqrt{R\delta}}{h}$$

All the FVI were analyzed by mean of an automatic Matlab algorithm described elsewhere [27].

Degradation of gelatin film and gelatin quantification

Degradation of gelatin films was performed at 37°C for 3 days by putting films (crosslinked and not crosslinked) in 2 mL of PBS. These films were analysed using “Sirius Red/Fast Green Collagen Staining Kit” provide by Chondrex (USA). Sirius Red (OD: 540 nm) specifically binds collagens or derived collagen structures such as gelatin and is used for detecting all types and species of collagen, whereas Fast Green (OD: 605 nm) binds to non-collagenous proteins. By exploiting the unique features of these two dyes, this quantitative assay kit allows to determine the amounts of collagen and non-collagenous proteins in the sample. To perform the analysis 0.2 ml of dye solution was added on the film and incubated at room temperature for 30 minutes. Then the dye solution was removed and the film was rinsed with water.

Finally 1 mL of dye extraction solution was added and the OD was read at 540 nm and 605 nm and the following equation was used:

$$\text{Collagen } (\mu\text{g/sample}) = (\text{OD}_{540} - (\text{OD}_{605} \times 0.291)) / 0.0378.$$

These results were compared to those obtained with non-degraded dry gelatin film.

Characterization of serum release using CE-MS/MS (Capillary electrophoresis - mass spectrometry)

Bottom-up proteomic sample preparation

For this experiment, 100 μl of complex mixture used for HUVEC cell culture (Endothelial Cell Growth Medium Supplement Mix C-39215, Promocell, France) was incubated on gelatin film for 30 minutes and then two rinsing steps of 5 minutes with 100 μL of PBS were performed. Then the release of this mixture composed of many proteins was studied using Capillary electrophoresis- mass spectrometry coupling technique.

Media samples, including initially incubated serum mixture and supernatant (collected after each day during the release experiment of the serum from gelatin film) were collected for bottom-up proteomic analysis. A volume of 700 μL of media were treated, prior to analysis the sample underwent tryptic digestion. Tryptic digestion solution was prepared using sequence-grade trypsin (1:20 w/w approx.). Before digestion, sample was concentrated in a miVac DNA concentrator speed vacuum system (Genevac, UK), afterward the sample was diluted in a volume of 65 μL of ammonium bicarbonate 50 mM (pH = 8.0). Sample was then heated to a temperature of 40°C to ensure protein solubilization. For protein denaturation and disulfide bond cleavage a volume of 3.9 μL of a solution of 100mM dithiothreitol (DTT) was added to the sample. The mixture was incubated for 5 minutes at 95°C. The mixture is cooled to ambient temperature and a solution of iodoacetamide (IAM) 100 mM was added to the mixture to a final concentration of IAM 10 mM. The mixture was placed in the dark for 20 minutes. A volume of 0.5 μL of trypsin was added to the mixture which was incubated at room temperature for 3 hours, again 0.5 μL of trypsin were added to the sample for overnight digestion at room temperature. Salts were eliminated using a C₈ spin tips (Proteabio, USA). Sample was finally concentrated using the speed vacuum system and diluted in 40 μL of ammonium acetate 50 mM (pH = 4.0) in order to allow isotachopheresis to occur during the separation.

Capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry analysis

Capillary electrophoresis (CE) experiments were carried out with a PA 800 plus CE system from Beckman Coulter (Brea, CA, USA) equipped with a temperature controlled autosampler and a power supply able to deliver up to 30 kV. Hyphenation was realized using a CESI prototype made available by Beckman Coulter. Prototype of bare fused-silica capillaries (total length 100 cm ; 30 μm inner.diameter(i.d)) which characteristic is a tip made porous by acidic attack on its final 3 cm supplied by Beckman Coulter, a second capillary (total length 80 cm ; 50 μm i.d.) filled during experiments with BGE allows electric contact. New capillaries were flushed for 10 min at 75 psi (5.17 bar) with methanol, then 10 min with 0.1 M sodium hydroxide, followed 10 min with 0.1 M hydrochloric acid and water for 20 min also at 75 psi. Finally capillary was flushed 10 min at 75 psi with background electrolyte (BGE). BGE used is acetic acid 10%. Hydrodynamic injection was used (0.41 mbar for 1 min) corresponding to a total volume of 100 nL of sample injected. Separations were performed using a voltage of +20 kV.

The CESI system was coupled to a microTOF-Q II mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany). The microTOF-Q II MS is equipped with a hybrid analyzer composed of a quadrupole followed by a time of flight (TOF) analyzer. Positive mode acquisition was used to detect precursor ions (MS) and fragmented product ions (MS/MS). Concerning the ESI source parameters, capillary voltage was set to -1.3 kV. Nebulizer gas was deactivated, the dry gas was set to 1.5 L.min⁻¹ and temperature of the source was set at 180°C. Spectra were collected at a data acquisition frequency of 2 Hz; for fragmentation spectra, collision energy ranged from 0 to 45 V depending on the m/z ratio and charge state of the precursor ion. For each MS scan, 3 precursor ions were selected for fragmentation, and total duty cycle was therefore 2 sec. Mass range was 100–3000 for MS as well as MS/MS scans.

Mass spectrometry data analysis

Data obtained from CESI-MS/MS experiments were processed using Mascot search algorithm developed by Matrix Science. Tryptic cleavage rules were applied and MS/MS spectra were compared to Swiss-Prot protein database (mammalian species). Carbamidomethylation of cysteine (+57.02 Da) was selected as a fixed modification, N-deamidation of aspartic/isoaspartic acid (+0.985 Da) or succinimide intermediate (-17.03 Da) were selected as a variable modifications. Methionine oxidation (+15.99 Da) and N-terminal glutamic acid cyclization (-17.02 Da) were also selected as variable modifications. The mass tolerance for

precursor ions was set to ± 25 ppm and to ± 0.5 Da for fragments. A maximum of 3 missed cleavages were tolerated.

Cell experiments

For cell experiments, the main work was performed with HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial cells). These primary cells were used at passages between 4 and 6. Two other cell types were used: 3T3 (mouse fibroblasts) and HGF (Human gingival fibroblasts). The culture medium used were Endothelial cell growth medium (Promocell) for HUVECs, DMEM High Glucose (PAA) for 3T3, and DEM low glucose (GibcoBRL, USA) for HGF. The supplement used for these cells were Supplement Mix C-39215 (mainly composed of heparin, hydrocortisone, fetal calf serum, basic fibroblast growth factor, epithelial growth factor and endothelial cell growth supplement) for HUVECs and foetal bovine serum (FBS) for 3T3 and HGF. For each experiment with HUVECs and 3T3, gelatin films were first crosslinked with transglutaminase solution and then 100 μ L of supplement was incubated for 30 minutes and finally films were sterilized with UV for 15 minutes. For frozen samples, after crosslinking with transglutaminase and incubation with the serum, films were dried for two hours under vacuum and then put at -20°C for at least one week before seeding them with HUVECs.

Seeding cells on gelatin films

For all cell experiments, the same protocol of seeding on gelatin films was used. Cells, in a 75 cm^3 flask, were first cultivated to near-confluent state and then they were trypsinized (4 mL of Trypsin and 5 minutes at 37°C). After that 6 mL of culture media was added to stop the reaction of trypsin and the cells were centrifuged (5 min at 1200 rpm). Then, cells were concentrated in 1 mL of culture media and they were counted with Neubauer chamber. For each experiment 50 000 cells were deposited on top of gelatin (previously spin coated on glass substrate) in a 24 well plate and the system was first put 15 minutes at 37°C for adhesion and after that 500 μ L of starvation medium (without supplement) was added. The plate was then put in incubator at 37°C .

Metabolic activity

To check the metabolic activity of cells, In Vitro Toxicology Assay Kit, a resazurin based test (Sigma Aldrich) was used. This test is based on the reduction of resazurin dye which will

become fluorescent (red) when incubated with viable cells. The protocol is the following: a solution of 10% of resazurin (v/v) in culture medium was prepared and then 500 μL was put in each well plate. The well plate was put 2 hours in incubator. After that, the solution was read in a SAFAS fluorometer ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 560\text{nm}/590\text{nm}$).

Apoptotic/Necrotic/Alive cells quantification

To check the viability of cells, Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit (Promokine) was used. This kit provides an assay for quantifying apoptotic (green fluorescence for FITC-Annexin), necrotic (redfluorescence for Ethidium homodimer III) and healthy cells (blue fluorescence for Hoechst) with fluorescent microscope. After resazurin test, films were rinsed several times with PBS. Then 50 μL of staining solution (5 μL of each dye for 100 μL of binding buffer provided by the kit) was incubated for 15 minutes at room temperature and after several rinsing steps the films were visualized with a fluorescent microscope (Nikon Eclipse TE 200, Japan).

Immunofluorescent staining

For the following protocols, two rinsing steps in PBS were performed after each incubation. Before immunofluorescent staining, cells were fixed with a 3.7% (v/v) solution of paraformaldehyde (PFA) solution in PBS. Then, cells were incubated 15 minutes with a triton solution (0.1% v/v in PBS). Finally cells were incubated overnight at 4°C with FBS (foetal bovine serum) solution (10% v/v in PBS).

Immunostaining for HUVECs

PECAM staining (green) was used to visualize contact point between cells, phalloidin (red) for actin filament and Hoechst 58 (blue) for nucleus. First, 90 μL of PECAM-1 goat antibody (4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in PBS, Santa Cruz) was incubated on each sample for 90 minutes. Then, 300 μL of secondary antibody (4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in PBS, anti goat@donkey FITC) was incubated for 30 minutes. Then, 300 μL of phalloidin solution (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in PBS, Sigma) was incubated for 15 minutes. Finally, a solution of hoechst 58 (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Sigma) was incubated for 5 minutes.

Staining for 3T3 fibroblasts

The same procedure was performed, except that PECAM staining was not used.

HGF spreading on gelatin films of various rigidity

To study the effect of substrate rigidity on cell spreading, gelatin films of different rigidity were prepared (see section *Addition of polystyrene nanoparticles to Gelatin film*). We used HGF (Human Gingival Fibroblast) cells seeded on the films for 24 hours at 50 000 cells per film in a normal medium (culture medium +10 % (v/v) FBS). Then, phalloidin staining was performed and cell areas were calculated for all conditions with ImageJ software [28]

Antibacterial assay

S. aureus (reference 25923, ATCC, France) strains were used to assess the antibacterial properties of the gelatin films loaded with penicillin streptomycin mixture or with the antimicrobial peptide, catestatin (home made synthesis [21]),. Bacterial strain was precultured aerobically at 37°C in a Mueller Hinton Broth (MHB) medium (Merck KGaA, , Germany), pH 7.3. One colony was transferred to 10 mL of MHB medium and incubated at 37°C for 18–20 h to provide a final density of 10^6 CFU mL⁻¹ (Colony-forming unit). To obtain bacteria in the mid logarithmic phase of growth, OD_{620 nm} of overnight culture was adjusted 0.001 m by diluting overnight culture of bacteria in MHB. To assess the short (1 day) and long term (2 days) antimicrobial effects of penicillin/streptomycin mixture (100U.mL⁻¹) and catestatin (100 µM), respective agent was adsorbed for 1 hour onto the gelatin films and 250 µL a mid-logarithmic phase culture of bacteria was incubated. Tetracycline (10 µg.mL⁻¹) and cefotaxime (0.1 µg.mL⁻¹) were used as a positive control. Antibacterial activity was assessed by measuring absorbance at 620 nm after respective time period at 37°C.

Supporting Information

Priming the Cells for Their Final Destination: Microenvironment Controlled Cell Culture by a Modular ECM-mimicking Feeder Layer

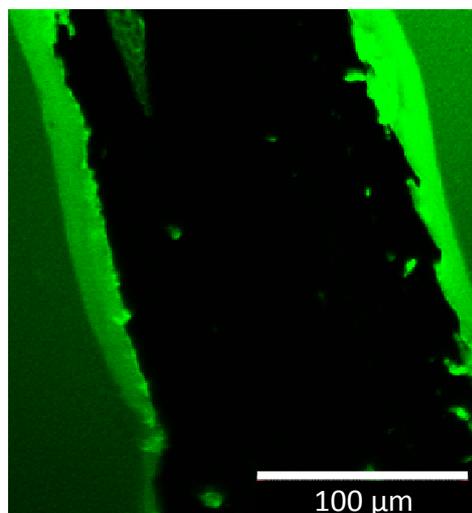


Figure S1. Observation by CLSM of the crosslinked gelatin film labeled with PLL^{FITC}. A scratch has been performed with a tip in the imaged area.

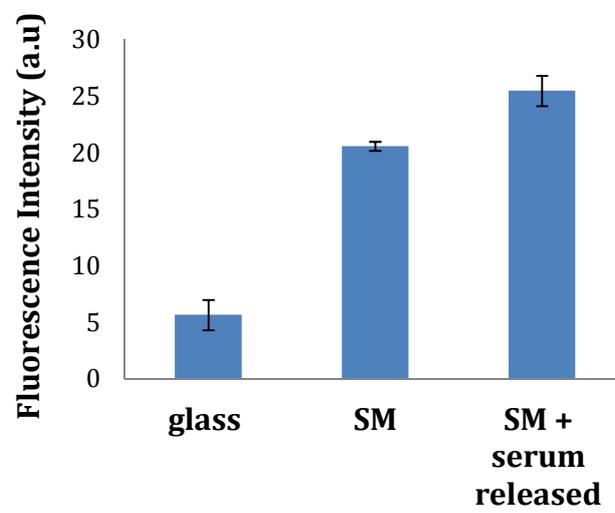


Figure S2. Metabolic activity of HUVEC cells seeded 3 days on glass slide with starvation conditions (glass), or on gelatin films in starvation conditions (SM), or on the gelatin film pre-incubated with growth factors (SM+serum released).

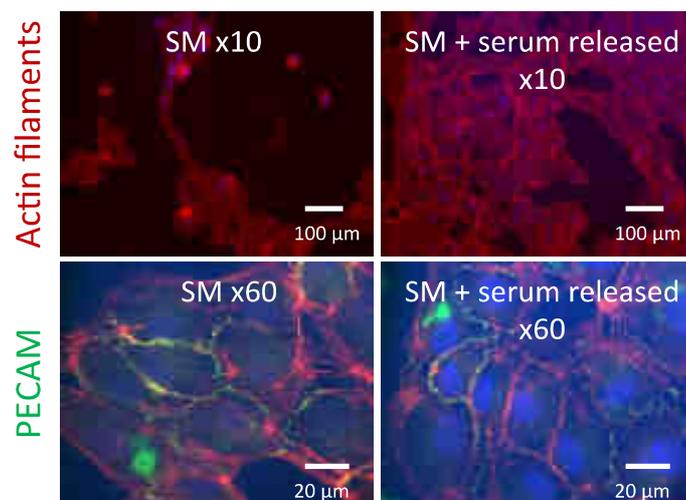


Figure S3. F-actin and PECAM labeling of HUVEC cells seeded 3 days on gelatin films in starvation conditions (SM), or on the gelatin film pre-incubated with growth factors (SM+serum released). For SM condition, occasional islands of cells were observed.

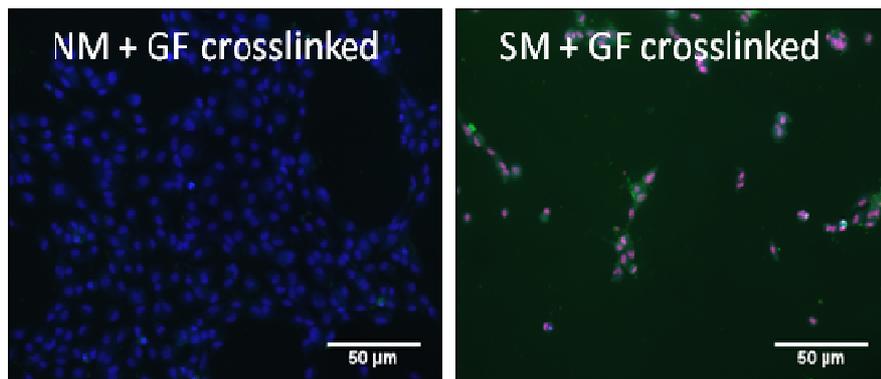


Figure S4. Observation of HUVEC cells (alive in blue, necrotic in red, apoptotic in green) after 1 day of seeding on gelatin films first loaded with growth factors and then crosslinked with transglutaminase. Normal medium (left image) or starvation medium (right image) were used. The release of loaded growth factors is necessary for cell survival.

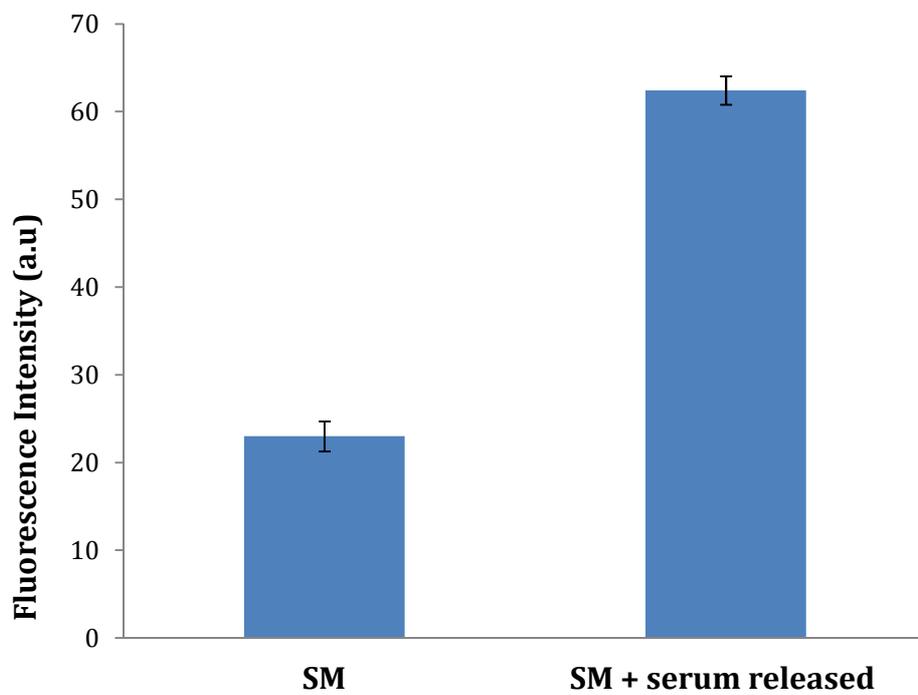
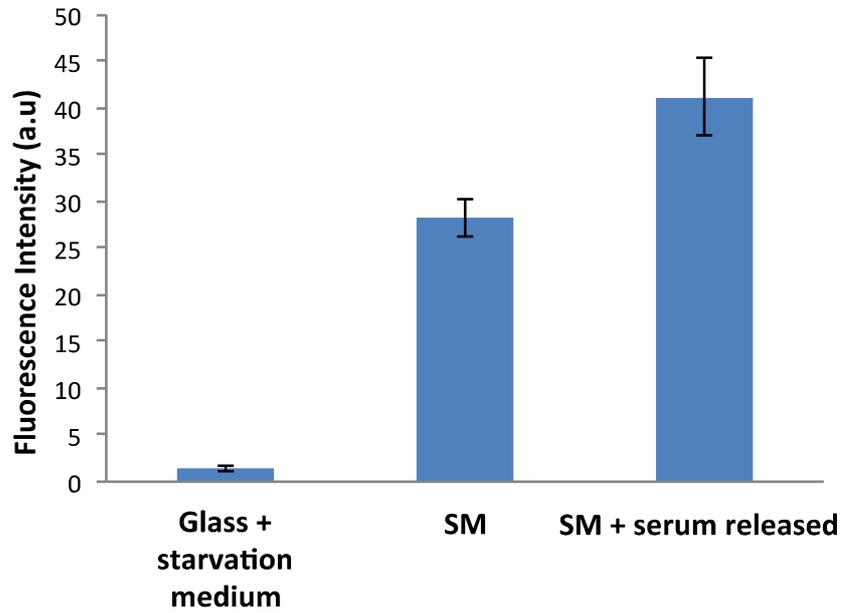


Figure S5. Metabolic activity of HUVEC cells seeded 3 days on, or on gelatin films in starvation conditions (SM) or on the gelatin film pre-incubated with growth factors (SM+serum released). Before seeding cells, films used were dried and stored at -20°C for a week.

a



b

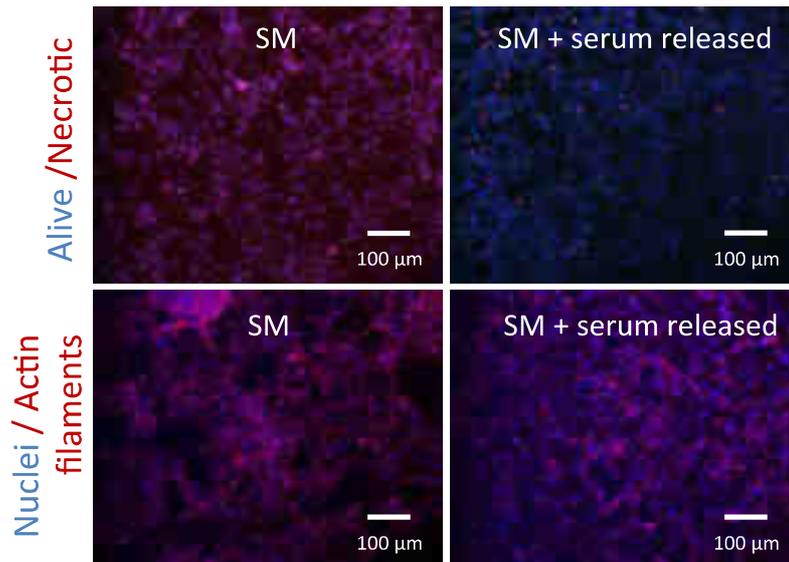


Figure S6. 3T3 fibroblast cells seeded 3 days on gelatin films in starvation conditions (SM) or on the gelatin film pre-incubated with growth factors (SM+serum released). a) Metabolic activity b) 3T3 labelling. Top images: alive (blue), necrotic (red) and apoptotic (green) cells. Bottom images : nucleus (blue), actin labelling (red).

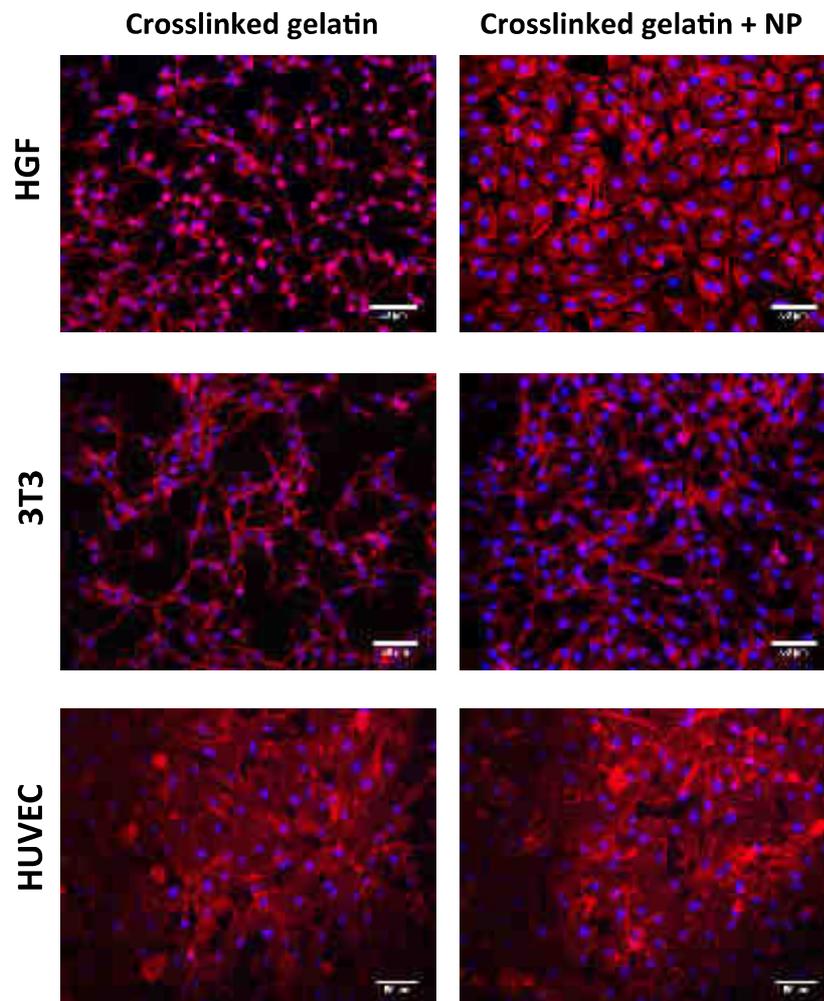
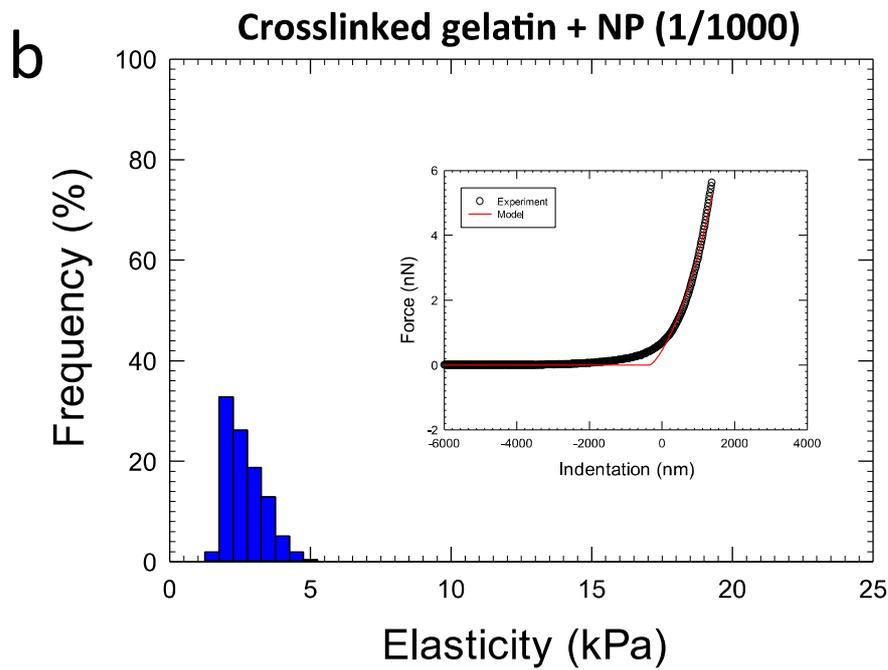
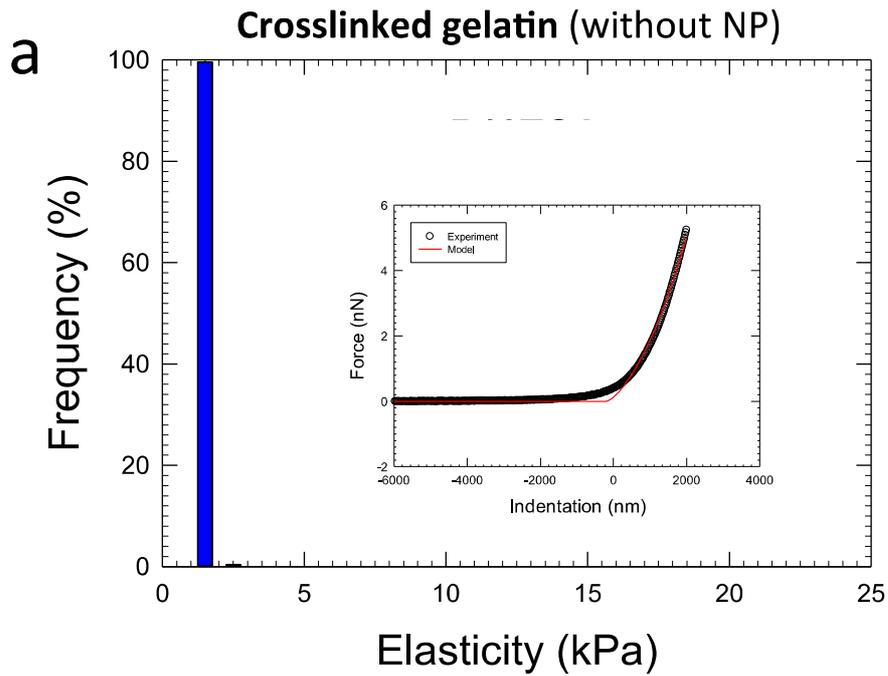


Figure S7. Effect of nanoparticle loading (dilution 1/500) in the gelatin film on spreading of HGF, 3T3 and HUVEC cells. Actin filaments have been labeled in red and nucleus in blue.



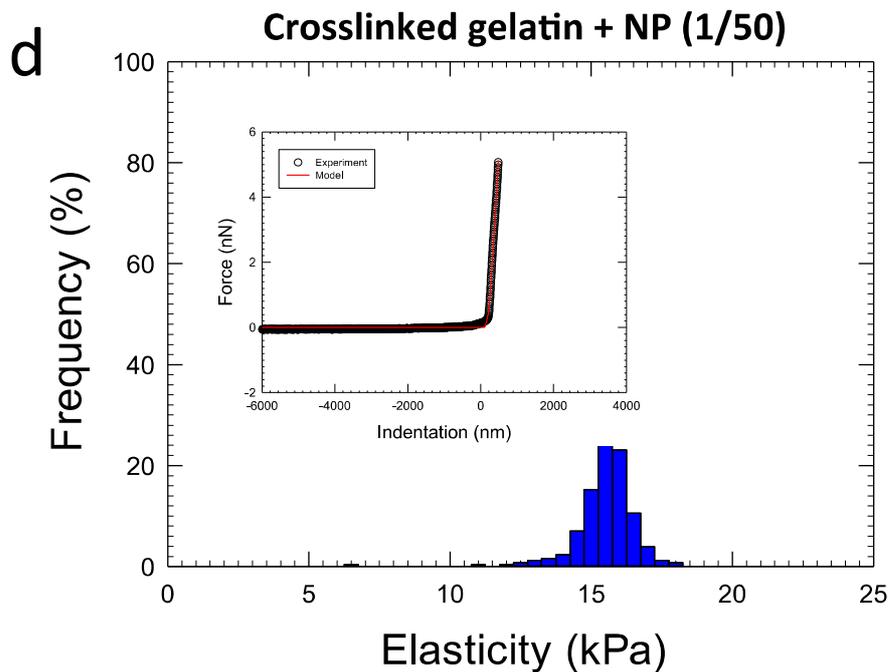
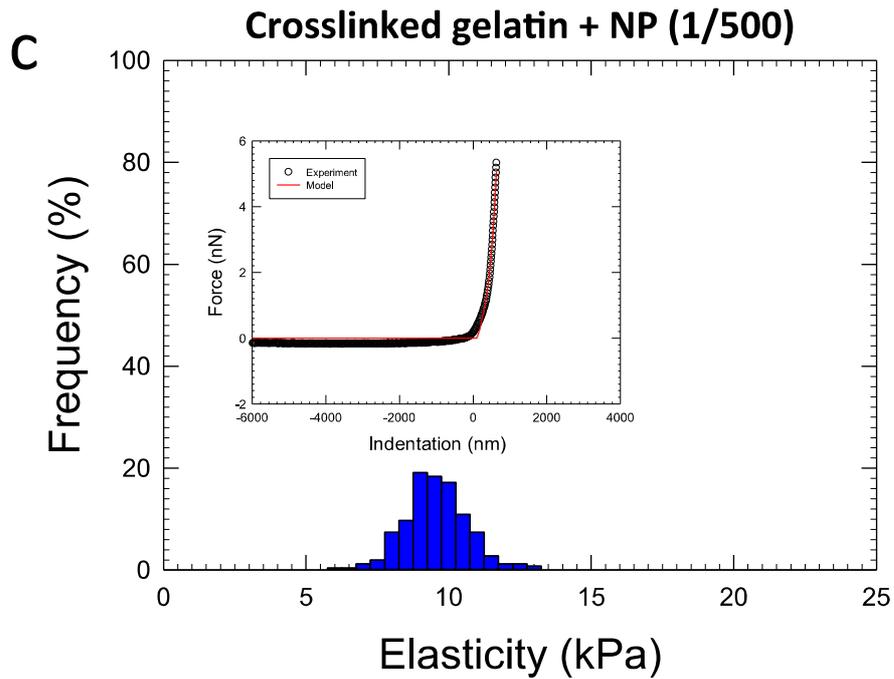


Figure S8. AFM nanoindentation experiments to determine Young modulus of gelatin films loaded with various concentrations of nanoparticles: a) without nanoparticles; b) with nanoparticles loaded with a solution diluted at 1/1000; c) with nanoparticles loaded with a solution diluted at 1/500; d) with nanoparticles loaded with a solution diluted at 1/50.

References

1. Celiz, A.D., et al., *Materials for stem cell factories of the future*. Nature materials, 2014. **13**(6): p. 570-579.
2. Discher, D.E., P. Janmey, and Y.-l. Wang, *Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate*. Science, 2005. **310**(5751): p. 1139-1143.
3. Brafman, D.A., et al., *Defining Long-Term Maintenance Conditions of Human Embryonic Stem Cells With Arrayed Cellular Microenvironment Technology*. Stem Cells and Development, 2009. **18**(8): p. 1141-1154.
4. Huang, N.F. and S. Li, *Regulation of the Matrix Microenvironment for Stem Cell Engineering and Regenerative Medicine*. Annals of Biomedical Engineering, 2011. **39**(4): p. 1201-1214.
5. Chen, F.M., M. Zhang, and Z.F. Wu, *Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering*. Biomaterials, 2010. **31**(24): p. 6279-6308.
6. Sala, A., et al., *Engineering 3D cell instructive microenvironments by rational assembly of artificial extracellular matrices and cell patterning*. Integrative Biology, 2011. **3**(11): p. 1102-1111.
7. Iozzo, R.V. and J.D. San Antonio, *Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena*. The Journal of clinical investigation, 2001. **108**(3): p. 349-355.
8. Mohammadi, M., S.K. Olsen, and R. Goetz, *A protein canyon in the FGF-FGF receptor dimer selects from an a la carte menu of heparan sulfate motifs*. Current opinion in structural biology, 2005. **15**(5): p. 506-516.
9. Zhu, Y., et al., *Type IIA procollagen containing the cysteine-rich amino propeptide is deposited in the extracellular matrix of prechondrogenic tissue and binds to TGF- β 1 and BMP-2*. The Journal of cell biology, 1999. **144**(5): p. 1069-1080.
10. Lee, K., E.A. Silva, and D.J. Mooney, *Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments*. Journal of The Royal Society Interface, 2011. **8**(55): p. 153-170.
11. Yeung, T., et al., *Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion*. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2005. **60**(1): p. 24-34.
12. Engler, A.J., et al., *Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification*. Cell, 2006. **126**(4): p. 677-689.
13. Ker, E.D.P., et al., *Bioprinting of growth factors onto aligned sub-micron fibrous scaffolds for simultaneous control of cell differentiation and alignment*. Biomaterials, 2011. **32**(32): p. 8097-8107.
14. Sun, Q., et al., *Sustained release of multiple growth factors from injectable polymeric system as a novel therapeutic approach towards angiogenesis*. Pharmaceutical research, 2010. **27**(2): p. 264-271.

15. Yilgor, P., et al., *An in vivo study on the effect of scaffold geometry and growth factor release on the healing of bone defects*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2012. **7**(9): p. 687-696.
16. Gahoual, R., et al., *Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2014. **406**(4): p. 1029-1038.
17. Ilan, N., et al., *PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine-phosphorylated beta-catenin*. Journal of Cell Science, 1999. **112**(18): p. 3005-3014.
18. Bigdeli, N., et al., *Adaptation of human embryonic stem cells to feeder-free and matrix-free culture conditions directly on plastic surfaces*. Journal of Biotechnology, 2008. **133**(1): p. 146-153.
19. Kocgozlu, L., et al., *Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells*. Journal of cell science, 2010. **123**(1): p. 29-39.
20. Glinel, K., et al., *Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches*. Acta biomaterialia, 2012. **8**(5): p. 1670-1684.
21. Aslam, R., et al., *Cateslytin, a chromogranin A derived peptide is active against Staphylococcus aureus and resistant to degradation by its proteases*. PloS one, 2013. **8**(7): p. e68993.
22. Lozito, T.P., et al., *Human Mesenchymal Stem Cells Express Vascular Cell Phenotypes Upon Interaction With Endothelial Cell Matrix*. Journal of Cellular Biochemistry, 2009. **107**(4): p. 714-722.
23. Greenlee, A., et al., *Comparison of Matrigel™ and gelatin substrata for feeder-free culture of undifferentiated mouse embryonic stem cells for toxicity testing*. Toxicology in vitro, 2005. **19**(3): p. 389-397.
24. Huang, H.-L., et al., *Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells*. Journal of Biomedical Science, 2010. **17**(1): p. 17-36.
25. Hermanson, G.T., in *Bioconjugate techniques*, G.T. Hermanson, Editor. 1996, Academic Press: San Diego. p. 169-176.
26. Dimitriadis, E.K., et al., *Determination of Elastic Moduli of Thin Layers of Soft Material Using the Atomic Force Microscope*. Biophys. J., 2002. **82**(5): p. 2798-2810.
27. Polyakov, P., et al., *Automated force volume image processing for biological samples*. PloS one, 2011. **6**(4): p. e18887.
28. Rasband, W., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://imagej.nih.gov/ij/>. 1997-2014.

4.3. Résultats complémentaires

4.3.1. Film nourricier à base de gélatine pour les cellules souches de la gelée de Wharton.

Des tests préliminaires sur les cellules souches de la gelée de Wharton ont été menés en collaboration avec l'unité « Biomatériaux et inflammation en site osseux » de l'Université de Reims Champagne Ardenne (Dr. Halima Kerdjoudj). Notre objectif est d'utiliser notre substrat nourricier à base de gélatine pour cultiver des cellules souches de la gelée de Wharton sans ajout de compléments dans le milieu de culture. Les cellules de la gelée de Wharton sont des cellules souches embryonnaires extraites de cordons ombilicaux humains. Ces cellules sont cultivées avec du milieu alpha-MEM (Lonza) supplémenté avec 10% (v/v) de SVF (sérum veau fœtal). Dans le cas de nos expériences, le SVF a été incubé (100 μ L, 30 minutes) sur notre film de gélatine préalablement réticulé avec la transglutaminase. Après rinçage, les cellules souches ont été cultivées sur ce film pendant 7 jours. Ces cellules ont été utilisées au passage 4 et elles ont étéensemencées 3400 cellules par film. Des quantifications d'ADN (« MasterPure DNA purification kit », Epicentre) ont été réalisées pour les jours 2, 4 et 7 (figure 72) pour mettre en évidence la prolifération des cellules et des tests LDH : Lactase Déshydrogénase (« Cytotoxicity Detection kit LDH », Roche) ont été effectués aux jours 2 et 4 pour mesurer la mort cellulaire (figure 73).

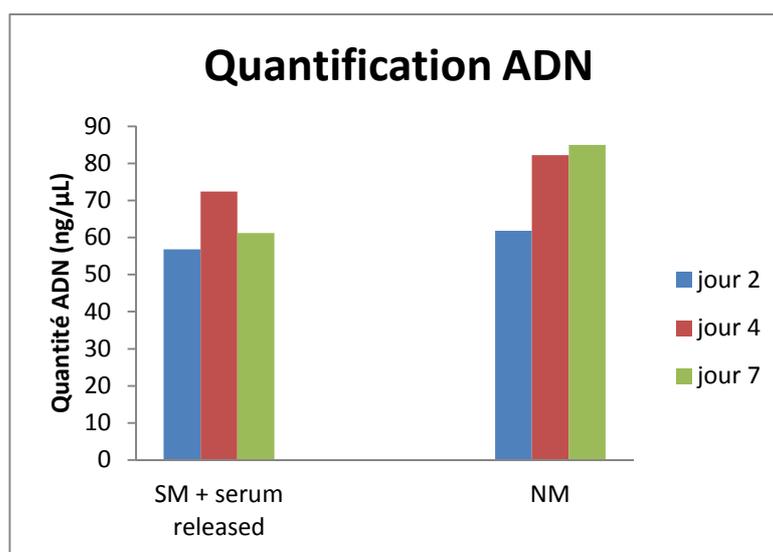


Figure 72. Quantification de l'ADN des cellules de la gelée de Wharton.

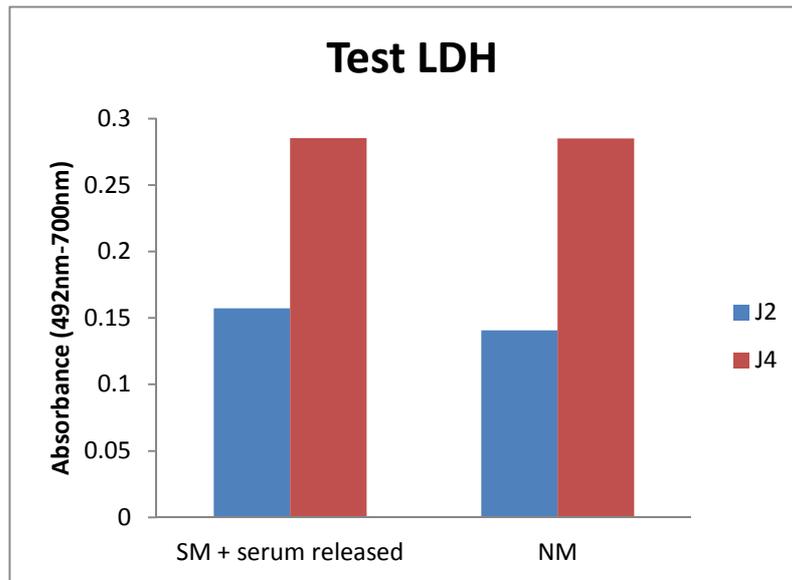


Figure 73. Quantification de la mortalité cellulaire par le test LDH.

En analysant la figure 72 (ci-dessus), on peut remarquer que la quantité d'ADN entre le film de gélatine pré-incubé avec du SVF (**SM + serum released**) et le témoin **NM** (cellules cultivées sur le film de gélatine de manière standard avec le milieu de culture contenant tous les suppléments nécessaires) est sensiblement la même dans les deux cas. Cela sous-entend que les cellules ont proliféré de la même façon dans les deux conditions testées. L'analyse de la figure 73 (ci-dessus) montre que la mortalité cellulaire a augmenté entre les jours 2 et 4 mais cette tendance est la même pour le témoin et le film pré-incubé avec du SVF. Cela signifie que l'incubation du SVF dans le film n'a pas provoqué de changement en termes de viabilité cellulaire comparé au témoin NM. En combinant les résultats obtenus, on peut dire que le SVF a donc été libéré du film permettant ainsi aux cellules de maintenir une activité et de proliférer.

Ces résultats sont issus de tests préliminaires et d'autres manipulations seraient nécessaires pour effectuer des tests statistiques sur les résultats. De plus, d'autres conditions comme le contrôle négatif sont encore à tester (cellules cultivées sur le film de gélatine sans SVF pré-incubé et sans SVF dans le milieu de culture (condition **SM**)).

4.3.2. Application de la stratégie de substrat nourricier pour des cellules dans un environnement 3D

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés dans un environnement 2D puisque les cellules ont été cultivées sur des films. La prochaine étape serait d'utiliser la même stratégie pour réaliser un substrat nourricier pour des cellules dans un environnement 3D. L'idée serait de réaliser un film nourricier à base de gélatine, chargé avec des facteurs de croissance tels que le VEGF et de l'utiliser pour alimenter des cellules encapsulées dans un gel 3D. Ces travaux auraient pour objectif de promouvoir l'angiogenèse. Ainsi pour réaliser la preuve de concept, des manipulations préliminaires ont été réalisées pour induire l'angiogenèse sur des cellules endothéliales (HUVEC) encapsulées dans un gel de gélatine.

Pour réaliser ces expériences, nous avons modifié la structure du film de gélatine en ajoutant de l'acide hyaluronique lors de son élaboration. En effet l'acide hyaluronique (HA) est connu pour ses propriétés angiogéniques (Collier *et al.* 2000). De plus c'est également un composant de la MEC et donc la structure du substrat nourricier se rapproche de celle de la MEC nécessaire au bon développement des cellules *in vivo*.

Pour résumer la stratégie utilisée, le film gélatine/HA sera élaboré en utilisant la méthode de « spin-coating » et réticulé avec la transglutaminase comme les films de gélatine décrits précédemment. Ensuite le VEGF sera chargé dans le film gélatine/HA. Après cela, un gel de gélatine contenant les cellules endothéliales encapsulées (cellules dans un environnement 3D) sera déposé sur le substrat nourricier gélatine/HA contenant le VEGF. Le VEGF devrait ensuite se libérer du substrat nourricier et alimenter les cellules endothéliales contenues dans le gel pour favoriser l'angiogenèse (figure 74).

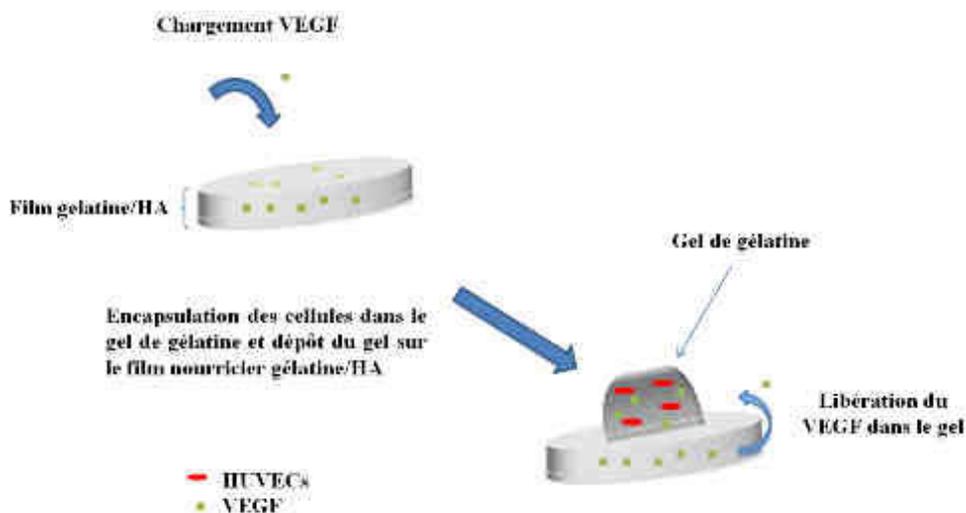


Figure 74. Schéma du principe de substrat cellulaire nourricier dans un environnement 3D.

4.3.2.1. Caractérisation des films nourriciers gélatine/HA

Les films de gélatine décrits précédemment étaient préparés avec une solution de gélatine à 15 % (m/v) dans du tampon NaCl/Tris (0.15M/10mM). Pour ce projet nous avons préparé les films gélatine/HA avec une solution contenant 14% de gélatine (m/v) et 1% de HA (m/v). Ensuite le protocole pour obtenir les films de gélatine/HA est similaire à celui utilisé pour les films de gélatine, c'est-à-dire que la première étape consiste à déposer par « spin-coating » le mélange gélatine/HA puis que dans la seconde étape la transglutaminase réticule les molécules de gélatine. L'épaisseur des films a été déterminée par microscopie confocale en marquant le film avec de la BSA^{FITC} (figure 75). L'épaisseur est passée de 10 μm dans le cas du film de gélatine à environ 22 μm dans le cas du film gélatine/HA. La distribution du HA au sein de ce film a également été caractérisée par microscopie confocale en utilisant l'acide hyaluronique marqué à la rhodamine (HA^{Rho}) (figure 76). Avec ces images nous avons pu constater que le HA se répartissait de manière uniforme dans le film.

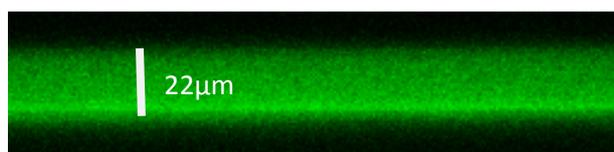


Figure 75. Image obtenue par microscopie confocale dans le plan xz d'un film gélatine/HA marqué avec de la BSA^{FITC}.

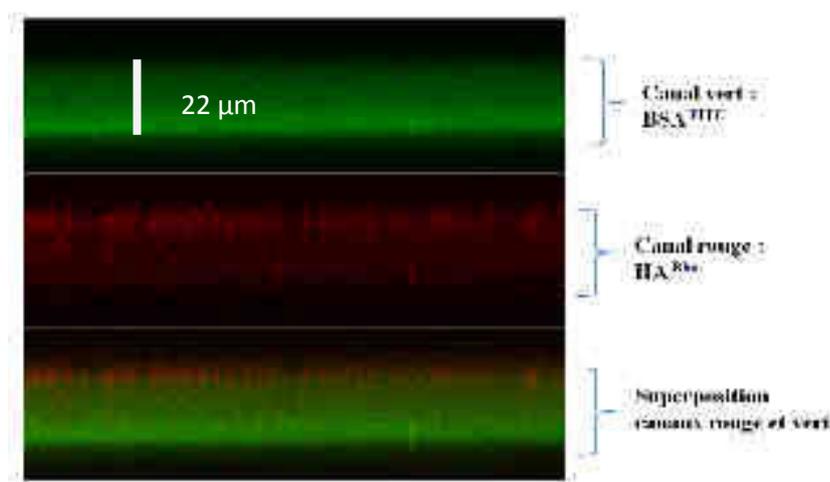


Figure 76. Image obtenue par microscopie confocale dans les trois canaux (vert, rouge, superposition vert-rouge) dans le plan x,z d'un film gélatine/HA^{Rho}.

Le chargement de VEGF dans le film gélatine/HA a été quantifié par un kit Elisa (« VEGF-A ELISA Kit PK-EL-64406 », Promocell). Pour charger le film, 50 μL de VEGF à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a été incubé pendant 30 minutes sur le film gélatine/HA et deux rinçages au PBS ont été effectués. Ensuite le film a été dégradé avec une solution de collagénase à 0.1 mg.mL^{-1} pendant 3 heures et la solution résultante a été analysée avec le kit Elisa. Les résultats ont montré que la quantité de VEGF chargée dans le film gélatine/HA était de $0.349 \mu\text{g}$. En considérant le volume du film qui est de $2.48 \times 10^{-3} \text{ mL}$, on estime que le VEGF est chargé dans le film à une concentration avoisinant $140 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Le film gélatine/HA non seulement agit comme un réservoir pour le VEGF, mais encore concentre cette molécule par rapport au milieu extérieur. Des tests de libération de VEGF à partir du film gélatine/HA doivent encore être réalisés pour compléter la caractérisation physico-chimique du film.

4.3.2.2. Encapsulation des cellules endothéliales (HUVEC) dans le gel de gélatine et déroulement de l'expérience

Dans cette partie, nous allons décrire le protocole utilisé pour encapsuler les HUVECs dans le gel de gélatine qui sera ensuite déposé sur le substrat nourricier gélatine/HA. Les cellules endothéliales ont été cultivées de manière standard comme décrit dans le chapitre 2.

Ensuite ces cellules ont été détachées par trypsinisation, centrifugées et reconcentrées dans du milieu de culture pour obtenir une concentration finale de 10^6 cellules.mL⁻¹.

Parallèlement, une solution de gélatine a été préparée à 6% (m/v) dans du milieu de culture et mis au bain marie à 37°C pour obtenir une solution homogène. Pour ces expériences, nous avons utilisé un autre type de gélatine (Gelatin from porcine skin, Sigma-Aldrich) avec un indice Bloom supérieur (300 g). En effet pour fabriquer un gel et non pas un film, nous avons besoin d'une tenue mécanique supérieure pour que le gel maintienne sa cohésion, d'où l'indice Bloom plus élevé.

Ensuite la solution de gélatine est stérilisée sous UV pendant 15 minutes, puis 1 mL de la solution de cellules (à une concentration de 10^6 cellules.mL⁻¹) dans le milieu de culture est transféré dans un tube de 15 mL et centrifugé. Le surnageant est retiré et 1 mL de la solution de gélatine est ajoutée sur les cellules afin d'obtenir une concentration de 10^6 cellules par mL de solution de gélatine. Après homogénéisation de la solution obtenue, 50 µL de cette solution (soit 5×10^4 cellules) sont déposés sur les films nourriciers gélatine/HA chargés en VEGF. Ces films ont été préalablement déposés dans des boîtes de 24 puits, et stérilisés sous UV. Ensuite 10 µL de solution de transglutaminase à 10 % (m/v) dans du PBS sont ajoutés sur l'ensemble film+gel pour le réticuler. L'ensemble est mis à l'étuve à 37 °C pendant 15 minutes pour permettre la gélification et la réticulation du gel. Enfin, 500 µL de milieu de culture sont ajoutés dans chaque puits et l'évolution cellulaire est suivie pendant 5 jours avec changement de milieu de culture au bout de 3 jours.

4.3.2.3. Résultats préliminaires

Pour mener cette expérience, trois conditions différentes ont été testées. La première condition (**glass**) est un contrôle permettant de suivre le comportement des cellules dans le gel de gélatine 3D sans le film-substrat nourricier gélatine/HA. Pour cela, nous avons simplement encapsulé les cellules dans le gel de gélatine et nous avons déposé ce gel sur une lamelle de verre. La deuxième condition testée (**Gel/HA no VEGF**) est également un contrôle pour observer le comportement des cellules dans le gel de gélatine 3D lorsque ce dernier est déposé sur un film gélatine/HA non incubé avec du VEGF. La dernière condition testée (**Gel/HA VEGF**) représente la finalité de notre étude et consiste à déposer le gel de gélatine contenant les cellules sur le substrat nourricier gélatine/HA pré-incubé avec du VEGF (tableau 17).

Notation	Gel déposé sur film gélatine/HA	Gel déposé sur lamelle de verre	Film gélatine/HA avec VEGF pré-incubé
"Glass"		X	
"Gel/HA no VEGF"	X		
"Gel/HA VEGF"	X		X

Tableau 17. Différentes conditions testées pour les expériences cellulaires

Après 5 jours d'expérience, les cellules endothéliales contenues dans le gel de gélatine (ayant évolué dans un environnement 3D) ont été fixées et marquées avec la phalloïdine (marquage des fibres d'actine du cytosquelette en rouge) et le Hoechst 33 358 (marquage du noyau en bleu). Ensuite des images 3D du gel de gélatine contenant les cellules marquées ont été obtenues par microscopie confocale. Les premiers résultats (figure 77) montrent l'apparition de structures du type vaisseaux dans le cas où les cellules encapsulées dans le gel de gélatine ont été déposées sur le film gélatine/HA incubé avec du VEGF (figure 77C). Ce premier résultat montre que notre film nourricier gélatine/HA a probablement été capable d'alimenter en VEGF les cellules encapsulées dans le gel.

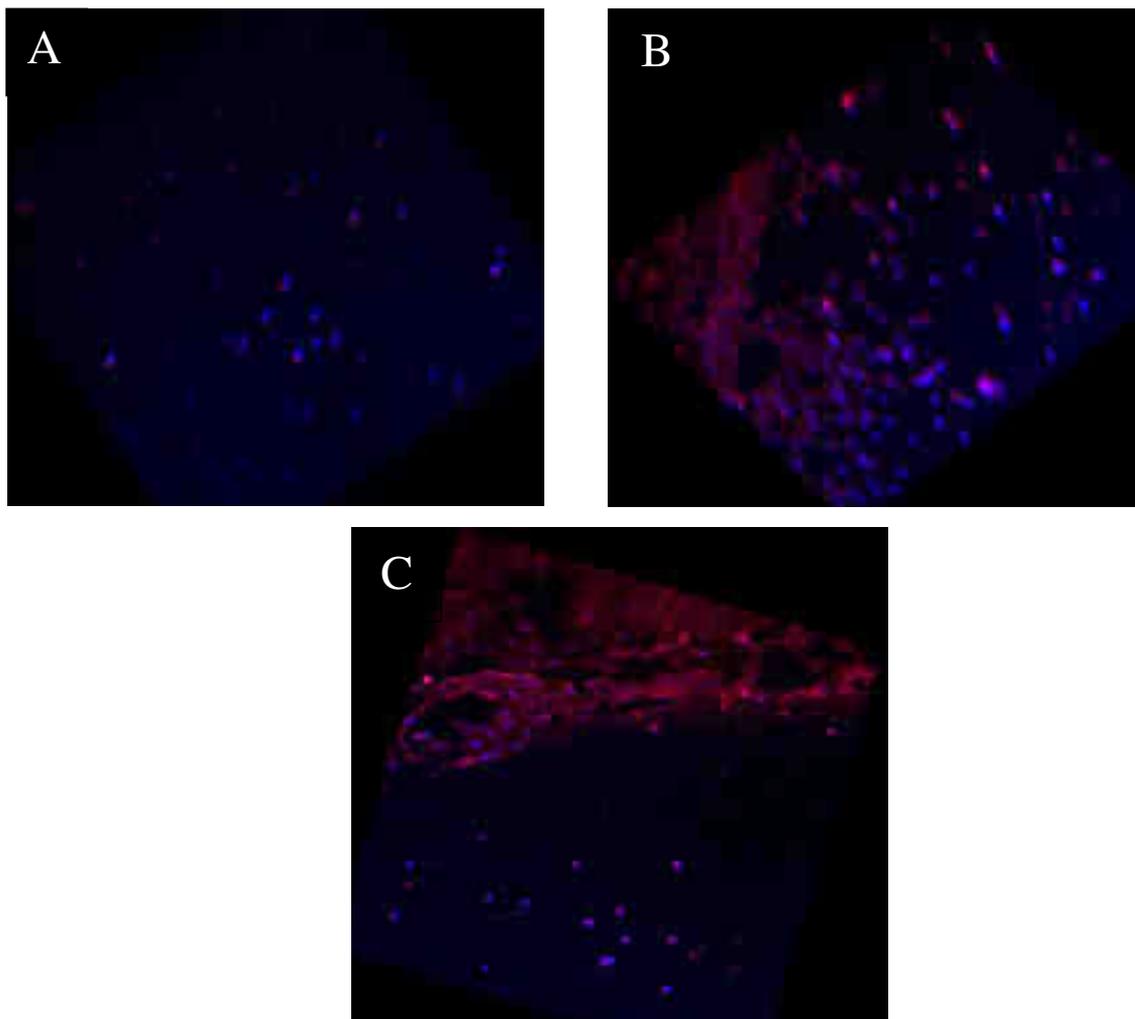


Figure 77. Images 3D obtenues par microscopie confocale des cellules HUVECs encapsulées dans un gel de gélatine et cultivées pendant 5 jours dans différentes conditions. Les cellules ont été marquées avec la phalloïdine (fibres d'actine en rouge) et le Hoechst 33 358 (noyaux en bleu). A) Condition « glass ». B) Condition « Gel/HA no VEGF ». C) Condition « Gel/HA VEGF ».

Ces résultats ne sont que des résultats préliminaires et d'autres expériences comme des expériences de co-culture (HUVECs + 3T3) sont prévues. De plus, des expériences avec d'autres facteurs de croissance comme BMP (Bone Morphogenic Protein) pour induire l'ostéogenèse sur des ostéoblastes seraient intéressantes à réaliser.

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse s'est articulé autour de l'élaboration de revêtements de surface à base de polymères et de composants naturels. Dans le cadre du premier projet, des revêtements surfaciques à base de films multicouches de polyélectrolytes ont été mis au point pour créer des surfaces mécano-sensibles. Dans le cadre du second projet, des revêtements à base de film de gélatine ont été élaborés pour créer des substrats cellulaires nourriciers. Dans les deux projets, ces revêtements trouvent des applications potentielles dans le domaine biomédical et/ou dans les stratégies d'ingénierie tissulaire.

Dans la première étude (chapitre 3), nous avons élaboré une surface mécano-sensible pour des applications de libération de molécules bioactives. Pour cela nous avons utilisé une structure multi-compartiments « réservoir/barrière » constituée de multicouches de polyélectrolytes. Les multicouches réservoir ont permis d'insérer un principe actif alors que la multicouche barrière qui recouvrent le réservoir permettent de maintenir confiné ce principe actif. L'objectif de ce travail était de libérer les molécules bioactives initialement incorporées dans la couche « réservoir » par étirement mécanique. Nous avons choisi de libérer la molécule bioactive par dégradation enzymatique de la strate « réservoir » et de déclencher cette dégradation enzymatique par étirement mécanique. Pour cela, les films multicouches de polyélectrolytes ont été construits sur un support élastomérique étirable. Ensuite nous avons appliqué un étirement longitudinal de $\alpha = 30\%$ pour perméabiliser la barrière et permettre la diffusion d'une enzyme à l'intérieur du « réservoir » provoquant ainsi sa dégradation et la libération du principe actif. L'étirement mécanique crée des fissures dans la barrière ce qui permet à l'enzyme de diffuser dans le réservoir et de dégrader ce dernier provoquant la libération des oligomères de polyélectrolytes dans le surnageant. En l'absence d'étirement, la barrière reste imperméable rendant la diffusion de l'enzyme à l'intérieur du réservoir impossible. Enfin comme preuve de concept, nous avons chargé une molécule anticancéreuse, le paclitaxel dans le film réservoir avant construction de la barrière. Nous avons suivi la libération de cette molécule anticancéreuse suite à l'application de l'étirement mécanique en présence de l'enzyme et nous avons pu démontrer que la molécule anticancéreuse se libérait pendant 8 heures après application de l'étirement mécanique.

Ces travaux représentent le premier exemple de libération contrôlée de molécules bioactives en utilisant le stimulus mécanique. Ils ouvrent des perspectives dans le domaine biomédical avec par exemple une application potentielle comme revêtement sur des stents actifs. En effet, pour éviter la recolonisation des cellules sur le stent après son implantation dans le corps ce qui peut provoquer une obturation de l'artère (restenose), il est nécessaire de libérer des agents antiprolifératifs comme le paclitaxel. Il serait donc intéressant d'utiliser les contraintes mécaniques subies par le stent lors de son implantation ou lors de son cycle de vie pour déclencher la libération de molécules antiprolifératives d'où l'utilisation de notre surface mécano-sensible. Dans des pathologies cardiaques moins graves, l'utilisation d'un ballon d'angioplastie peut suffire à redilater l'artère et éviter ainsi la pose d'un stent. Dans la même idée que pour les stents, des ballons actifs ont été développés pour délivrer des antiprolifératifs. Notre revêtement mécano-sensible pourrait également trouver des applications dans ce domaine en utilisant les contraintes mécaniques lors du gonflage du ballon dans l'artère pour permettre la libération d'agents antiprolifératifs comme le paclitaxel (Angioi 2012).

Dans la seconde étude (chapitre 4), nous avons mis au point un substrat cellulaire nourricier à base de gélatine. Ces travaux s'articulent autour d'une approche de « biomimétisme » puisque nous avons essayé en choisissant la gélatine, qui est du collagène dénaturé, de créer un substrat mimant la matrice extracellulaire. Ce film de gélatine a été réalisé en utilisant la technique de « spin-coating ». Pour stabiliser ce film et empêcher sa dissolution à 37°C lors des expériences cellulaires, il a été réticulé avec une enzyme, la transglutaminase. L'objectif de ce projet était de créer un substrat pour contrôler de manière précise le microenvironnement cellulaire.

Pour cela, nous nous sommes tout d'abord intéressés au contrôle biochimique du microenvironnement en chargeant dans le film les molécules bioactives contenues dans les sérums utilisés pour la culture cellulaire et en les libérant du film lors des expériences de culture cellulaire. Cette stratégie nous a permis de réaliser des expériences de culture cellulaire pendant 3 jours sans ajout de sérum dans le milieu de culture puisqu'il était contenu dans le substrat. Cette stratégie permet d'une part de réduire les coûts de culture cellulaire (l'ajout de sérum dans le milieu de culture représentent la partie la plus coûteuse de la culture cellulaire) et d'autre part d'empêcher la dégradation de ses molécules bioactives (la plupart des molécules bioactives dans le sérum se dégradent en milieu aqueux) car elles ne sont plus dans le surnageant mais dans le film. Les résultats ont montré que nous avons bien une

libération continue des protéines pendant 3 jours. Lors des expériences cellulaires l'activité métabolique des cellules et la viabilité cellulaire ont été mesurées aux jours 1 et 3. Le film nourricier à base de gélatine permet de maintenir une grande majorité des cellules viables pendant au moins 3 jours uniquement en présence dans le surnageant de milieu sans sérum, grâce à la libération des molécules bioactives qu'il contient. Egalement, des agents antimicrobiens comme la catestatine ou le mélange pénicilline/streptomycine ont été chargés dans le film de gélatine et l'activité antimicrobienne du film a été mise en évidence pendant au moins deux jours vis-à-vis de *S.Aureus*.

Ensuite nous nous sommes intéressés au contrôle biophysique du microenvironnement cellulaire. Pour cela nous avons chargé des nanoparticules de polystyrène dans le film de gélatine à différentes concentrations pour faire varier la rigidité du film. Les particules ont été incubées sur le film et ensuite ce dernier a été réticulé. Nous avons réalisé différents taux de chargement des nanoparticules dans le film et nous avons calculé le module de Young des films. Les résultats ont montré que nous pouvions ajuster le module de Young entre 1 kPa et 18 kPa. Nous avons donc réussi à moduler significativement la rigidité du film par l'ajout de particules. Ensuite nous avons étudié l'influence de la rigidité de notre substrat sur le comportement cellulaire. Les résultats ont montré qu'il était possible de moduler le comportement cellulaire en faisant varier la rigidité du film et notamment l'étalement des cellules augmentait avec la rigidité du film.

Ce substrat cellulaire nourricier aux propriétés biochimiques et biophysiques modulables permet donc le contrôle précis du microenvironnement cellulaire. De nombreuses perspectives sont possibles pour continuer ces travaux. Nous pourrions par exemple tenter de mimer le plus possible la structure de la MEC en ajoutant d'autres composants de la MEC dans la structure du film comme l'acide hyaluronique ou l'héparine. En effet l'héparine est connu pour avoir des domaines d'interactions spécifiques avec des facteurs de croissance comme le VEGF, le FGF ou encore les BMP et donc son utilisation permettrait d'immobiliser les facteurs de croissance dans le film ou de retarder leur libération. Nous pourrions aussi utiliser ces films nourriciers pour promouvoir la différenciation cellulaire. Il suffirait de charger dans le film toutes les molécules nécessaires pour promouvoir la différenciation des cellules souches vers un type cellulaire et de cultiver ces cellules souches sur ce film par la suite. Cela permettrait d'établir des substrats spécifiques pour tout type de différenciation cellulaire. Cependant, la différenciation cellulaire se déroule souvent sur plusieurs semaines et donc pour réaliser ce type de substrat, il faudrait améliorer la stabilité du film pour pouvoir

travailler sur des temps plus longs. Enfin, nous avons déjà entrepris des travaux pour utiliser ce substrat comme couche nourricière pour des cellules évoluant dans un environnement 3D (encapsulées dans un gel) ce qui permettrait de favoriser des processus comme l'angiogenèse ou l'ostéogenèse. En effet, le film serait chargé avec différents facteurs de croissance comme le VEGF ou BMP et alimenterait le gel contenant les cellules par libération de ses facteurs de croissance.

Références

Ahlfors, J.-E. W. et K. L. Billiar (2007). "Biomechanical and biochemical characteristics of a human fibroblast-produced and remodeled matrix." *Biomaterials* 28(13): 2183-2191.

Anderson, J. M. et M. S. Shive (2012). "Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres." *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, Supplement(0): 72-82.

Angioi, M. (2012). "Use of drug-eluting balloons for coronary interventions: current indications and perspectives". *Annales de cardiologie et d'angiologie*.

Argillier, J.-F. et D. Pasquier (2006). "Oil Reservoir Treatment Method By Injection of Nanoparticles Containing an Anti-Mineral Deposit Additive", Google Patents.

Aslam, R., M. Atindehou, T. Lavaux, Y. Haikel, F. Schneider et M. H Metz-Boutigue (2012). "Chromogranin A-derived peptides are involved in innate immunity." *Current medicinal chemistry* 19(24): 4115-4123.

Aubin, H., J. W. Nichol, C. B. Hutson, H. Bae, A. L. Sieminski, D. M. Cropek, P. Akhyari et A. Khademhosseini (2010). "Directed 3D cell alignment and elongation in microengineered hydrogels." *Biomaterials* 31(27): 6941-6951.

Awad, H. A., M. Quinn Wickham, H. A. Leddy, J. M. Gimble et F. Guilak (2004). "Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds." *Biomaterials* 25(16): 3211-3222.

Bacharouche, J., F. Badique, A. Fahs, M. V. Spanedda, A. Geissler, J.-P. Malval, M.-F. Vallat, K. Anselme, G. Francius, B. Frisch, J. Hemmerlé, P. Schaaf et V. Roucoules (2013). "Biomimetic Cryptic Site Surfaces for Reversible Chemo- and Cyto-Mechanoresponsive Substrates." *ACS Nano* 7(4): 3457-3465.

Bai, Y., G. Yin, Z. Huang, X. Liao, X. Chen, Y. Yao et X. Pu (2013). "Localized delivery of growth factors for angiogenesis and bone formation in tissue engineering." *International Immunopharmacology* 16(2): 214-223.

Barkalow, F. J. et J. E. Schwarzbauer (1991). "Localization of the major heparin-binding site in fibronectin." *Journal of Biological Chemistry* 266(12): 7812-7818.

Bigi, A., G. Cojazzi, S. Panzavolta, N. Roveri et K. Rubini (2002). "Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin." *Biomaterials* 23(24): 4827-4832.

- Bigi, A., G. Cojazzi, S. Panzavolta, K. Rubini et N. Roveri (2001). "Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking." *Biomaterials* 22(8): 763-768.
- Bigi, A., S. Panzavolta et K. Rubini (2004). "Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films." *Biomaterials* 25(25): 5675-5680.
- Binnig, G., C. F. Quate et C. Gerber (1986). "Atomic Force Microscope." *Physical Review Letters* 56(9): 930-933.
- Binnig, G. et H. Rohrer (1983). "Scanning tunneling microscopy." *Surface Science* 126(1-3): 236-244.
- Boisseau, P. et M. Lahmani (2009). Nanoscience: Nanobiotechnology and nanobiology, Springer.
- Boudou, T., P. Kharkar, J. Jing, R. Guillot, I. Pignot-Paintrand, R. Auzely-Velty et C. Picart (2012). "Polyelectrolyte multilayer nanoshells with hydrophobic nanodomains for delivery of Paclitaxel." *Journal of Controlled Release* 159(3): 403-412.
- Bouhadir, K. H., K. Y. Lee, E. Alsberg, K. L. Damm, K. W. Anderson et D. J. Mooney (2001). "Degradation of partially oxidized alginate and its potential application for tissue engineering." *Biotechnology progress* 17(5): 945-950.

- Cabanas-Danés, J., J. Huskens et P. Jonkheijm (2014). "Chemical strategies for the presentation and delivery of growth factors." *Journal of Materials Chemistry B*.
- Caruso, F., E. Donath et H. Möhwald (1998). "Influence of Polyelectrolyte Multilayer Coatings on Förster Resonance Energy Transfer between 6-Carboxyfluorescein and Rhodamine B-Labeled Particles in Aqueous Solution." *The Journal of Physical Chemistry B* 102(11): 2011-2016.
- Chang, J.-Y., J.-H. Lin, C.-H. Yao, J.-H. Chen, T.-Y. Lai et Y.-S. Chen (2007). "In Vivo Evaluation of a Biodegradable EDC/NHS-Cross-Linked Gelatin Peripheral Nerve Guide Conduit Material." *Macromolecular Bioscience* 7(4): 500-507.
- Chaubaroux, C., E. Vrana, C. Debry, P. Schaaf, B. Senger, J.-C. Voegel, Y. Haikel, C. Ringwald, J. Hemmerlé et P. Lavallo (2012). "Collagen-based fibrillar multilayer films cross-linked by a natural agent." *Biomacromolecules* 13(7): 2128-2135.

- Chen, F.-M., R. Chen, X.-J. Wang, H.-H. Sun et Z.-F. Wu (2009). "In vitro cellular responses to scaffolds containing two microencapsulated growth factors." *Biomaterials* 30(28): 5215-5224.
- Chen, F.-M., M. Zhang et Z.-F. Wu (2010). "Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering." *Biomaterials* 31(24): 6279-6308.
- Chen, F. M., R. M. Shelton, Y. Jin et I. L. Chapple (2009). "Localized delivery of growth factors for periodontal tissue regeneration: role, strategies, and perspectives." *Medicinal research reviews* 29(3): 472-513.
- Cheng, M., J. Deng, F. Yang, Y. Gong, N. Zhao et X. Zhang (2003). "Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions." *Biomaterials* 24(17): 2871-2880.
- Choi, Y. S., S. R. Hong, Y. M. Lee, K. W. Song, M. H. Park et Y. S. Nam (1999). "Studies on gelatin-containing artificial skin: II. Preparation and characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge." *Journal of biomedical materials research* 48(5): 631-639.
- Choi, Y. S., S. R. Hong, Y. M. Lee, K. W. Song, M. H. Park et Y. S. Nam (1999). "Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge." *Biomaterials* 20(5): 409-417.
- Cohen, G. B., R. Ren et D. Baltimore (1995). "Modular binding domains in signal transduction proteins." *Cell* 80(2): 237-248.
- Collier, J. H., J. P. Camp, T. W. Hudson et C. E. Schmidt (2000). "Synthesis and characterization of polypyrrole-hyaluronic acid composite biomaterials for tissue engineering applications." *Journal of Biomedical Materials Research* 50(4): 574-584.
- Collighan, R. J. et M. Griffin (2009). "Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins: biological significance and medical applications." *Amino Acids* 36(4): 659-670.
- Cross, M. et T. M. Dexter (1991). "Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis." *Cell* 64(2): 271-280.
- Crouzier, T., K. Ren, C. Nicolas, C. Roy et C. Picart (2009). "Layer-By-Layer Films as a Biomimetic Reservoir for rhBMP-2 Delivery: Controlled Differentiation of Myoblasts to Osteoblasts." *Small* 5(5): 598-608.

Davila, J., A. Chassepot, J. Longo, F. Boulmedais, A. Reisch, B. Frisch, F. Meyer, J.-C.

Voegel, P. J. Mésini, B. Senger, M.-H. Metz-Boutigue, J. Hemmerlé, P. Lavallo, P. Schaaf et L. Jierry (2011). "Cyto-mechanoresponsive Polyelectrolyte Multilayer Films." *Journal of the American Chemical Society* 134(1): 83-86.

De Carvalho, R. et C. Grosso (2004). "Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde." *Food hydrocolloids* 18(5): 717-726.

Decher, G. (1997). "Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites." *Science* 277(5330): 1232-1237.

Decher, G., J. Hong et J. Schmitt (1992). "Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces." *Thin Solid Films* 210: 831-835.

Discher, D. E., P. Janmey et Y.-I. Wang (2005). "Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate." *Science* 310(5751): 1139-1143.

Dong, Z., Q. Wang et Y. Du (2006). "Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release." *Journal of Membrane Science* 280(1-2): 37-44.

Draye, J.-P., B. Delaey, A. Van de Voorde, A. Van Den Bulcke, B. Bogdanov et E. Schacht (1998). "In vitro release characteristics of bioactive molecules from dextran dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel films." *Biomaterials* 19(1-3): 99-107.

Drury, J. L. et D. J. Mooney (2003). "Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications." *Biomaterials* 24(24): 4337-4351.

Dubas, S. T. et J. B. Schlenoff (1999). "Factors Controlling the Growth of Polyelectrolyte Multilayers." *Macromolecules* 32(24): 8153-8160.

Duranti, F., G. Salti, B. Bovani, M. Calandra et M. L. Rosati (1998). "Injectable hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation." *Dermatologic surgery* 24(12): 1317-1325.

Eastoe, J. (1957). "The amino acid composition of fish collagen and gelatin." *Biochemical Journal* 65(2): 363.

Elliott, J. T., A. Tona, J. T. Woodward, P. L. Jones et A. L. Plant (2003). "Thin films of collagen affect smooth muscle cell morphology." *Langmuir* 19(5): 1506-1514.

Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney et D. E. Discher (2006). "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification." *Cell* 126(4): 677-689.

Fisher, S., R. Y. Tam et M. Shoichet (2014). "Tissue Mimetics: Engineered Hydrogel

Matrices Provide Biomimetic Environments for Cell Growth." *Tissue Engineering*(ja).

Francius, G., J. Hemmerlé, J. Ohayon, P. Schaaf, J.-C. Voegel, C. Picart et 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.

Fraser, J. R. E., T. C. Laurent et U. B. G. Laurent (1997). "Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover." *Journal of Internal Medicine* 242(1): 27-33.

Fratzl, P., K. Misof, I. Zizak, G. Rapp, H. Amenitsch et S. Bernstorff (1998). "Fibrillar Structure and Mechanical Properties of Collagen." *Journal of Structural Biology* 122(1-2): 119-122.

Freeman S, H. H., Ed. (2005). Biological Science

Fridman, R., G. Giaccone, T. Kanemoto, G. R. Martin, A. F. Gazdar et J. L. Mulshine (1990). "Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(17): 6698-6702.

Frisch, S. et H. Francis (1994). "Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis." *The Journal of Cell Biology* 124(4): 619-626.

Gao, C., S. Leporatti, S. Moya, E. Donath et H. Möhwald (2001). "Stability and Mechanical

Properties of Polyelectrolyte Capsules Obtained by Stepwise Assembly of Poly(styrenesulfonate sodium salt) and Poly(diallyldimethyl ammonium) Chloride onto Melamine Resin Particles." *Langmuir* 17(11): 3491-3495.

Garrouste, F., C. Capo, A. Benoliel, P. Bongrand et R. Depieds (1982). "Nonspecific binding by macrophages: different modulation of adhesive properties of rat peritoneal cells after plating on a glass or a plastic surface." *Journal of the Reticuloendothelial Society* 31(5): 415-422.

- Garza, J. M., P. Schaaf, S. Muller, V. Ball, J.-F. Stoltz, J.-C. Voegel et P. Lavalle (2004). "Multicompartment Films Made of Alternate Polyelectrolyte Multilayers of Exponential and Linear Growth." *Langmuir* 20(17): 7298-7302.
- Giles, F. J. (2001). "The vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway: a therapeutic target in patients with hematologic malignancies." *The Oncologist* 6(Supplement 5): 32-39.
- Glinel, K., C. Déjugnat, M. Prevot, B. Schöler, M. Schönhoff et R. v. Klitzing (2007). "Responsive polyelectrolyte multilayers." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 303(1): 3-13.
- Glowacki, J. et S. Mizuno (2008). "Collagen scaffolds for tissue engineering." *Biopolymers* 89(5): 338-344.
- Green, A. E. S. et S. M. Sadrameli (2004). "Analytical representations of experimental polyethylene pyrolysis yields." *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 72(2): 329-335.
- Greenberg, C. S., P. J. Birckbichler et R. H. Rice (1991). "Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues." *The FASEB Journal* 5(15): 3071-3077.
- Guan, Y. et Y. Zhang (2011). "PNIPAM microgels for biomedical applications: From dispersed particles to 3D assemblies." *Soft Matter* 7(14): 6375-6384.
- Guo, B. et P. X. Ma (2014). "Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review." *Science China Chemistry* 57(4): 490-500.
- Guo, S. et B. B. Akhremitchev (2006). "Packing Density and Structural Heterogeneity of Insulin Amyloid Fibrils Measured by AFM Nanoindentation." *Biomacromolecules* 7(5): 1630-1636.

Haxaire, K., Y. Maréchal, M. Milas et M. Rinaudo (2003). "Hydration of polysaccharide hyaluronan observed by IR spectrometry. I. Preliminary experiments and band assignments." *Biopolymers* 72(1): 10-20.

Hay, E. D. (1991). *Cell biology of extracellular matrix*, Springer.

Hemmerlé, J., V. Roucoules, G. Fleith, M. Nardin, V. Ball, P. Lavalle, P. Marie, J. C. Voegel et P. Schaaf (2005). "Mechanically Responsive Films of Variable Hydrophobicity Made of Polyelectrolyte Multilayers." *Langmuir* 21(23): 10328-10331.

- Heskins, M. et J. E. Guillet (1968). "Solution properties of poly (N-isopropylacrylamide)." *Journal of Macromolecular Science—Chemistry* 2(8): 1441-1455.
- Hileman, R. E., J. R. Fromm, J. M. Weiler et R. J. Linhardt (1998). "Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins." *Bioessays* 20(2): 156-167.
- Hillberg, A. L., C. A. Holmes et 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.
- Huebsch, N., P. R. Arany, A. S. Mao, D. Shvartsman, O. A. Ali, S. A. Bencherif, J. Rivera-Feliciano et D. J. Mooney (2010). "Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate." *Nature materials* 9(6): 518-526.

- Iler, R. K. (1966). "Multilayers of colloidal particles." *Journal of Colloid and Interface Science* 21(6): 569-594.
- Ingar Draget, K., K. Østgaard et O. Smidsrød (1990). "Homogeneous alginate gels: a technical approach." *Carbohydrate Polymers* 14(2): 159-178.
- Iozzo, R. V. et A. D. Murdoch (1996). "Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function." *The FASEB Journal* 10(5): 598-614.
- Ito, Y. (2008). "Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering." *Soft Matter* 4(1): 46-56.

- Jaber, J. A. et J. B. Schlenoff (2005). "Polyelectrolyte multilayers with reversible thermal responsivity." *Macromolecules* 38(4): 1300-1306.
- Jaber, J. A. et J. B. Schlenoff (2006). "Mechanical properties of reversibly cross-linked ultrathin polyelectrolyte complexes." *Journal of the American Chemical Society* 128(9): 2940-2947.
- Jackson, D. G. (2003). "The Lymphatics Revisited: New Perspectives from the Hyaluronan Receptor LYVE-1." *Trends in Cardiovascular Medicine* 13(1): 1-7.

- Johnston, A. P., C. Cortez, A. S. Angelatos et F. Caruso (2006). "Layer-by-layer engineered capsules and their applications." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 11(4): 203-209.
- Jones, R., B. Nicholas, S. Mian, P. Davies et M. Griffin (1997). "Reduced expression of tissue transglutaminase in a human endothelial cell line leads to changes in cell spreading, cell adhesion and reduced polymerisation of fibronectin." *Journal of Cell Science* 110(19): 2461-2472.
- Jus, S., I. Stachel, M. Fairhead, M. Meyer, L. Thoeny-Meyer et G. M. Guebitz (2012). "Enzymatic cross-linking of gelatine with laccase and tyrosinase." *Biocatalysis and Biotransformation* 30(1): 86-95.

- Kadi, S., D. Cui, E. Bayma, T. Boudou, C. Nicolas, K. Glinel, C. Picart et R. Auzély-Velty (2009). "Alkylamino hydrazide derivatives of hyaluronic acid: synthesis, characterization in semidilute aqueous solutions, and assembly into thin multilayer films." *Biomacromolecules* 10(10): 2875-2884.
- Kempen, D. H. R., L. Lu, A. Heijink, T. E. Hefferan, L. B. Creemers, A. Maran, M. J. Yaszemski et W. J. A. Dhert (2009). "Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration." *Biomaterials* 30(14): 2816-2825.
- Kim, I.-Y., S.-J. Seo, H.-S. Moon, M.-K. Yoo, I.-Y. Park, B.-C. Kim et C.-S. Cho (2008). "Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications." *Biotechnology Advances* 26(1): 1-21.
- Kim, S.-H., J. Turnbull et S. Guimond (2011). "Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor." *Journal of Endocrinology* 209(2): 139-151.
- Kleinman, H. K. et G. R. Martin (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. Seminars in cancer biology, Elsevier.
- Klitzing, R. v. (2006). "Internal structure of polyelectrolyte multilayer assemblies." *Physical Chemistry Chemical Physics* 8(43): 5012-5033.
- Kohen, N. T., L. E. Little et K. E. Healy (2009). "Characterization of Matrigel interfaces during defined human embryonic stem cell culture." *Biointerphases* 4(4): 69-79.

- Konturek, S., W. Pawlik, W. Mysh, P. Gustaw, R. Sendur, E. Mikos et W. Bielański (1990). "Comparison of organ uptake and disappearance half-time of human epidermal growth factor and insulin." *Regulatory peptides* 30(2): 137-148.
- Kowanetz, M. et N. Ferrara (2006). "Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective." *Clinical Cancer Research* 12(17): 5018-5022.
- Kreuger, J., D. Spillmann, J.-p. Li et U. Lindahl (2006). "Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity." *The Journal of Cell Biology* 174(3): 323-327.
- Kulahin, N., S. Li, A. Hinsby, V. Kiselyov, V. Berezin et E. Bock (2008). "Fibronectin type III (FN3) modules of the neuronal cell adhesion molecule L1 interact directly with the fibroblast growth factor (FGF) receptor." *Molecular and Cellular Neuroscience* 37(3): 528-536.
- Kulcsár, Á., J.-C. Voegel, P. Schaaf et P. Kékicheff (2005). "Glassy State of Polystyrene Sulfonate/Polyallylamine Polyelectrolyte Multilayers Revealed by the Surface Force Apparatus." *Langmuir* 21(4): 1166-1170.

- Ladam, G., P. Schaad, J. C. Voegel, P. Schaaf, G. Decher et F. Cuisinier (1999). "In Situ Determination of the Structural Properties of Initially Deposited Polyelectrolyte Multilayers." *Langmuir* 16(3): 1249-1255.
- Langer, R. (1990). "New methods of drug delivery." *Science* 249(4976): 1527-1533.
- Lavalle, P., C. Gergely, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J. C. Voegel et 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.
- Lavalle, P., C. Picart, J. Mutterer, C. Gergely, H. Reiss, J.-C. Voegel, B. Senger et P. Schaaf (2003). "Modeling the Buildup of Polyelectrolyte Multilayer Films Having Exponential Growth χ ." *The Journal of Physical Chemistry B* 108(2): 635-648.
- Lee, K., E. A. Silva et D. J. Mooney (2011). "Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments." *Journal of The Royal Society Interface* 8(55): 153-170.
- Lee, K. Y. et D. J. Mooney (2001). "Hydrogels for tissue engineering." *Chemical reviews* 101(7): 1869-1880.

- Lee, K. Y., M. C. Peters, K. W. Anderson et D. J. Mooney (2000). "Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices." *Nature* 408(6815): 998-1000.
- Lee, K. Y., J. A. Rowley, P. Eiselt, E. M. Moy, K. H. Bouhadir et D. J. Mooney (2000). "Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density." *Macromolecules* 33(11): 4291-4294.
- Liang, H. C., W. H. Chang, H. F. Liang, M. H. Lee et H. W. Sung (2004). "Crosslinking structures of gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water-soluble carbodiimide." *Journal of applied polymer science* 91(6): 4017-4026.
- Lo, C.-M., H.-B. Wang, M. Dembo et Y.-l. Wang (2000). "Cell movement is guided by the rigidity of the substrate." *Biophysical journal* 79(1): 144-152.
- Lu, Z., C. M. Li, Q. Zhou, Q.-L. Bao et X. Cui (2007). "Covalently linked DNA/protein multilayered film for controlled DNA release." *Journal of Colloid and Interface Science* 314(1): 80-88.
- Lvov, Y., G. Decher, H. Haas, H. Möhwald et A. Kalachev (1994). "X-ray analysis of ultrathin polymer films self-assembled onto substrates." *Physica B: Condensed Matter* 198(1-3): 89-91.
- Lynd, L., M. Laser, D. Bransby, B. Dale, B. Davison, R. Hamilton, M. Himmel, M. Keller, J. McMillan, J. Sheehan et C. Wyman (2008). "How biotech can transform biofuels." *Nat Biotechnol* 26: 169 - 172.

- M**acdonald, M. L., R. E. Samuel, N. J. Shah, R. F. Padera, Y. M. Beben et P. T. Hammond (2011). "Tissue integration of growth factor-eluting layer-by-layer polyelectrolyte multilayer coated implants." *Biomaterials* 32(5): 1446-1453.
- Macri, L., D. Silverstein et R. A. F. Clark (2007). "Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering." *Advanced Drug Delivery Reviews* 59(13): 1366-1381.
- Makogonenko, E., G. Tsurupa, K. Ingham et L. Medved (2002). "Interaction of Fibrin(ogen) with Fibronectin: Further Characterization and Localization of the Fibronectin-Binding Site[†]." *Biochemistry* 41(25): 7907-7913.

- Mao, J., L. Zhao, K. de Yao, Q. Shang, G. Yang et Y. Cao (2003). "Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro." *Journal of biomedical materials research Part A* 64A(2): 301-308.
- McDermott, M. K., T. Chen, C. M. Williams, K. M. Markley et G. F. Payne (2004). "Mechanical properties of biomimetic tissue adhesive based on the microbial transglutaminase-catalyzed crosslinking of gelatin." *Biomacromolecules* 5(4): 1270-1279.
- Mertz, D., J. Hemmerle, F. Boulmedais, J.-C. Voegel, P. Lavallo et P. Schaaf (2007). "Polyelectrolyte multilayer films under mechanical stretch." *Soft Matter* 3(11): 1413-1420.
- Mertz, D., J. Hemmerlé, J. Mutterer, S. Ollivier, J.-C. Voegel, P. Schaaf et P. Lavallo (2007). "Mechanically Responding Nanovalves Based on Polyelectrolyte Multilayers." *Nano Letters* 7(3): 657-662.
- Mertz, D., C. Vogt, J. Hemmerle, J. Mutterer, V. Ball, J.-C. Voegel, P. Schaaf et P. Lavallo (2009). "Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation." *Nature Materials* 8(9): 731-735.
- Mertz, D., C. Vogt, J. Hemmerle, J. Mutterer, V. Ball, J. C. Voegel, P. Schaaf et P. Lavallo (2009). "Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation." *Nature Materials* 8(9): 731-735.
- Mieszawska, A. J. et D. L. Kaplan (2010). "Smart biomaterials-regulating cell behavior through signaling molecules." *BMC biology* 8(1): 59.
- Miron-Mendoza, M., J. Seemann et F. Grinnell (2010). "The differential regulation of cell motile activity through matrix stiffness and porosity in three dimensional collagen matrices." *Biomaterials* 31(25): 6425-6435.
- Mirzaei B, E., A. Ramazani SA, M. Shafiee et M. Danaei (2013). "Studies on glutaraldehyde crosslinked chitosan hydrogel properties for drug delivery systems." *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 62(11): 605-611.
- Mitra, S. K. et D. D. Schlaepfer (2006). "Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells." *Current Opinion in Cell Biology* 18(5): 516-523.
- Mitragotri, S. et J. Lahann (2009). "Physical approaches to biomaterial design." *Nature materials* 8(1): 15-23.
- Müller, S., G. Koenig, A. Charpiot, C. Debry, J. C. Voegel, P. Lavallo et D. Vautier (2008). "VEGF-Functionalized Polyelectrolyte Multilayers as Proangiogenic Prosthetic Coatings." *Advanced Functional Materials* 18(12): 1767-1775.

Nemir, S. et J. L. West (2010). "Synthetic materials in the study of cell response to substrate rigidity." *Annals of biomedical engineering* 38(1): 2-20.

Nichol, J. W., S. T. Koshy, H. Bae, C. M. Hwang, S. Yamanlar et A. Khademhosseini (2010). "Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels." *Biomaterials* 31(21): 5536-5544.

Orban, J. M., L. B. Wilson, J. A. Kofroth, M. S. El-Kurdi, T. M. Maul et D. A. Vorp (2004). "Crosslinking of collagen gels by transglutaminase." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 68A(4): 756-762.

Orban, J. M., L. B. Wilson, J. A. Kofroth, M. S. El-Kurdi, T. M. Maul et D. A. Vorp (2004). "Crosslinking of collagen gels by transglutaminase." *Journal of biomedical materials research Part A* 68(4): 756-762.

Park, Y. D., N. Tirelli et J. A. Hubbell (2003). "Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks." *Biomaterials* 24(6): 893-900.

Patterson, J., M. M. Martino et J. A. Hubbell (2010). "Biomimetic materials in tissue engineering." *Materials today* 13(1): 14-22.

Pelham, R. J. et Y.-L. Wang (1997). "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(25): 13661-13665.

Peyton, S. R., C. B. Raub, V. P. Keschrumrus et A. J. Putnam (2006). "The use of poly (ethylene glycol) hydrogels to investigate the impact of ECM chemistry and mechanics on smooth muscle cells." *Biomaterials* 27(28): 4881-4893.

Picart, C., P. Lavalley, P. Hubert, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf et J. C. Voegel (2001). "Buildup Mechanism for Poly(l-lysine)/Hyaluronic Acid Films onto a Solid Surface." *Langmuir* 17(23): 7414-7424.

- Picart, C., J. Mutterer, Y. Arntz, J.-C. Voegel, P. Schaaf et B. Senger (2005). "Application of fluorescence recovery after photobleaching to diffusion of a polyelectrolyte in a multilayer film." *Microscopy Research and Technique* 66(1): 43-57.
- Picart, C., J. Mutterer, L. Richert, Y. Luo, G. D. Prestwich, P. Schaaf, J.-C. Voegel et P. Lavallo (2002). "Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(20): 12531-12535.
- Price, K. J., A. Tsykin, K. M. Giles, R. T. Sladic, M. R. Epis, R. Ganss, G. J. Goodall et P. J. Leedman (2012). "Matrigel basement membrane matrix influences expression of microRNAs in cancer cell lines." *Biochemical and biophysical research communications* 427(2): 343-348.
- Pua, U. (2013). "Application of gelatin sponge sandwich as a hemostatic aid to percutaneous suture-mediated arteriotomy closure." *Journal of Vascular Surgery* 57(2): 583-585.

- R**amachandran, G. et G. Kartha (1955). "Structure of collagen." *Nature* 176(4482): 593-595.
- Ramachandran, G. N. (1956). "Structure of Collagen." *Nature* 174(4423): 2.
- Ren, K., J. Ji et J. Shen (2006). "Construction and enzymatic degradation of multilayered poly-L-lysine/DNA films." *Biomaterials* 27(7): 1152-1159.
- Rhee, S. et F. Grinnell (2007). "Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices." *Advanced Drug Delivery Reviews* 59(13): 1299-1305.
- Richardson, T. P., M. C. Peters, A. B. Ennett et D. J. Mooney (2001). "Polymeric system for dual growth factor delivery." *Nature biotechnology* 19(11): 1029-1034.
- Richert, L., A. J. Engler, D. E. Discher et C. Picart (2004). "Elasticity of native and cross-linked polyelectrolyte multilayer films." *Biomacromolecules* 5(5): 1908-1916.
- Ross-Murphy, S. B. (1992). "Structure and rheology of gelatin gels: recent progress." *Polymer* 33(12): 2622-2627.
- Rosso, F., A. Giordano, M. Barbarisi et A. Barbarisi (2004). "From cell-ECM interactions to tissue engineering." *Journal of cellular physiology* 199(2): 174-180.
- Ruhrberg, C., H. Gerhardt, M. Golding, R. Watson, S. Ioannidou, H. Fujisawa, C. Betsholtz et D. T. Shima (2002). "Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding

- VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis." *Genes & Development* 16(20): 2684-2698.
- Ruoslahti, E. (1988). "Fibronectin and its Receptors." *Annual Review of Biochemistry* 57(1): 375-413.
- Ruoslahti, E. (1996). "RGD AND OTHER RECOGNITION SEQUENCES FOR INTEGRINS." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12(1): 697-715.
- Ruths, J., F. Essler, G. Decher et 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.
- Schaefer, L. et R. V. Iozzo (2008). "Biological Functions of the Small Leucine-rich Proteoglycans: From Genetics to Signal Transduction." *Journal of Biological Chemistry* 283(31): 21305-21309.
- Schaefer, L. et R. Schaefer (2010). "Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules." *Cell and Tissue Research* 339(1): 237-246.
- Schneider, A., G. Francius, R. Obeid, P. Schwinté, J. Hemmerlé, B. Frisch, P. Schaaf, J.-C. Voegel, B. Senger et C. Picart (2005). "Polyelectrolyte Multilayers with a Tunable Young's Modulus: Influence of Film Stiffness on Cell Adhesion." *Langmuir* 22(3): 1193-1200.
- Sehgal, D. et I. K. Vijay (1994). "A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation." *Analytical biochemistry* 218(1): 87-91.
- Shen, Y. H., M. S. Shoichet et M. Radisic (2008). "Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells." *Acta biomaterialia* 4(3): 477-489.
- Shin, H., S. Jo et A. G. Mikos (2003). "Biomimetic materials for tissue engineering." *Biomaterials* 24(24): 4353-4364.
- Shiratori, S. S. et M. F. Rubner (2000). "pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes." *Macromolecules* 33(11): 4213-4219.

- Silva, E. et D. Mooney (2007). "Spatiotemporal control of vascular endothelial growth factor delivery from injectable hydrogels enhances angiogenesis." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5(3): 590-598.
- Singh, D. K. et A. R. Ray (2000). "Biomedical applications of chitin, chitosan, and their derivatives." *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* 40(1): 69-83.
- Sokolsky-Papkov, M., K. Agashi, A. Olaye, K. Shakesheff et A. J. Domb (2007). "Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering." *Advanced Drug Delivery Reviews* 59(4-5): 187-206.
- Sugrue, S. P. et E. D. Hay (1981). "Response of basal epithelial cell surface and Cytoskeleton to solubilized extracellular matrix molecules." *The Journal of Cell Biology* 91(1): 45-54.
- Sukhishvili, S. A. (2005). "Responsive polymer films and capsules via layer-by-layer assembly." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10(1): 37-44.
- Sundararaghavan, H. G., G. A. Monteiro, N. A. Lapin, Y. J. Chabal, J. R. Miksan et D. I. Shreiber (2008). "Genipin-induced changes in collagen gels: Correlation of mechanical properties to fluorescence." *Journal of biomedical materials research Part A* 87(2): 308-320.
- Sundararaj, S. C., M. V. Thomas, R. Peyyala, T. D. Dziubla et D. A. Puleo (2013). "Design of a multiple drug delivery system directed at periodontitis." *Biomaterials* 34(34): 8835-8842.

- Tabata, Y. et Y. Ikada (1998). "Protein release from gelatin matrices." *Advanced Drug Delivery Reviews* 31(3): 287-301.
- Taddei, P., V. Chiono, A. Anghileri, G. Vozzi, G. Freddi et G. Ciardelli (2013). "Silk Fibroin/Gelatin Blend Films Crosslinked with Enzymes for Biomedical Applications." *Macromolecular bioscience* 13(11): 1492-1510.
- Tibbitt, M. W. et K. S. Anseth (2009). "Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture." *Biotechnology and Bioengineering* 103(4): 655-663.
- Tognana, E., A. Borriore, C. De Luca et A. Pavesio (2007). "Hyalograft® C: hyaluronan-based scaffolds in tissue-engineered cartilage." *Cells Tissues Organs* 186(2): 97-103.

- Tong, W., C. Gao et H. Möhwald (2006). "Stable weak polyelectrolyte microcapsules with pH-responsive permeability." *Macromolecules* 39(1): 335-340.
- Trappmann, B. et C. S. Chen (2013). "How cells sense extracellular matrix stiffness: a material's perspective." *Current opinion in biotechnology* 24(5): 948-953.
- Turley, E. A., P. W. Noble et L. Y. W. Bourguignon (2002). "Signaling Properties of Hyaluronan Receptors." *Journal of Biological Chemistry* 277(7): 4589-4592.

Underhill, C. (1992). "CD44: The hyaluronan receptor." *Journal of Cell Science* 103(2): 293-298.

- Usta, M., D. Piech, R. MacCrone et W. Hillig (2003). "Behavior and properties of neat and filled gelatins." *Biomaterials* 24(1): 165-172.
- Üzüm, C., J. Hellwig, N. Madaboosi, D. Volodkin et R. von Klitzing (2012). "Growth behaviour and mechanical properties of PLL/HA multilayer films studied by AFM." *Beilstein journal of nanotechnology* 3(1): 778-788.

Varkey, M., S. A. Gittens et H. Uludag (2004). "Growth factor delivery for bone tissue repair: an update." *Expert Opinion on Drug Delivery* 1(1): 19-36.

Vautier, D., J. Hemmerlé, C. Vodouhe, G. Koenig, L. Richert, C. Picart, J.-C. Voegel, C. Debry, J. Chluba et J. Ogier (2003). "3-D surface charges modulate protrusive and contractile contacts of chondrosarcoma cells." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 56(3): 147-158.

Veis, A. (1964). "The macromolecular chemistry of gelatin."

Veis, A. et J. Cohen (1960). "Reversible transformation of gelatin to the collagen structure."

Vercruyse, K. P., D. M. Marecak, J. F. Marecek et G. D. Prestwich (1997). "Synthesis and in vitro degradation of new polyvalent hydrazide cross-linked hydrogels of hyaluronic acid." *Bioconjugate chemistry* 8(5): 686-694.

Vodouhê, C., E. L. Guen, J. M. Garza, G. Francius, C. Déjugnat, J. Ogier, P. Schaaf, J.-C. Voegel et P. Lavalley (2006). "Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films." *Biomaterials* 27(22): 4149-4156.

- Vodouhê, C., E. Le Guen, J. M. Garza, G. Francius, C. Déjugnat, J. Ogier, P. Schaaf, J.-C. Voegel et P. Lavallo (2006). "Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films." *Biomaterials* 27(22): 4149-4156.
- Vrana, N. E., P. A. Cahill et G. B. McGuinness (2010). "Endothelialization of PVA/gelatin cryogels for vascular tissue engineering: Effect of disturbed shear stress conditions." *Journal of biomedical materials research Part A* 94(4): 1080-1090.

- Wang, H.-B., M. Dembo et Y.-L. Wang (2000). "Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 279(5): C1345-C1350.
- Wang, J., W. Fu, D. Zhang, X. Yu, J. Li et C. Wan (2010). "Evaluation of novel alginate dialdehyde cross-linked chitosan/calcium polyphosphate composite scaffolds for meniscus tissue engineering." *Carbohydrate Polymers* 79(3): 705-710.
- Wang, Y., G. Wang, X. Luo, J. Qiu et C. Tang (2012). "Substrate stiffness regulates the proliferation, migration, and differentiation of epidermal cells." *Burns* 38(3): 414-420.
- Watt, F. M. H., Wilhelm T. S. (2013). "Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(8).
- Wijelath, E. S., S. Rahman, M. Namekata, J. Murray, T. Nishimura, Z. Mostafavi-Pour, Y. Patel, Y. Suda, M. J. Humphries et M. Sobel (2006). "Heparin-II Domain of Fibronectin Is a Vascular Endothelial Growth Factor-Binding Domain Enhancement of VEGF Biological Activity by a Singular Growth Factor/Matrix Protein Synergism." *Circulation research* 99(8): 853-860.
- Wohl, B. M. et J. F. Engbersen (2012). "Responsive layer-by-layer materials for drug delivery." *Journal of Controlled Release* 158(1): 2-14.

- Yakimets, I., N. Wellner, A. C. Smith, R. H. Wilson, I. Farhat et J. Mitchell (2005). "Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state." *Polymer* 46(26): 12577-12585.

- Yamamoto, M., Y. Ikada et Y. Tabata (2001). "Controlled release of growth factors based on biodegradation of gelatin hydrogel." *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 12(1): 77-88.
- Zhang, G. et L. J. Suggs (2007). "Matrices and scaffolds for drug delivery in vascular tissue engineering." *Advanced Drug Delivery Reviews* 59(4): 360-373.
- Zhang, H., A. Patel, A. K. Gaharwar, S. M. Mihaila, G. Iviglia, S. Mukundan, H. Bae, H. Yang et A. Khademhosseini (2013). "Hyperbranched polyester hydrogels with controlled drug release and cell adhesion properties." *Biomacromolecules* 14(5): 1299-1310.
- Zhang, J., B. Senger, D. Vautier, C. Picart, P. Schaaf, J.-C. Voegel et P. Lavallo (2005). "Natural polyelectrolyte films based on layer by layer deposition of collagen and hyaluronic acid." *Biomaterials* 26: 3353-3361.
- Zhao, W., S. A. McCallum, Z. Xiao, F. Zhang et R. J. Linhardt (2012). "Binding affinities of vascular endothelial growth factor (VEGF) for heparin-derived oligosaccharides." *Bioscience reports* 32(1): 71-81.
- Zhu, H. et M. J. McShane (2005). "Macromolecule encapsulation in diazoresin-based hollow polyelectrolyte microcapsules." *Langmuir* 21(1): 424-430.
- Zhu, Y., A. Oganessian, D. R. Keene et L. J. Sandell (1999). "Type IIA procollagen containing the cysteine-rich amino propeptide is deposited in the extracellular matrix of prechondrogenic tissue and binds to TGF- β 1 and BMP-2." *The Journal of Cell Biology* 144(5): 1069-1080.
- Zhu, Y., J. Shi, W. Shen, X. Dong, J. Feng, M. Ruan et Y. Li (2005). "Stimuli-Responsive Controlled Drug Release from a Hollow Mesoporous Silica Sphere/Polyelectrolyte Multilayer Core-Shell Structure." *Angewandte Chemie* 117(32): 5213-5217.
- Zhu, Z., E. Senses, P. Akcora et S. A. Sukhishvili (2012). "Programmable light-controlled shape changes in layered polymer nanocomposites." *ACS Nano* 6(4): 3152-3162.
- Zorlutuna, P., N. E. Vrana et A. Khademhosseini (2013). "The Expanding World of Tissue Engineering: The Building Blocks and New Applications of Tissue Engineered Constructs." *Biomedical Engineering, IEEE Reviews in* 6: 47-62.

Publications scientifiques

- **Barthes Julien**, Mertz Damien, Bach Charlotte, Metz-Boutigue Marie-Hélène, Senger Bernard, Voegel Jean-Claude, Schaaf Pierre, Lavallo Philippe. *Stretch-Induced Biodegradation of Polyelectrolyte Multilayer Films for Drug Release*. Langmuir, 2012, 28(38), 13550-13554.
- **Barthes Julien**, Ozcelik Hayriye, Hindie Mathilde, Ndreu-Halili Albana, Hasan Anwarul, Vrana Nihal Engin. *Cell microenvironment Engineering and Monitoring for Tissue Engineering and Regenerative Medicine: The Recent Advances*. Accepté dans BioMed Research International.
- Mertz Damien, Affolter-Zbaraszczuk Christine, **Barthes Julien**, Cui Jiwei, Caruso Frank, Baumert Thomas F, Voegel Jean-Claude; Ogier Joelle, Meyer Florent. *Templated assembly of albumin-based nanoparticles for simultaneous gene silencing and magnetic resonance imaging*. En révision dans Nanoscale.
- **Barthes Julien**, Vrana Nihal Engin, Ozcelik Hayriye, Bacharouche Jalal, Francius Grégory, Gahoual Rabah, François Yannis, Hemmerlé Joseph, Senger Bernard, Schaaf Pierre, Lavallo Philippe. *Priming the Cells for Their Final Destination: Microenvironment Controlled Cell Culture by a Modular ECM-mimicking Feeder Layer*. En préparation.

Communications

- Workshop ETH (Zurich)-INSERM U 977, Pr J. Vörös and Dr J.-C. Voegel, Titisee, Allemagne, Novembre 2011. « Stretch-Induced Biodegradation of Polyelectrolyte Multilayer Films for Drug Release » (présentation orale).
- 9th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON POLYELECTROLYTES, Lausanne, Suisse, Juillet 2012. « Stretch-Induced Biodegradation of Polyelectrolyte Multilayer Films for Drug Release » (présentation orale).
- 5^{ème} journée scientifique du Pôle Matériaux et Nanosciences Alsace (PMNA), Strasbourg, France, Octobre 2012. « Stretch-Induced Biodegradation of Polyelectrolyte Multilayer Films for Drug Release » (poster).
- TERMIS-EU Meeting, Gênes, Italie, Juin 2014. « Control of Cell Culture Microenvironment by a Modular ECM-mimicking Gelatin-based Substrate » (présentation orale).

Enseignements

- Moniteur de travaux pratiques en mécanique des fluides, 2^{ème} IUT, IUT Louis Pasteur, Schiltigheim, France, 2011-2014.
- Moniteur de travaux pratiques en thermiques, 1^{ère} année IUT, IUT Louis Pasteur, Schiltigheim, France, 2011.



Julien BARTHES

**Revêtements surfaciques à base de polymères et de composants naturels :
applications à la mise au point de surfaces mécano-sensibles
et de substrats cellulaires nourriciers**

Résumé

Cette thèse s'est articulée autour de l'élaboration de revêtements surfaciques à base de polymères et de composants naturels. Dans un premier projet, des surfaces mécano-sensibles pour des applications de libération de molécules bioactives ont été élaborées. Des films de multicouches polyélectrolytes constitués d'une strate « réservoir » permettant le chargement d'une molécule bioactive, le paclitaxel, et d'une strate « barrière » mécano-sensible recouvrant ce réservoir et confinant le paclitaxel ont été élaborés. Lors de la mise sous étirement du film, la barrière est rendue perméable vis-à-vis d'une enzyme présente dans le surnageant. Cette enzyme induit ensuite la dégradation enzymatique du « réservoir » et la libération du paclitaxel. Dans un second projet, des substrats cellulaires nourriciers ont été réalisés à partir de films minces de gélatine réticulés mimant la matrice extracellulaire. Ces films peuvent être chargés: 1) en facteurs de croissance, ce qui permet de s'affranchir ensuite de l'ajout de ces molécules dans le milieu de culture; 2) en nanoparticules afin de moduler les propriétés mécaniques des films; 3) en agents antimicrobiens pour assurer une stérilité de la culture cellulaire. Ainsi, ces substrats aux propriétés biochimiques et biophysiques modulables permettent un contrôle précis du microenvironnement cellulaire.

Mots clés : films multicouches de polyélectrolytes, surface mécano-responsive, libération contrôlée, dégradation enzymatique substrat de culture cellulaire, matrice extracellulaire, antibactérien.

Résumé en anglais

This PhD work is about designing surface coatings with polymers and natural compounds. In the first project, mechanosensitive surfaces have been developed for drug release applications. Polyelectrolyte multilayer films have been designed with *i*) one reservoir strata for the loading of a bioactive molecule, paclitaxel, and *ii*) one mechanosensitive barrier strata on top of the reservoir to confine the molecule. When a mechanical stretch is applied on the structure, the barrier becomes permeable and enables the diffusion of an enzyme within the film. This enzyme degrades the reservoir strata and triggers the release of paclitaxel. In a second project, ECM-mimicking feeder substrate has been developed with crosslinked gelatin thin films. These films can be loaded with: *i*) growth factors to prevent any further addition of these compounds in the culture medium; *ii*) nanoparticles to modulate mechanical properties of the substrate; *iii*) antimicrobial agents to ensure sterility during cell culture experiments. Finally, these substrates have some biochemical and biophysical tunable properties that enable the precise control of cell microenvironment.

Keys words: polyelectrolytes multilayers films, mechanosensitive surface, controlled delivery, enzymatic degradation, cell culture substrate, extracellular matrix, mechanosensing, antibacterial.