



**HAL**  
open science

# Céramiques phosphocalciques fonctionnalisées : étude des propriétés de surface par méthodes spectroscopiques

Nadia El Felss

► **To cite this version:**

Nadia El Felss. Céramiques phosphocalciques fonctionnalisées : étude des propriétés de surface par méthodes spectroscopiques. Matériaux. Université de Limoges, 2018. Français. NNT : 2018LIMO0109 . tel-02101232

**HAL Id: tel-02101232**

**<https://theses.hal.science/tel-02101232v1>**

Submitted on 16 Apr 2019

**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.

**Université de Limoges**

**ED 609 - Sciences et Ingénierie des Matériaux, Mécanique,  
Énergétique (SIMME)**

**Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER)-UMR CNRS 7315**

Thèse pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**  
Matériaux céramiques et traitements de surface

Présentée et soutenue par  
**Nadia EL FELSS**

le **14 décembre 2018**

**Céramiques phosphocalciques fonctionnalisées :  
étude des propriétés de surface par méthodes  
spectroscopiques**

Thèse dirigée par **Éric CHAMPION, Chantal DAMIA et Maggy COLAS**

Jury :

Rapporteurs

M. Patrice BOURSON, Professeur, LMOPS, Université de Lorraine/SUPELEC  
Mme. Stéphanie SARDA, Maître de conférences, HDR, CIRIMAT, Université Paul Sabatier

Examineurs

M. Jean-François BARDEAU, Directeur de Recherche CNRS, IMMM, Le Mans Université  
M. Olivier GALLET, Professeur, ERRMECe, Université de Cergy-Pontoise  
Mme. Amandine MAGNAUDEIX, Maître de conférences, IRCER, Université de Limoges  
M. Éric CHAMPION, Professeur, IRCER, Université de Limoges  
Mme. Maggy COLAS, Chargée de Recherche CNRS, HDR, IRCER, Université de Limoges  
Mme. Chantal DAMIA, Maître de conférences, HDR, IRCER, Université de Limoges





## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>





*A ma mère ...*





## Remerciements

---

Ce travail de recherche a été réalisé au Laboratoire Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER) de l'Université de Limoges (UMR CNRS 7315) à l'interface de deux axes de recherches dont les activités reposent sur les céramiques sous contraintes environnementales pour l'axe 4 et sur l'organisation structurale multiéchelle des matériaux pour l'axe 3.

Je tiens à remercier Messieurs Thierry Chartier et Philippe Thomas, directeurs successifs du Laboratoire et Madame Sylvie Foucaud, responsable de l'axe 4, pour m'avoir accueillie au sein de ce Laboratoire. Je remercie également la région Nouvelle-Aquitaine ainsi que le Labex Sigma-Lim pour le finacement de ces travaux de thèse.

Merci aux différents membres du jury : Madame Stéphanie Sarda, Monsieur Patrice Bourson, Monsieur Jean-François Bardeau et Monsieur Olivier Gallet d'avoir accepté de juger ce mémoire de thèse et pour leurs remarques pertinentes pour la finalisation de ce mémoire.

Je tiens à remercier chaleureusement mes encadrants de thèse, Monsieur Eric Champion, Madame Maggy Colas et Madame Chantal Damia pour leur disponibilité, leurs conseils scientifiques avisés, leur patience et leur compréhension. Merci sincèrement pour votre aide et votre soutien.

Un immense Merci à Mme Amandine Magnaudeix de m'avoir appris quelques bases fondamentales de la biologie, d'avoir toujours répondu présente lorsque j'avais besoin d'aide, pour ses conseils très judicieux et pour son soutien.

Je remercie mes collègues de l'équipe Biocérmiques, Isabelle Julien, Patricia Pascaud, Karine Giry, Betty Laverdet pour leurs conseils et leur gentillesse. Merci également à mes collègues de bureau, Tiphaine, Nathalie et Mariana pour leur bonne humeur et votre soutien. Enfin, je ne saurais remercier Emeline Renaudie pour sa disponibilité, son aide précieuse, sa patience et sa bonne humeur permanente au sein de l'équipe Biocéramiques. Un grand Merci pour ton soutien apporté tout au long de ces trois années de thèse.

J'aimerais ensuite adresser mes remerciements à mes collègues de l'IRCER qui ont contribué de près à ces travaux de recherche, Julie Cornette pour le Raman, Valérie Coudert et David Siniscalco pour l'AFM et Etienne Laborde pour l'XPS. Merci pour vos nombreux conseils. Merci généralement à l'ensemble de mes collègues du Laboratoire : Marion pour les traitements thermiques, Marina pour les caractérisations des poudres, Richard pour la DRX, l'équipe



microscopie Pierre, Yann, Patrice et Héloïse. Un grand Merci également à toutes les personnes qui ont participé à rendre cette expérience agréable et enrichissante : Fabien, Virginie, JR, Jenny, Sébastien, ... Je tiens à remercier mes amis proches Alex, Morgane et Jonathan pour votre soutien, vos encouragements et tous ces bons moments passés ensemble durant ces trois années de thèse qui n'auraient pas été les mêmes sans votre belle amitié.

Enfin, je remercie toute ma famille pour son soutien durant ces trois années de thèse et plus particulièrement mes deux sœurs et mon beau-frère pour leur patience et leurs encouragements. Je tiens en terminant, rendre hommage à ma défunte mère pour m'avoir soutenue tout au long de mes études en dépit de sa maladie. Cette thèse est aussi la tienne et je te la dédie.



## Table des matières

Introduction générale .....	1
Chapitre I. Etude bibliographique .....	5
I.1. Tissus osseux et vascularisation .....	5
I.1.1. Tissu osseux.....	5
I.1.2. Remodelage osseux et cellules osseuses .....	6
I.1.3. Angiogenèse.....	9
I.1.3.1. Angiogenèse par intussusception.....	10
I.1.3.2. Angiogenèse par bourgeonnement .....	11
I.2. Substituts osseux en apatite phosphocalcique .....	12
I.2.1. Hydroxyapatite phosphocalcique .....	13
I.2.2. Hydroxyapatite silicatée.....	14
I.2.3. Hydroxyapatite carbonatée .....	15
I.2.4. Ostéointégration des substituts osseux phosphocalciques.....	17
I.2.4.1. Interaction substitut osseux - protéines.....	18
I.2.4.2. Interaction substitut osseux - cellules et effets sur l'activité cellulaire.....	20
I.2.4.3. Adhésion cellulaire .....	22
I.3. De l'ostéoconduction à l'ostéoinduction .....	24
I.3.1. Qu'est-ce qu'une protéine ? .....	25
I.3.1.1. Aspects généraux.....	25
I.3.1.2. Fibronectine .....	28
I.3.1.3. Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) .....	30
I.3.2. Fonctionnalisation de surface de substituts osseux phosphocalciques .....	32
I.3.2.1. Adsorption.....	32
I.3.2.2. Immobilisation covalente .....	37
I.3.2.2.1. Phase inorganique.....	38
I.3.2.2.2. Phase organique .....	38
I.4. Mise en évidence des interactions protéines-substrats et suivi de fonctionnalisation .....	43
I.4.1. Interactions physiques protéines-substrats .....	44
I.4.1.1. Principe général de l'AFM .....	44
I.4.1.2. Spectroscopie de force.....	45
I.4.1.3. Apport de la spectroscopie de force à l'étude des matériaux biologiques .....	47
I.4.2. Suivi de fonctionnalisation de matériaux hybrides inorganiques/organiques.....	50
I.4.2.1. Imagerie en fluorescence .....	50
I.4.2.2. Imagerie Infrarouge .....	53
I.4.2.3. Imagerie Raman .....	54
I.4.2.3.1. Principe de l'effet Raman .....	55
I.4.2.3.2. Signature en diffusion Raman des protéines, des phosphates de calcium et du tissu osseux .....	55
I.4.2.3.3. Imagerie Raman .....	60
I.5. Conclusion.....	63
Chapitre II. Elaboration, caractérisation et fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques.....	65
II.1. Elaboration des céramiques phosphocalciques .....	65
II.1.1. Synthèse des poudres.....	65
II.1.2. Mise en forme des céramiques .....	67
II.2. Caractérisation des poudres et des céramiques.....	68
II.2.1. Caractérisation des poudres .....	68
II.2.1.1. Test à la phénolphtaléine .....	68
II.2.1.2. Analyse par diffraction des rayons X.....	68
II.2.1.3. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier .....	69
II.2.1.4. Analyses chimiques élémentaires .....	72



II.2.1.5. Mesure de surface spécifique.....	73
II.2.1.6. Mesure du potentiel zêta .....	73
II.2.2. Caractérisation des céramiques.....	73
II.2.2.1. Mesure de densité .....	74
II.2.2.2. Imagerie par microscopie électronique à balayage.....	74
II.2.2.3. Mesure de surface spécifique.....	75
II.2.2.4. Analyse par diffraction des rayons X.....	75
II.2.2.5. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier .....	76
II.2.2.6. Analyse par spectroscopie Raman.....	77
II.2.2.7. Analyse carbone .....	78
II.2.2.8. Spectroscopie de photoélectrons X.....	79
II.2.2.9. Imagerie par microscopie à force atomique .....	82
II.2.2.10. Détermination de l'énergie de surface.....	83
II.2.3. Conclusion.....	87
II.3. Fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire .....	88
II.3.1. Présentation générale du protocole expérimental.....	88
II.3.2. 1 <sup>ère</sup> étape : silanisation .....	89
II.3.3. 2 <sup>ème</sup> étape : addition du SM(PEG) <sub>6</sub> .....	90
II.3.4. 3 <sup>ème</sup> étape : addition du VEGF .....	90
Chapitre III. Apport à la compréhension de la fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques .	93
III.1. Compréhension des interactions physiques protéine d'adhésion-céramique.....	93
III.1.1. Fonctionnalisation des pointes AFM par la fibronectine.....	94
III.1.1.1. Protocole expérimental.....	94
III.1.1.2. Caractérisation des pointes fonctionnalisées.....	96
III.1.2. Mise en place du montage expérimental et définition des conditions d'acquisition .....	97
III.1.2.1. Cellule de mesure thermostatée en milieu liquide.....	98
III.1.2.2. Pourquoi des images AFM force-volume .....	99
III.1.2.3. Choix des paramètres d'acquisition .....	101
III.1.3. Acquisition des images AFM force-volume et traitement.....	102
III.1.3.1. Acquisition des images AFM force-volume .....	102
III.1.3.2. Traitement des images AFM force-volume .....	104
III.1.3.3. Contrôle des données .....	109
III.1.4. Résultats.....	110
III.1.4.1. Hydroxyapatite.....	110
III.1.4.1.1. Image AFM force-volume sur céramique non polie en HA .....	110
III.1.4.1.2. Image AFM force-volume sur céramique polie en HA .....	113
III.1.4.2. Hydroxyapatite silicatée.....	115
III.1.4.2.1. Image AFM force-volume sur céramique non polie en SiHA .....	115
III.1.4.2.2. Image AFM force-volume sur céramique polie en SiHA .....	118
III.1.4.3. Hydroxyapatite carbonatée.....	119
III.1.4.3.1. Image AFM force-volume sur céramique non polie en CHA.....	120
III.1.4.3.2. Image AFM force-volume sur céramique polie en CHA.....	122
III.1.5. Discussion .....	124
III.1.6. Conclusion.....	128
III.2. Suivi de l'évolution de la fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques .....	129
III.2.1. Caractérisation de la chimie de surface par imagerie Raman .....	129
III.2.1.1. Spectres ponctuels .....	130
III.2.1.1.1. Hydroxyapatite.....	130
III.2.1.1.2. Hydroxyapatite carbonatée.....	134
III.2.1.2. Imagerie Raman .....	137
III.2.1.2.1. Conditions d'acquisition et traitement des données .....	137



III.2.1.2.1.1. Repérage sur les céramiques .....	137
III.2.1.2.1.2. Conditions d'acquisition des images Raman.....	139
III.2.1.2.2. Suivi des étapes de fonctionnalisation par imagerie Raman .....	142
III.2.1.2.2.1. Apport de l'imagerie Raman à l'amélioration du protocole de fonctionnalisation .....	142
III.2.1.2.2.2. Images Raman des céramiques en hydroxyapatite .....	146
III.2.1.2.2.3. Images Raman des céramiques en hydroxyapatite carbonatée .....	149
III.2.1.2.2.4. Discussion .....	151
III.2.2. Caractérisation des céramiques fonctionnalisées par spectroscopie de photoélectrons X .....	154
III.2.3. Caractérisation des céramiques fonctionnalisées par microscopie à force atomique .....	162
III.2.4. Discussion .....	166
III.2.5. Conclusion.....	171
Conclusion générale .....	173
Annexes.....	197





## Table des illustrations

Figure 1 : Schéma présentant la composition d'un os humain [9].	6
Figure 2 : Schéma illustrant les différentes étapes du processus de remodelage osseux.	8
Figure 3 : Expression des marqueurs de la différenciation ostéoblastique [21].	9
Figure 4 : Schéma illustrant la formation d'un réseau vasculaire par vasculogenèse et angiogenèse [26].	10
Figure 5 : Schéma illustrant l'angiogenèse par intussusception [28].	11
Figure 6 : Schéma illustrant l'angiogenèse par bourgeonnement.	11
Figure 7 : Illustration des différents types cellulaires formant un capillaire de cellules endothéliales [28].	12
Figure 8 : Structure cristalline de l'hydroxyapatite.	13
Figure 9 : Schéma illustrant les principales étapes du processus d'ostéointégration d'un phosphate de calcium [85].	18
Figure 10 : Représentation schématique de l'adhésion cellulaire d'ostéoblastes aux protéines de la MEC adsorbées à la surface d'un matériau [99].	21
Figure 11 : Schéma représentant les intégrines et les protéines impliquées dans l'adhésion.	23
Figure 12 : Formule générale d'un acide aminé.	26
Figure 13 : Schéma représentant les structures secondaire et tertiaire d'une protéine.	27
Figure 14 : Schéma illustrant la structure spatiale d'une chaîne polypeptidique (protéine) et mettant en avant la libre rotation (angles $\Psi$ et $\phi$ ) autour de l'atome de carbone portant la chaîne latérale.	27
Figure 15 : Filaments de kératine présentant la répétition de la séquence : a, b, c, d, e, f, g. ( <a href="https://slideplayer.fr/slide/3699751/Août%202018">https://slideplayer.fr/slide/3699751/Août 2018</a> )	28
Figure 16 : Exemple de protéine globulaire, le lysozyme.	28
Figure 17 : Représentation schématique du dimère de fibronectine, mettant en avant les ponts disulfures reliant les deux monomères [134].	30
Figure 18 : Représentation des différents modules de la fibronectine [134].	30
Figure 19 : Schéma représentant la structure tridimensionnelle du dimère du VEGF. Le monomère 1 est représenté en bleu et le monomère 2 en rouge, une des deux régions en nœud à cystéine est encerclée en jaune [138].	32
Figure 20 : De gauche à droite : adsorption de la BSA sur une surface HA native, adsorption de la BSA sur une surface HA pré-adsorbée par de l'arginine (Arg), adsorption de la lysozyme sur une surface HA pré-adsorbée par de l'acide aspartique (Asp) [142].	34
Figure 21 : Image AFM de fibronectine adsorbée sur (a) une surface hydrophile et sur (b) une surface hydrophobe. Chaque image représente un champ de 750x750 nm [131].	35
Figure 22 : Principe général de l'immobilisation covalente d'une biomolécule d'intérêt à la surface d'une céramique.	37
Figure 23 : Exemples d'organosilanes couramment utilisés pour la modification de surface [157].	39
Figure 24 : Silanisation d'un substrat solide présentant des fonctions OH disponibles en surface [157].	40



Figure 25 : Fonctionnalisation de surface utilisant le glutaraldéhyde comme molécule bi-fonctionnelle [157].	41
Figure 26 : Approche de fonctionnalisation EDC/NHS [157].	42
Figure 27 : Fonctionnalisation d'une surface en hydroxyapatite par un peptide RGD, 1) silanisation de surface, 2) ajout d'un SMP (N-succinimidyl-3-maléimidopropinate) et 3) immobilisation du peptide par réaction Maléimide-SH [166].	43
Figure 28 : Réaction de thiolation d'amine primaire utilisant le réactif de Traut (fiche Thermo Fisher Scientific).	43
Figure 29 : A) Schéma du principe général d'un microscope à force atomique, B) images MEB d'un <i>cantilever</i> et C) d'une pointe AFM.	44
Figure 30 : Modes de fonctionnement d'un AFM.	45
Figure 31 : Exemple d'une courbe force-distance [99].	46
Figure 32 : Exemple d'une courbe de force (approche et retrait) entre une pointe fonctionnalisée par la fibronectine et un polymère polypyrrole (PPy) illustrant le phénomène de dépliage de la fibronectine [195].	47
Figure 33 : Images AFM force-volume obtenues sur des films de polypyrrole (PPy) dopés avec A) le sulfate de chondroïtine (CS) et B) l'acide hyaluronique (HA). Les images AFM force-volume ont été effectuées en milieu PBS ( <i>Phosphate-buffered saline</i> ) sur des zones 500 x 500 nm <sup>2</sup> avec une résolution de 32 x 32 courbes de forces, l'échelle en couleur est en nN [195].	48
Figure 34 : Image AFM force-volume d'une couche de collagène adsorbée à la surface de polystyrène dans l'eau sur des zones de 2 x 2 μm <sup>2</sup> avec une résolution de 32 x 32 courbes de forces, une échelle de hauteur en gris indique une force maximale de 1,5 nN [197].	49
Figure 35 : Diagramme de Perrin-Jablonski représentant le phénomène de fluorescence. (Wikipédia/26-10-2018)	51
Figure 36 : Image en fluorescence des cellules MC3T3-E <sub>1</sub> en fausse couleur.	52
Figure 37 : Réorganisation cellulaire sur la fibronectine adsorbée [204].	52
Figure 38 : Exemple d'image spectrale IR d'une coupe tissulaire paraffinée avec (A) une image optique avec la zone d'acquisition entourée en rouge, (B) une image IR avec l'échelle de couleur qui correspond à l'absorbance moyenne de la zone analysée (résolution spatiale de 6,25 μm/pixel, gamme spectrale : 750-4000 cm <sup>-1</sup> , résolution spectrale de 4 cm <sup>-1</sup> et 16 accumulations par spectre) et (C) spectre correspondant au point d'acquisition matérialisé par la (croix rouge). En encart, la région spectrale des bandes amide I et amide II [207].	54
Figure 39 : Diagramme des niveaux d'énergie impliqués en spectroscopie Raman (diffusions, Rayleigh, Stokes et anti-Stokes) [208].	55
Figure 40 : Spectres Raman du tréhalose (T) et du sucrose (S) [209].	56
Figure 41 : Représentation de la fonction amide correspondant à la liaison peptidique des protéines.	57
Figure 42 : Spectre Raman dans l'intervalle 400-4000 cm <sup>-1</sup> des céramiques en (A) HA et frittée à 1200 °C durant 30 min sous air et en (B) CHA (Ca <sub>9,5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>5,5</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>0,5</sub> (OH) <sub>1,0</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>0,25</sub> ) et frittée à 960 °C durant 2 h sous CO <sub>2</sub> .	59
Figure 43 : Modes de vibration des groupements phosphate (PO <sub>4</sub> ).	59
Figure 44 : Spectre Raman d'un tissu osseux [218].	60
Figure 45 : Image d'un cartilage articulaire par Raman conventionnel. Les spectres ont été collectés avec un pas de 1 μm et un temps d'acquisition de 10 s par spectre dans le domaine 600-1800 cm <sup>-1</sup> . Les images sont reconstruites sur la somme des intensités caractéristiques de chaque constituant	



biochimique situées à 1578, 1488 et 782 $\text{cm}^{-1}$ pour l'ADN, 1380, 1342 et 1068 $\text{cm}^{-1}$ pour le sulfate de chondroïtine, 1271, 1246, 920, 857 et 816 $\text{cm}^{-1}$ pour le collagène et 1555, 1127 et 1004 $\text{cm}^{-1}$ pour les protéines non collagènes. La couleur bleu traduit une faible réponse Raman et le rouge une forte réponse Raman [224].	61
Figure 46 : Prothèse de crâne en céramique [229].	63
Figure 47 : Photographie du montage de synthèse par précipitation en voie aqueuse.	65
Figure 48 : Diffractogrammes des poudres A) d'HA, B) de SiHA calcinées à 1000 °C-15 h et C) de CHA calcinée à 400 °C-2 h.	69
Figure 49 : Spectres FTIR dans l'intervalle 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ des poudres A) d'HA et B) de SiHA calcinées à 1000 °C-15 h et C) de CHA calcinée à 400 °C-2 h sous air.	72
Figure 50 : Clichés MEB de la surface non polie des céramiques (A) en HA, (B) en SiHA frittées à 1200 °C-30 min sous air et (C) en CHA frittée à 960 °C-2 h sous $\text{CO}_2$ .	75
Figure 51 : Diffractogrammes de la surface des céramiques A) en HA et B) en SiHA frittées à 1200 °C-30 min sous air et C) en CHA frittée à 960 °C-2 h sous $\text{CO}_2$ .	76
Figure 52 : Spectres FTIR dans l'intervalle 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ des poudres grattées à la surface des céramiques A) en HA et B) en SiHA frittées à 1200 °C-30 min sous air et C) en CHA frittée à 960 °C- 2 h sous $\text{CO}_2$ .	77
Figure 53 : Principe de l'imagerie Raman [235].	78
Figure 54 : Spectres XPS larges des surfaces des céramiques A) en HA, B) en SiHA et C) en CHA.	80
Figure 55 : Décomposition des pics XPS Ca 2p, P 2p, O 1s, C 1s et Si 2p	81
Figure 56 : Image AFM en mode contact de la surface des céramiques non polies (A) en HA, (B) en SiHA et (C) en CHA.	83
Figure 57 : Images AFM en mode contact de la surface des céramiques polies (A) en HA, (B) en SiHA et (C) en CHA.	83
Figure 58 : Forces appliquées entre une goutte de liquide et une surface solide.	84
Figure 59 : Représentation graphique de la relation d'Owens-Wendt pour les céramiques en HA, en SiHA et en CHA.	86
Figure 60 : Schéma réactionnel général de la fonctionnalisation de surface de céramique SiHA	89
Figure 61 : Schéma réactionnel général de la fonctionnalisation de surface des céramiques en HA et en CHA par le VEGF.	89
Figure 62 : Montage expérimental pour la réaction de silanisation	90
Figure 63 : Protocole de fonctionnalisation d'une pointe AFM par de la fibronectine. Le protocole a été modifié à partir de celui proposé par Rixman <i>et al.</i> [176].	95
Figure 64 : Cantilevers et pointes AFM non fonctionnalisés par la fibronectine et après mise en contact avec la solution d'alexa fluor avec (A) image par microscopie en fluorescence et (B) image par microscopie électronique à balayage. Cantilevers et pointes AFM après fonctionnalisation par la fibronectine et marquage par l'Alexa Fluor avec (C) image par microscopie en fluorescence et (D) image par microscopie électronique à balayage.	97
Figure 65 : Schéma illustrant la formation d'un ménisque d'eau entre une pointe AFM et la surface d'un substrat lors de mesure à l'air ambiant.	98
Figure 66 : A) Schéma de la cellule de mesure en coupe et B) photo de la platine à effet Peltier avec la cellule vide clipsée dessus.	98
Figure 67 : Photographie montrant le niveau d'immersion du scanner dans la cellule de mesure.	99



Figure 68 : Illustration de la dérive du Closed-loop sur une céramique dense en HA avec A) une image AFM de surface réalisée avant indentation et B) une image AFM de la même zone d'acquisition des courbes de forces. Les images ont été faites en mode contact sur une zone de 5,5 x 5,5 $\mu\text{m}^2$ .....	100
Figure 69 : Mesures de forces réalisées sur un grain d'une céramique dense en HA (point a de la Figure 68-A) avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine dans de l'eau à 37 °C avec la fonction Closed-loop activée. ....	100
Figure 70 : Organigramme des différentes étapes d'acquisition des données AFM force-volume.....	103
Figure 71 : Exemple d'une courbe de force réalisée sur mica. Les deux curseurs sont placés afin de déterminer le coefficient directeur de la tangente de la courbe lequel correspond au coefficient de sensibilité $\alpha$ . ....	104
Figure 72 : Organigramme des étapes différentes de traitement des données AFM force-volume conduisant à l'établissement d'une image force-volume.....	104
Figure 73 : Exemple d'une courbe de force (A) avant et (B) après normalisation. ....	105
Figure 74 : Exemple d'analyse d'une courbe de force. Les curseurs $R_1$ et $R_2$ sont placés afin de déterminer la force d'adhésion. ....	106
Figure 75 : Exemple d'un histogramme en fréquences des forces d'adhésion obtenu à partir d'un jeu de 16384 courbes. Echelle : abscisse = force en nN, ordonnée = fréquence en %. ....	106
Figure 76 : Exemple d'une image AFM force-volume 2D obtenue à partir d'un jeu de 16384 courbes de force avec la fonction <i>Parameter map</i> . Echelle : x, y = taille de l'image 2D en $\mu\text{m}$ , z = forces en nN. ....	106
Figure 77 : Exemple d'une courbe de force non normalisée mettant en évidence deux informations : la force d'adhésion avec la mesure de la déflexion et la topographie récupérée avec le <i>plug-in</i> point de contact. ....	107
Figure 78 : Exemple du traitement d'une image AFM de la « topographie récupérée » avec A) avant redressement ligne à ligne et B) après redressement ligne à ligne. ....	108
Figure 79 : Exemple d'une surface multicouche 2D générée par la superposition (A) de l'image AFM force-volume et (B) de l'image AFM de la « topographie récupérée ».....	108
Figure 80 : Exemple d'une vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée ». ....	108
Figure 81 : Images AFM force-volume réalisées avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine sur (A) une céramique dense en HA et (C) un substrat en mica et (B) image AFM force-volume réalisée avec une pointe non fonctionnalisée sur une céramique dense en HA. Les mesures ont été effectués à l'air et traitement des données avec le logiciel PicoImage. ....	110
Figure 82 : Image AFM force-volume d'une céramique dense non polie en hydroxyapatite (HA) obtenue avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine (Fn), les mesures ont été réalisées en milieu aqueux (eau) et à 37°C avec A) histogramme en fréquence des forces mesurées modélisé par des gaussiennes, B) image AFM force-volume, C) image AFM de la « topographie récupérée » et D) vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée ». ....	112
Figure 83 : Topographie d'une céramique dense et non polie en HA avec A) image AFM de la « topographie récupérée », B) image AFM de surface réalisée à l'air et en mode contact et C) cliché MEB. ....	113
Figure 84 : Profils de rugosité extraits des images AFM A) de la « topographie récupérée » et B) de la surface de la céramique dense et non polie en hydroxyapatite. ....	113



Figure 85 : Image AFM force-volume d'une céramique dense polie en hydroxyapatite (HA) obtenue avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine (Fn), les mesures ont été réalisées en milieu aqueux (eau) et à 37°C avec A) histogramme en fréquence des forces mesurées, B) image AFM force-volume, C) image AFM de la « topographie récupérée » et D) vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée ».....	114
Figure 86 : Profils de rugosité extraits des images AFM A) de la « topographie récupérée » et B) de la surface de la céramique dense polie en hydroxyapatite. ....	115
Figure 87 : Image AFM force-volume d'une céramique dense non polie en hydroxyapatite silicatée (SiHA) obtenue avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine (Fn), les mesures ont été réalisées en milieu aqueux (eau) et à 37°C avec A) histogramme en fréquence des forces mesurées modélisé par des gaussiennes, B) image AFM force-volume, C) image AFM de la « topographie récupérée » et D) vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée ».....	117
Figure 88 : Topographie d'une céramique dense et non polie en SiHA avec A) image AFM de la « topographie récupérée », B) image AFM de surface réalisée à l'air et en mode contact et C) cliché MEB. ....	117
Figure 89 : Profils de rugosité extraits des images AFM A) de la « topographie récupérée » et B) de la surface de la céramique dense non polie en hydroxyapatite silicatée. ....	118
Figure 90 : Image AFM force-volume d'une céramique dense polie en hydroxyapatite silicatée (SiHA) obtenue avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine (Fn), les mesures ont été réalisées en milieu aqueux (eau) et à 37°C avec A) histogramme en fréquence des forces mesurées, B) image AFM force-volume, C) image AFM de la « topographie récupérée » et D) vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée ».	119
Figure 91 : Profils de rugosité extraits des images AFM A) de la « topographie récupérée » et B) de la surface de la céramique dense polie en hydroxyapatite silicatée. ....	119
Figure 92 : Image AFM force-volume d'une céramique dense non polie en hydroxyapatite carbonatée (CHA) obtenue avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine (Fn), les mesures ont été réalisées en milieu aqueux (eau) et à 37°C avec A) histogramme en fréquence des forces mesurées modélisé par des gaussiennes, B) image AFM force-volume, C) image AFM de la « topographie récupérée » et D) vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée ».....	121
Figure 93 : Topographie d'une céramique dense et non polie en CHA avec A) image AFM de la « topographie récupérée », B) image AFM de surface réalisée à l'air et en mode contact et C) cliché MEB. ....	121
Figure 94 : Profils de rugosité extraits des images AFM A) de la « topographie récupérée » et B) de la surface de la céramique dense non polie en hydroxyapatite carbonatée. ....	122
Figure 95 : Image AFM force-volume d'une céramique dense polie en hydroxyapatite carbonatée (CHA) obtenue avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine (Fn), les mesures ont été réalisées en milieu aqueux (eau) et à 37°C avec A) histogramme en fréquence des forces mesurées, B) image AFM force-volume, C) image AFM de la « topographie récupérée » et D) vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée ».....	123
Figure 96 : Profils de rugosité extraits des images AFM A) de la « topographie récupérée » et B) de la surface de la céramique dense polie en hydroxyapatite carbonatée. ....	123
Figure 97 : Histogrammes en fréquence des forces d'adhésion mesurées sur les céramiques denses polies et non polies en HA, SiHA et CHA.....	127



Figure 98 : Schéma illustrant une interaction entre une pointe AFM fonctionnalisée par la fibronectine et une vallée (joint de grain) sur un profil de rugosité. ....	128
Figure 99 : Représentation schématique de l'immobilisation du facteur de croissance VEGF sur des céramiques denses et polies en HA ou en CHA. ....	129
Figure 100 : Schéma réactionnel général de la fonctionnalisation de la surface d'une céramique dense en HA par le VEGF, 1) silanisation, 2) addition du SM(PEG) <sub>6</sub> et 3) addition du VEGF. ....	130
Figure 101 : Spectres ponctuels Raman des céramiques A) HA, B) HA-T, C) HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> et D) HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> -VEGF dans l'intervalle 200-4000 cm <sup>-1</sup> (532 nm, objectif x100, durée d'acquisition de 10 s).....	131
Figure 102 : Spectre ponctuel Raman de la céramique HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> -VEGF dans l'intervalle 100-3000 cm <sup>-1</sup> (532 nm, objectif x100, durée d'acquisition de 10 s). ....	132
Figure 103 : Spectres ponctuels Raman : A) HA-T, B) HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> , C) HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> -VEGF en mode confocal dans l'intervalle 1400-3600 cm <sup>-1</sup> (532 nm, objectif x100, durée d'acquisition de 5 s). 133	
Figure 104 : Spectres ponctuels Raman des céramiques A) CHA, B) CHA-T, C) CHA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> et D) CHA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> -VEGF dans l'intervalle 200-4000 cm <sup>-1</sup> (532 nm, objectif x100, durée d'acquisition de 10 s).....	134
Figure 105 : Spectre ponctuel Raman CHA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> -VEGF dans l'intervalle 100-3000 cm <sup>-1</sup> (532 nm, objectif x100, durée d'acquisition de 10 s). ....	135
Figure 106 : Spectres ponctuels Raman des céramiques A) CHA-T, B) CHA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> et C) CHA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> -VEGF dans l'intervalle 1400-3600 cm <sup>-1</sup> (532 nm, objectif x100, durée d'acquisition de 5 s).....	136
Figure 107 : Images Raman de deux céramiques denses et polies en HA (A, B) et en CHA (C, D), 138	
Figure 108 : Schéma illustrant le repérage d'une zone d'intérêt pour le suivi de fonctionnalisation par imagerie Raman. ....	139
Figure 109 : Image Raman de l'étape de silanisation (HA-T) reconstruite sur l'intensité intégrée de la bande ν(C-H) et accompagnée de spectres ponctuels extraits illustrant respectivement les zones de couleurs bleue, verte et rouge. ....	140
Figure 110 : Images Raman de l'étape de silanisation (HA-T) avec A) image Raman « large » et B) image HR, reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande ν(C-H). Les spectres ponctuels sont extraits de l'image HR et correspondent respectivement aux zones de couleurs bleue, verte et jaune. ....	142
Figure 111 : Schéma réactionnel général de la fonctionnalisation de surface d'une céramique en SiHA par la BMP-2, 1) silanisation, 2) addition du SM(PEG) <sub>6</sub> , et 3) addition de la BMP-2.....	143
Figure 112 : Images Raman de deux céramiques en HA fonctionnalisées à l'APTES (A, C) puis fonctionnalisées par le SM(PEG) <sub>6</sub> pour un temps de synthèse de 24 h (B) et 2 h (D), les images Raman sont reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande ν(C-H).....	144
Figure 113 : Images Raman (A) d'une céramique fonctionnalisée avec de l'APTES puis du SM(PEG) <sub>6</sub> HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> (2h), puis (B) immergée 2h dans du PBS 10X, l'échantillon est noté HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> (2h)-PBS10X(2h). Les images Raman A et B sont reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande ν(C-H) et accompagnées de leurs spectres extraits A et B. ....	145
Figure 114 : Images Raman de la surface de trois céramiques en HA différents fonctionnalisées par l'APTES. La silanisation a été effectuée sur A) une pastille, B) trois pastilles et C) une pastille (réactifs neufs). Les images Raman sont reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande ν(C-H). ....	148



Figure 115 : Images Raman des trois étapes de fonctionnalisation de la surface de la céramique en HA par le VEGF avec A) HA-T, B) HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> et C) HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> -VEGF. Les images Raman sont reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande $\nu(\text{C-H})$ . .....	149
Figure 116 : Images Raman de la surface des céramiques en HA et en CHA fonctionnalisées par l'APTES avec A) HA-T et B) CHA-T. Les images sont reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande $\nu(\text{C-H})$ . .....	150
Figure 117 : Images Raman des trois étapes de fonctionnalisation de la surface de la céramique en CHA par le VEGF avec A) CHA-T, B) CHA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> et C) CHA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> -VEGF. Les images sont reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande $\nu(\text{C-H})$ . .....	151
Figure 118 : Histogramme représentant l'évolution de l'intensité intégrée maximale de la bande $\nu(\text{CH})$ à la surface des céramiques en HA et en CHA en fonction des différentes étapes de fonctionnalisation. ....	152
Figure 119 : Histogramme représentant l'évolution de l'intensité intégrée maximale de la bande $\nu(\text{CH})$ extraite de l'image HR de la surface de la céramique en HA en fonction des différentes étapes de fonctionnalisation. ....	153
Figure 120 : Spectres XPS larges des céramiques fonctionnalisées A) HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> -VEGF et B) CHA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> -VEGF. ....	155
Figure 121 : Décomposition du pic XPS O 1s obtenu à la surface des céramiques denses et polies en HA et en CHA et après chaque étape de fonctionnalisation par le VEGF. ....	159
Figure 122 : Décomposition du pic XPS C 1s obtenu à la surface des céramiques denses et polies en HA et en CHA et après chaque étape de fonctionnalisation par le VEGF. ....	159
Figure 123 : Décomposition du pic XPS Si 2p obtenu à la surface des céramiques denses et polies en HA et en CHA et après chaque étape de fonctionnalisation par le VEGF. ....	160
Figure 124 : Décomposition du pic XPS N 1s obtenu à la surface des céramiques denses et polies en HA et en CHA et après chaque étape de fonctionnalisation par le VEGF. ....	160
Figure 125 : Schéma illustrant la protonation de la fonction amine de l'APTES lors de son utilisation pour la silanisation de substrat en céramique (HA) [69] .....	162
Figure 126 : Images AFM de la surface de la céramique en HA (A) avant et après chaque étape de fonctionnalisation avec (B) HA-T, (C) HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> et (D) HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> -VEGF. ....	164
Figure 127 : Profils extraits des images AFM de surface de A) HA polie et D) HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> -VEGF. Les zones analysées correspondent à celles mentionnées en pointillés sur le figure 64. ....	164
Figure 128 : Images AFM de la surface de la céramique en CHA (A) avant et après chaque étape de fonctionnalisation avec (B) CHA-T, (C) CHA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> et (D) CHA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> -VEGF. ....	165
Figure 129 : Profils extraits des images AFM de surface de A) CHA polie, B) CHA-T, et D) CHA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> -VEGF. Les zones analysées correspondent à celles mentionnées en pointillés sur le figure 66. ....	165
Figure 130 : Schéma représentant les tailles des surfaces analysées en imagerie Raman (500 $\mu\text{m}$ x 500 $\mu\text{m}$ ), en XPS (300 $\mu\text{m}$ x 700 $\mu\text{m}$ ) et en AFM (10 $\mu\text{m}$ x 10 $\mu\text{m}$ ). ....	166
Figure 131 : Représentation schématique de l'immobilisation du facteur de croissance VEGF sur des céramiques phosphocalciques denses et polies avec un zoom sur l'interaction APTES/céramique. 170	
Figure 132 : Schéma illustrant la caractérisation des cellules endothéliales par spectroscopie de force à la surface de céramiques fonctionnalisées par le VEGF et caractérisées par imagerie Raman. ....	175
Figure 133 : Spectres XPS larges des céramiques fonctionnalisées A) HA-T et B) HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> . ....	201



Figure 134 : Spectres XPS larges des céramiques fonctionnalisées A) CHA-T et B) CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>.  
..... 202



## Table des tableaux

Tableau 1 : Attribution des bandes vibrationnelles des amides (liaisons peptidiques) en spectroscopie Raman [209]-[211].	57
Tableau 2 : Attribution des bandes vibrationnelles en spectroscopie Raman des principaux acides aminés aromatiques, de la cystéine (Cys) et de la histidine (His) [211], [212], [213].	58
Tableau 3 : Récapitulatif des quantités de réactifs utilisées pour les synthèses des poudres phosphocalciques.	66
Tableau 4 : Références de fiches PDF des phases utilisées pour l'indexation des diffractogrammes.	68
Tableau 5 : Modes de vibration infrarouge susceptibles d'être détectés dans les poudres d'HA, de SiHA et de CHA [44, 45, 57, 73, 216, 233, 234].	71
Tableau 6 : Caractéristiques des différents solvants utilisés pour la mesure d'angle de contact.	85
Tableau 7 : Angles de contact moyens obtenus à la surface des différentes céramiques.	86
Tableau 8 : Valeurs $\gamma$ et $\chi$ obtenues à partir des mesures d'angle de contact pour les céramiques en HA, en SiHA et en CHA.	86
Tableau 9 : Valeurs des interactions polaires et dispersives ainsi que les énergies de surface en mN/m des différentes céramiques en HA, en SiHA et en CHA.	87
Tableau 10 : Récapitulatif des caractéristiques des céramiques en HA, en SiHA et en CHA.	87
Tableau 11 : Paramètres choisis pour les acquisitions des données AFM force-volume.	102
Tableau 12 : Diamètre moyen des grains de l'hydroxyapatite (HA) calculé à partir de A) l'image AFM de la « topographie récupérée », B) l'image AFM de surface réalisée à l'air et en mode contact et C) du cliché MEB.	113
Tableau 13 : Diamètre moyen des grains de l'hydroxyapatite silicatée (SiHA) calculé à partir de A) l'image AFM de la « topographie récupérée », B) l'image AFM de surface réalisée à l'air et en mode contact et C) du cliché MEB.	117
Tableau 14 : Diamètre moyen des grains de l'hydroxyapatite carbonatée (CHA) calculé à partir de A) l'image AFM de la « topographie récupérée », B) l'image AFM de surface réalisée à l'air et en mode contact et C) du cliché MEB.	122
Tableau 15 : Propriétés physico-chimiques des céramiques phosphocalciques HA, SiHA et CHA établies au chapitre II. Les rugosités sont obtenues à partir des images AFM de surface réalisées à l'air, la taille moyenne des grains est calculée à partir des clichés MEB, les mesures d'angle de contact sont effectuées sur des céramiques polies et les potentiels zêta sur des poudres calcinées aux températures de frittage.	127
Tableau 16 : Pourcentages atomiques des différents éléments chimiques détectés à la surface des céramiques en HA et en CHA avant et après chaque étape de fonctionnalisation.	157
Tableau 17 : Énergies des liaisons (eV) des éléments chimiques (O, C, Si, N) détectés à la surface des céramiques en HA et en CHA après chaque étape de fonctionnalisation. Tous les spectres haute résolution sont repositionnés par rapport au calcium Ca 2p <sub>(3/2)</sub> (347 eV). La profondeur d'analyse XPS est d'environ 5 nm.	161
Tableau 18 : Noms et formules chimiques des 21 acides aminés rencontrés chez les eucaryotes.	199
Tableau 19 : Liste des acides aminés présents dans le VEGF.	200





# Introduction générale

---

Le tissu osseux est une structure vivante dynamique en perpétuel renouvellement grâce au phénomène de remodelage osseux. Il s'agit d'un processus continu qui consiste à la résorption (dégradation) de l'os ancien et la formation d'une nouvelle matrice osseuse qui a la particularité d'être minéralisée. L'équilibre entre la résorption et la synthèse de la matrice osseuse est principalement régulé par les cellules osseuses. Dans le cas de lésions où la perte osseuse est importante, ce processus naturel de régénération peut s'avérer insuffisant. L'apport de substituts osseux tolérés par l'organisme devient alors nécessaire afin de combler ou remplacer une perte osseuse. La composition chimique de ces substituts peut être similaire à celle du minéral osseux qui est assimilé à une apatite phosphocalcique poly-substituée et lacunaire de formule chimique simplifiée [1] :  $\text{Ca}_{8,3}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{CO}_3)_{1,0}(\text{HPO}_4)_{0,7}(\text{CO}_3,\text{OH})_{0,3}$ . Les céramiques à base de phosphate de calcium sont alors de bonnes candidates pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse.

Parmi les céramiques phosphocalciques, l'hydroxyapatite synthétique (HA) de formule chimique  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  est une céramique biocompatible et bioactive largement utilisée comme substitut osseux depuis plusieurs années. En effet, sa composition chimique proche de celle du minéral osseux lui permet de conduire une repousse osseuse en étant en contact direct avec l'os. Cependant, la bioactivité limitée des matériaux à base d'hydroxyapatite synthétique (HA) les rend faiblement résorbables pour une ostéointégration rapide de l'implant. La substitution partielle de groupements ioniques de l'hydroxyapatite par des groupements silicates ou des groupements carbonates a alors fait l'objet de plusieurs études au cours de ces dernières années. L'incorporation du silicium par exemple dans la structure apatite ( $\text{Si}_x\text{HA}$ ,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ ) semble améliorer sa bioactivité [2] et joue un rôle important dans la formation osseuse et la calcification [3]. L'ajout des ions carbonates dans la structure de l'hydroxyapatite ( $\text{C}_{\text{AB}}\text{HA}$ ,  $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x-2y}(\text{CO}_3)_y$ ) permet d'obtenir une hydroxyapatite carbonatée de formule chimique très proche de celle de l'os qui contient entre 3 et 8 % d'ions carbonates. Cette substitution semble quant à elle améliorer la résorbabilité du matériau [4]. Les biocéramiques poreuses en HA, en SiHA et en CHA sont ostéoconductrices et favorisent donc la repousse osseuse lorsqu'elles sont en contact direct avec l'os, permettant ainsi la pénétration de l'os néoformé au cœur de la structure poreuse de l'implant. Cependant, cette propriété d'ostéoconduction est limitée à des substituts osseux de petite taille (environ  $1 \text{ cm}^3$ ). Elle demeure donc insuffisante lorsqu'il s'agit de régénérer de larges pertes de substances osseuses de grande taille, dans lesquelles le contact direct avec l'os ne se fait qu'en périphérie de la zone à reconstruire. En effet, les biocéramiques ne sont pas ostéoinductrices, c'est-à-dire, qu'elles ne sont pas capables d'induire la formation de tissus

osseux sans être en contact direct avec l'os. L'enjeu actuel en ingénierie tissulaire réside alors dans le développement d'une nouvelle génération de biomatériaux ostéoinducteurs, offrant la possibilité d'une croissance osseuse sur des zones larges n'étant pas en contact direct avec l'os natif. Cette propriété d'ostéoinduction peut être obtenue soit en développant des matériaux biphasiques avec une microstructure poreuse adaptée, soit en associant des matériaux inorganiques à des protéines d'intérêt impliquées dans la formation osseuse.

Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte général de développement de substituts osseux en céramiques phosphocalciques ostéoinducteurs pour la réparation de grands défauts osseux et fait suite aux travaux développés par l'équipe biocéramiques du laboratoire IRCER. Afin de développer cette propriété d'ostéoinduction et donc améliorer l'ostéointégration des biocéramiques par l'environnement biologique, notre choix s'est porté sur la fonctionnalisation de surface par des protéines d'intérêt impliquées dans l'adhésion cellulaire, la biominéralisation et l'angiogenèse. Une compréhension des interactions physiques et chimiques entre biomatériaux et protéines lors de cette fonctionnalisation est donc essentielle. Pour cela, nous avons choisi de caractériser les interactions physiques protéines/biocéramiques par spectroscopie de force en utilisant un microscope à force atomique et les interactions chimiques protéines/biocéramiques par Imagerie Raman. La fonctionnalisation par liaison covalente devrait permettre de contrôler la densité surfacique en protéines présentes en surface de la céramique et éviter ainsi leur libération rapide et non contrôlée en milieu biologique.

Le premier chapitre de ce mémoire est consacré aux rappels bibliographiques nécessaires à la compréhension de l'étude expérimentale réalisée dans cette thèse. Une première partie est consacrée au tissu osseux en mettant en évidence sa composition, son remodelage et les mécanismes impliqués dans sa vascularisation. Les propriétés des substituts osseux en apatite phosphocalcique utilisés dans ces travaux ainsi que leurs différentes interactions avec le milieu biologique y sont exposées. Les protéines d'intérêt, notamment la fibronectine et le VEGF (*pour Vascular Endothelial Growth Factor*) qui ont été retenues pour l'étude ainsi que les différentes stratégies de fonctionnalisation de la surface des céramiques sont également détaillées. Enfin un état de l'art sur l'utilisation des différentes techniques de caractérisation pour la mise en évidence des interactions protéines/biocéramiques est présenté.

Le deuxième chapitre est dédié à la synthèse, la mise en forme et la caractérisation des différentes céramiques phosphocalciques en hydroxyapatite, en hydroxyapatite silicatée et en hydroxyapatite carbonatée utilisées durant ces travaux. Le protocole multi-étapes utilisé pour

la fonctionnalisation de la surface des céramiques phosphocalciques par les protéines est présenté puis détaillé étape par étape.

Le troisième chapitre a pour objectif la mise en évidence de la fonctionnalisation de céramiques phosphocalciques par spectroscopie de force et imagerie Raman. La première partie concerne les interactions physiques entre la fibronectine, protéine d'adhésion cellulaire et les céramiques denses en HA, en SiHA et en CHA. L'influence de la topographie et de la composition chimique sur les forces d'adhésion protéines/céramiques est discutée. Une seconde partie est consacrée au suivi par imagerie Raman de la fonctionnalisation des céramiques en HA et en CHA par le VEGF, protéine impliquée dans l'angiogenèse. La caractérisation de chaque étape de fonctionnalisation par spectroscopie de photoélectrons X et microscopie à force atomique viendra appuyer les résultats obtenus par imagerie Raman. L'influence de la nature du substrat sur la fonctionnalisation sera discutée.

Enfin, ce manuscrit se terminera par une conclusion générale qui reprendra l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse en mettant en avant les étapes clés qui ont contribué à l'avancée dans la compréhension de la problématique générale du développement d'une nouvelle génération de biomatériaux ostéoinducteurs.



# Chapitre I. Etude bibliographique

---

Dans ce chapitre, certains aspects fondamentaux sur le tissu osseux, son fonctionnement ainsi que les phénomènes impliqués dans sa vascularisation sont exposés dans une première partie. Les substituts osseux en apatite phosphocalcique et leurs interactions avec le milieu biologique sont présentés en deuxième partie. La troisième partie est consacrée, d'une part aux biomolécules d'intérêt utilisées dans ce présent travail, et d'autre part, aux différentes voies de fonctionnalisation de surface des substituts osseux phosphocalciques permettant de leur conférer des propriétés ostéoinductives. Enfin la dernière partie de ces rappels bibliographiques est dédiée aux techniques de caractérisation utilisées pour la mise en évidence des interactions protéines-substituts osseux.

## I.1. Tissus osseux et vascularisation

### I.1.1. Tissu osseux

Le squelette joue le rôle de support mécanique et de protection des organes. Il s'agit d'un tissu dynamique constamment remodelé ce qui permet la libération et le stockage de sels minéraux : les os contiennent 99 % du calcium et 85 % du phosphore total du corps humain. Le tissu osseux est un tissu conjonctif constitué de cellules dispersées dans une matrice, la matrice extracellulaire (MEC), constituée d'une phase organique et d'une phase minérale.

La phase organique est composée d'environ 90 % de collagène de type I (Figure 1) qui se présente sous la forme d'une glycoprotéine assemblée en fibres, assurant à l'os son élasticité et sa résilience mécanique. Un changement dans les propriétés du collagène notamment l'orientation des fibres peut modifier la quantité et la disposition des cristaux constituant la phase minérale affectant ainsi la mécanique de l'os [5]. Des protéines non collagéniques sont également présentes. Parmi elles, peuvent être citées l'ostéopontine qui joue le rôle de liaison entre la phase minérale et les cellules osseuses, l'ostéonectine qui intervient dans la minéralisation par son affinité pour le collagène I et le calcium, les facteurs de croissance sécrétés par les ostéoblastes qui jouent un rôle fondamental dans la régulation du tissu osseux [6], la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine, *etc.* D'autres protéines comme la fibronectine ou la vitronectine vont plus spécifiquement être impliquées dans l'adhésion des cellules osseuses [7]. En effet, la fibronectine possède une séquence peptidique spécifique lui permettant de se lier aux récepteurs de l'adhésion cellulaire, les intégrines [8].

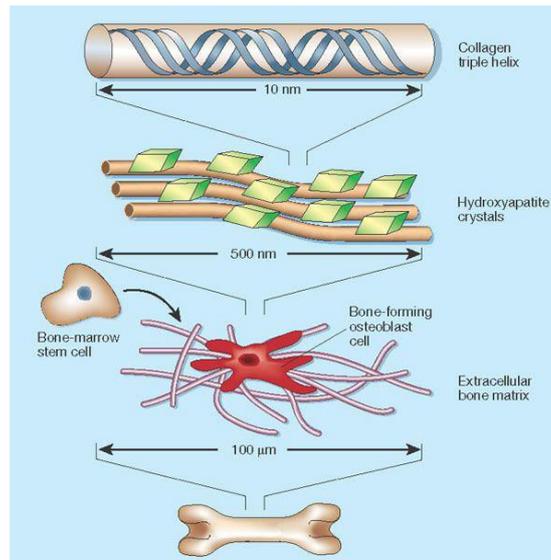
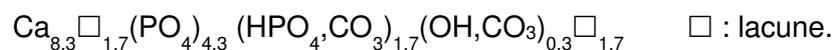


Figure 1 : Schéma présentant la composition d'un os humain [9].

La phase minérale de l'os est composée de sels de calcium et d'hydroxyde de phosphate qui précipitent pour former des cristaux d'hydroxyapatite. Ces cristaux se présentent sous forme d'aiguilles qui s'entremêlent aux fibres de collagène de la matrice organique et assurent ainsi la solidité de l'os (Figure 1). La croissance minérale, appelée biominéralisation, est donc sous contrôle de la matrice organique. La composition chimique de la phase minérale de l'os dépend de la nature de l'os et de son âge [10]. L'os peut se définir comme une hydroxyapatite carbonatée peu cristallisée, déficiente en calcium et partiellement substituée par des ions hydrogénophosphates ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ), carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) avec une teneur de 3 % à 8 % massiques [1] et des éléments à l'état de trace comme le sodium (0,53 %m), le magnésium (0,27 %m), le chlorure (0,13 %m), le potassium (0,0047 %m), le strontium (70 ppm) le zinc (205 ppm) [11]. En ne prenant en compte que les éléments majoritaires, la phase inorganique de l'os (os périostique animal) peut être représentée par la formule chimique suivante [1] :



### I.1.2. Remodelage osseux et cellules osseuses

Tout au long de la vie environ 5 % du tissu osseux est renouvelé annuellement, un nouveau tissu vient remplacer l'ancien. Ce processus continu permet d'assurer la réparation de petits traumatismes, contrôler le taux de calcium libéré et moduler la résistance du tissu osseux en fonction des sollicitations mécaniques. Le remodelage osseux est principalement dû à l'action couplée de cellules ostéoclastes et ostéoblastes, les premières dégradent l'os (résorption) et les secondes interviennent dans sa formation (ostéogénèse) et sa minéralisation.

Les ostéoclastes qui sont d'environ 100  $\mu\text{m}$  de diamètre sont issus de cellules souches hématopoïétiques. Ils sont responsables de la résorption osseuse par acidification du minéral osseux permettant ainsi sa dissolution et la dégradation enzymatique de la matrice osseuse extracellulaire déminéralisée. Les ostéoclastes matures sont des cellules fonctionnelles polarisées qui s'attachent à la matrice osseuse minéralisée en formant une zone d'adhérence ressemblant à un anneau, sous laquelle ils génèrent un milieu acide entraînant la dissolution du minéral osseux. Pendant le remodelage osseux, les ostéoclastes résorbent l'os vieux, et activent les ostéoblastes grâce à des molécules de signalisation (signalisation paracrine<sup>1</sup>) pour former un nouvel os [12].

Les ostéoblastes sont issus de cellules souches non spécialisées du mésenchyme (cellules souches mésenchymateuses). Ils mesurent de 20 à 50  $\mu\text{m}$  de diamètre et assurent de manière générale la synthèse de la matrice osseuse. Ils peuvent différer selon leur stade de développement. Les ostéoblastes actifs sont de forme cuboïde et mononucléés. Ils synthétisent et sécrètent le collagène de type I, des glycoprotéines (ostéopontine, ostéocalcine) et des facteurs de croissance dans une matrice non minéralisée appelée (ostéoïde) entre le corps cellulaire et la matrice minéralisée [13]. Ils produisent également des minéraux de phosphate de calcium intra et extra-cellulaire [14]. Les ostéocytes sont des ostéoblastes matures qui sont piégés dans la matrice osseuse et sont responsables du maintien des os. Les ostéoblastes inactifs, quant à eux, ont une activité métabolique très limitée et forment une couche de cellules bordantes sur les surfaces osseuses.

La Figure 2 présente de façon schématique les différentes étapes du remodelage osseux ainsi que les cellules impliquées, lesquelles ne vont cesser de communiquer et s'organiser afin d'assurer ce remodelage [15]. Le remodelage osseux comporte 4 étapes faisant intervenir tour à tour ostéoclastes et ostéoblastes. La première phase est appelée phase de résorption. Une fois activés les ostéoclastes se fixent sur la matrice osseuse, délimitent la zone de résorption permettant ainsi la dissolution de la phase minérale de la matrice osseuse et la dégradation de la matrice protéique [16]. Durant la deuxième phase, phase d'inversion, les ostéoclastes s'autodétruisent et libèrent des facteurs de croissance qui activent le recrutement des pré-ostéoblastes et favorisent leur différenciation [17]. Les ostéoclastes sont ensuite remplacés par des macrophages qui lissent la surface. La phase qui suit est la phase de formation. Les ostéoblastes se mettent au fond de la lacune de résorption et sécrètent une nouvelle matrice non minéralisée ostéoïde qui sera par la suite minéralisée au contact entre le tissu ostéoïde et le tissu minéralisé. Certains ostéoblastes sont alors piégés dans l'os et deviennent des

---

<sup>1</sup> Paracrine : communication impliquant des messages chimiques agissant dans le voisinage de la cellule qui les a synthétisés.

ostéocytes. Lors de l'étape finale, la quiescence, les cellules bordantes recouvrent la surface de l'os nouvellement formé, empêchant ainsi les ostéoclastes d'y accéder et de le résorber. Il s'agit d'une étape de minéralisation secondaire où le minéral s'accumule au sein de la matrice osseuse.

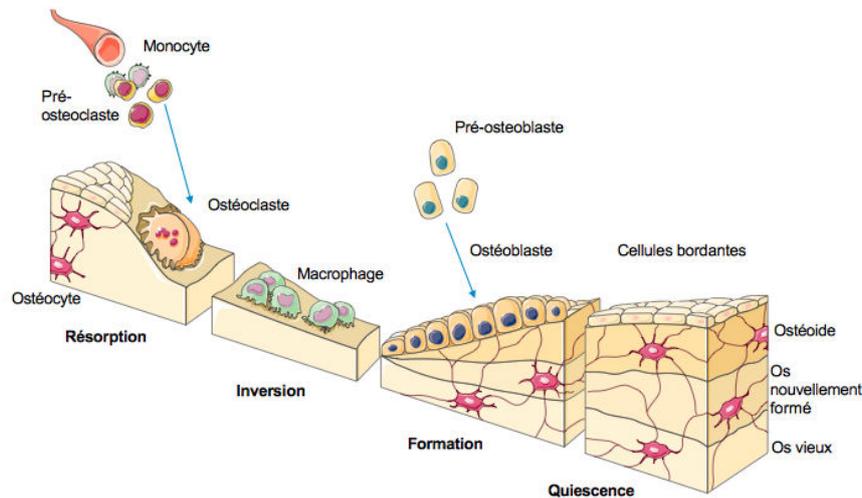


Figure 2 : Schéma illustrant les différentes étapes du processus de remodelage osseux.  
(site web: <http://smart.servier.com/-Mars 2018>)

L'ostéogénèse c'est-à-dire le processus par lequel l'hydroxyapatite biologique est déposée dans la matrice extracellulaire (MEC) correspond à la formation du tissu osseux depuis l'activation des cellules progénitrices (phase d'inversion) jusqu'à l'étape finale de la minéralisation (phase de formation). La première étape de la minéralisation est la formation de cristaux d'hydroxyapatite dans les vésicules matricielles qui bourgeonnent à partir de la membrane superficielle des ostéoblastes. Ceci est suivi de la propagation de l'hydroxyapatite dans la matrice extracellulaire et de son dépôt entre les fibrilles de collagène [18].

La différenciation des cellules ostéoprogénitrices en milieu ostéogénique a lieu en trois temps : mise en place de la signalisation liée à l'engagement dans la différenciation, production et maturation de la matrice puis minéralisation. La première phase implique l'expression du facteur de transcription RUNX 2 (*Runt-related transcription factor 2*) qui va lui-même entraîner l'expression de gènes associés à la formation de la matrice osseuse exprimant le collagène de type I et la phosphatase alcaline (PAL). Au stade final, les gènes associés à la minéralisation, codant l'ostéocalcine et la sialoprotéine osseuse BSP (*bone sialoprotein*), sont exprimés aux niveaux les plus élevés [19]. La phosphatase alcaline est une enzyme synthétisée par les ostéoblastes capable d'hydrolyser les esters phosphoriques inhibiteurs de la minéralisation [20]. L'expression de la phosphatase alcaline est augmentée immédiatement après la phase de prolifération des cellules osseuses (Figure 3).

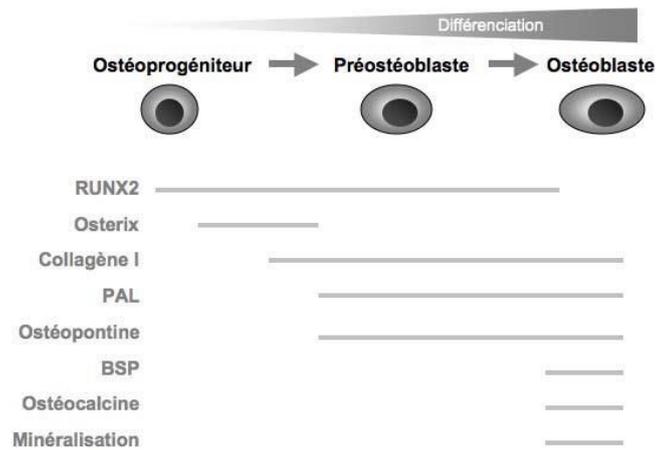


Figure 3 : Expression des marqueurs de la différenciation ostéoblastique [21].

Parmi les protéines ostéogéniques qui initient la formation osseuse, on peut citer, les facteurs de croissance transformant bêta TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ) qui stimulent fortement le processus de repousse osseuse [22], les protéines morphogénétiques osseuses BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*), membres de la famille des TGF- $\beta$ , qui sont impliquées dans la croissance osseuse et la différenciation des cellules ostéoblastes [23]. Plus, précisément, la BMP- 2 stimule la différenciation des cellules souches mésenchymateuses [24] et active le facteur de transcription spécifique des ostéoblastes RUNX2 [25]. Ce dernier participera à la stimulation de l'expression des gènes ostéoblastiques (phosphatase alcaline, ostéocalcine) dans les ostéoblastes. Les BMPs sont exprimées tardivement dans la minéralisation.

### I.1.3. Angiogenèse

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins permet aux cellules d'assurer leur alimentation continue en oxygène et en nutriments par la circulation sanguine. Le réseau vasculaire est fortement développé dans le corps humain afin d'alimenter toutes les cellules.

Au cours du développement du tissu osseux et afin que le tissu soit entièrement vascularisé, de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés à partir des cellules endothéliales en prolifération. Ce processus appelé angiogenèse, correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Les nouveaux vaisseaux sanguins se forment en direction d'une zone où l'apport en oxygène et en nutriments est très faible. Les cellules génèrent alors le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) qui stimule l'angiogenèse, permettant ainsi à cette zone sous-alimentée d'être desservie par la circulation sanguine. L'angiogenèse s'arrête une fois que les tissus sont bien vascularisés.

La communication entre les vaisseaux sanguins et les cellules osseuses permet un maintien de la vascularisation du tissu osseux. L'angiogenèse joue donc un rôle majeur dans la croissance osseuse et la réparation des fractures.

La formation d'un réseau vasculaire mature se fait en deux étapes (Figure 4). La vasculogenèse consiste en l'association de cellules progénitrices vasculaires (cellules endothéliales) pour former des vaisseaux sanguins primitifs, elle est suivie de l'angiogenèse qui permet le développement du réseau vasculaire à partir des vaisseaux sanguins primitifs.

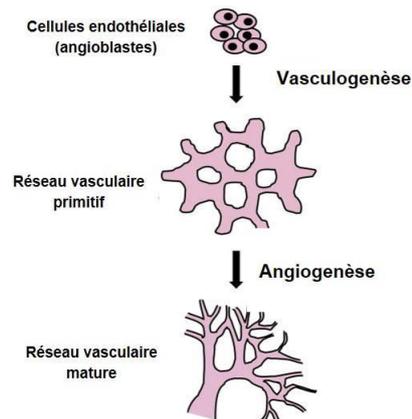


Figure 4 : Schéma illustrant la formation d'un réseau vasculaire par vasculogenèse et angiogenèse [26].

Lorsqu'un vaisseau est formé, les cellules endothéliales aplaties et orientées dans le sens du flux sanguin, couvrent sa paroi interne et composent l'endothélium [27]. Ce dernier constitue donc la couche la plus interne des vaisseaux, celle en contact avec le sang.

Il existe deux mécanismes de l'angiogenèse : l'angiogenèse par intussusception et l'angiogenèse par bourgeonnement.

### I.1.3.1. Angiogenèse par intussusception

L'angiogenèse par intussusception correspond à une division d'un vaisseau sanguin dans le sens de sa longueur. Lors de ce mécanisme, deux cellules endothéliales de bord opposés d'un vaisseau entrent en contact (Figure 5). Un espace entre ces deux cellules se crée alors par modification des jonctions endothéliales. Il est ensuite colonisé par des cellules fibroblastiques et des péricytes<sup>2</sup> lesquels vont synthétiser une matrice extracellulaire qui finalisera la séparation complète entre les deux vaisseaux. Les vaisseaux se séparent alors dans le sens de la longueur créant ainsi deux nouveaux vaisseaux distincts. Cette forme d'angiogenèse nécessite peu de prolifération des cellules endothéliales et permet une grande ramification du réseau vasculaire préexistant.

<sup>2</sup> Péricytes : cellules murales localisées au niveau de la lame basale de l'endothélium des capillaires.

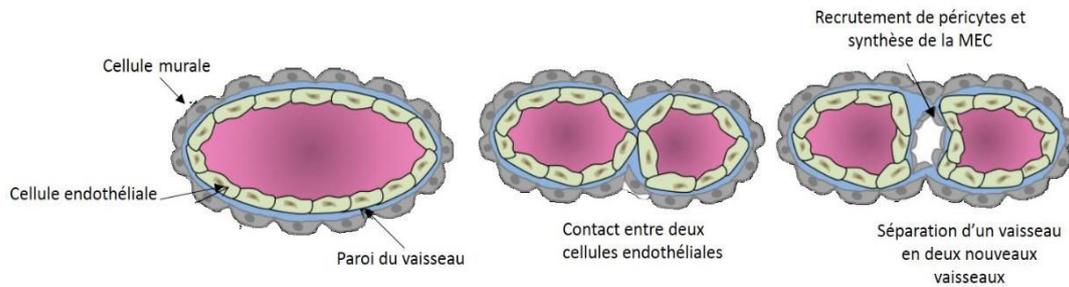


Figure 5 : Schéma illustrant l'angiogenèse par intussusception [28].

### I.1.3.2. Angiogenèse par bourgeonnement

Le bourgeonnement correspond à l'expansion du réseau vasculaire à partir de vaisseaux préexistants par formation de bourgeons endothéliaux (Figure 6). Lors de la première étape (activation), les cellules endothéliales quittent leur état de quiescence, prolifèrent et migrent afin de former un nouveau vaisseau. Durant la seconde phase (maturation), le réseau vasculaire se stabilise. Il s'agit du mécanisme présent dans le tissu osseux.

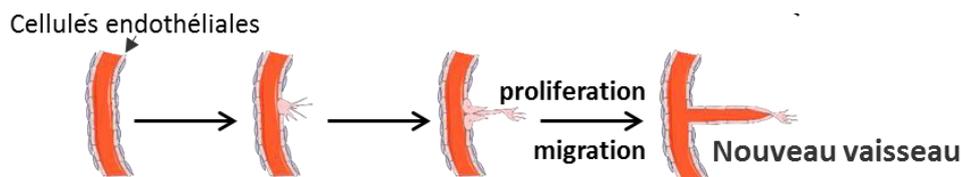


Figure 6 : Schéma illustrant l'angiogenèse par bourgeonnement.

En cas d'hypoxie, c'est-à-dire lorsqu'il y a une inadéquation entre les besoins tissulaires en oxygène et les apports, les ostéoblastes commencent à sécréter des facteurs pro-angiogéniques ce qui déclenche la phase d'activation. Equipées de détecteurs à oxygène, les cellules endothéliales les plus proches répondent à l'hypoxie à travers l'activation de voies de signalisation stimulant la prolifération et la migration.

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs), enzymes sécrétées par les cellules, dégradent les adhésions cellules-cellules et cellules-matrice permettant la libération des facteurs de croissance pro-angiogènes (VEGF-A pour *Vascular Endothelial Growth Factor-A*, FGF-2 pour *Fibroblast Growth Factor-2*, TGF- $\beta$  pour *Transforming Growth Factor  $\beta$* ) et des cytokines présentes dans la matrice extracellulaire facilitant ainsi la migration des cellules endothéliales. Une fois que les cellules endothéliales sont activées par le VEGF, seules quelques-unes vont migrer et déterminer la cellule de « tête » appelée « *tip cell* ». Elle possède à son extrémité des filopodes composés de nombreux filaments d'actine qui vont s'orienter selon l'axe des cellules émettrices des facteurs pro-angiogènes (Figure 7). Les « *tip cells* » répondent à un gradient de concentration en VEGF-A qui guide leur migration. Leur niveau de prolifération est

donc régulé par la concentration en VEGF-A. Ainsi, la structuration des vaisseaux au cours de l'angiogenèse dépend de la distribution du VEGF-A extracellulaire qui régule des réponses cellulaires dans des populations de cellules endothéliales [29]. Les cellules endothéliales à l'arrière de la cellule de tête (appelées « *stalk cell* ») soutiennent le développement et l'élongation du bourgeon endothélial et participent, à la fin de la croissance, à la formation de la lumière vasculaire du capillaire ainsi formé. Quant aux cellules « *phalanx cells* », il s'agit de cellules endothéliales quiescentes organisées en forme de pavés assurant la stabilité du vaisseau.

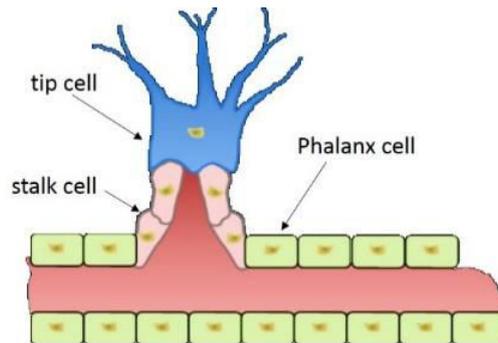


Figure 7 : Illustration des différents types cellulaires formant un capillaire de cellules endothéliales [28].

Au cours de la phase de maturation, les cellules endothéliales arrêtent de migrer et proliférer et synthétisent la membrane basale. Lorsque deux « *tip cells* » se rencontrent, elles peuvent soit se joindre soit se repousser. Dans le cas d'un contact, des jonctions s'établissent grâce à la VE-cadhérine (*Vascular Endothelial Cadherin*), glycoprotéine permettant l'adhésion entre les cellules endothéliales. La présence de signaux pro-angiogènes et un faible taux d'oxygène à la fin de la phase de maturation pourraient contribuer à la naissance d'une nouvelle ramification. Parallèlement, le flux sanguin soutient la stabilisation des vaisseaux, en l'absence de circulation sanguine, une régression d'un néo-vaisseau peut se produire.

## I.2. Substituts osseux en apatite phosphocalcique

Les substituts osseux sont des matériaux biocompatibles (tolérés par l'organisme) destinés à être implantés afin de combler ou remplacer une perte osseuse. Le but est de restaurer la fonction de l'os et de renforcer sa structure. Parmi les matériaux qui peuvent être utilisés comme substituts osseux, il y a des métaux, des verres, des polymères, des composites [30] et des céramiques [31], [32].

En raison de leur composition chimique proche de celle du minéral osseux, les céramiques à base de phosphate de calcium (hydroxyapatite et/ou phosphate tricalcique) présentent un intérêt majeur pour les applications de comblement osseux. Ces matériaux céramiques sont connus pour leur bioactivité (propriété permettant des réactions chimiques spécifiques à

l'interface implant - tissu receveur) et s'intègrent au tissu vivant conduisant à une liaison physico-chimique intime avec l'os, appelée ostéointégration. De plus, lorsque les céramiques phosphocalciques sont macroporeuses, elles guident la repousse osseuse à leur surface permettant la pénétration d'os néoformé au cœur de la structure poreuse favorisant ainsi la régénération osseuse *in vivo* [33], [34], [35]. Cependant, cette propriété d'ostéconduction est limitée à de petits volumes, la colonisation n'a lieu que sur 1 cm de profondeur (environ) à partir du tissu hôte en contact avec le substitut osseux [36].

Parmi ces biocéramiques, l'hydroxyapatite phosphocalcique ainsi que les hydroxyapatites phosphocalciques silicatée et carbonatée sont des matériaux attractifs pour leur intérêt biologique.

### I.2.1. Hydroxyapatite phosphocalcique

L'hydroxyapatite stœchiométrique phosphocalcique (HA) de formule chimique  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  appartient à la famille cristallographique générique  $\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Y}_2$ , où Me représente un cation divalent,  $\text{XO}_4$  un groupement anionique trivalent et Y un anion ou groupement anionique monovalent. L'hydroxyapatite se caractérise par un rapport molaire Ca/P de 10/6 et cristallise dans le système hexagonal  $\text{P6}_3/\text{m}$  avec comme paramètre de maille  $a = b = 9,432 \text{ \AA}$  et  $c = 6,881 \text{ \AA}$  et donc une maille de volume  $530,14 \text{ \AA}^3$  [37].

Le squelette de la structure apatite (Figure 8) est défini par un empilement des tétraèdres ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) qui ne peuvent présenter de lacune contrairement aux sites calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et hydroxydes ( $\text{OH}^-$ ). Deux tunnels sont formés, perpendiculaires au plan (001). Le premier tunnel est centré sur les axes ternaires de la structure et occupé par des ions calcium qui sont au nombre de quatre par maille (cote :  $0, \frac{1}{2}, 0$ ). Le second tunnel est délimité par six ions calcium et centré sur un groupement hydroxyde ( $\text{OH}^-$ ).

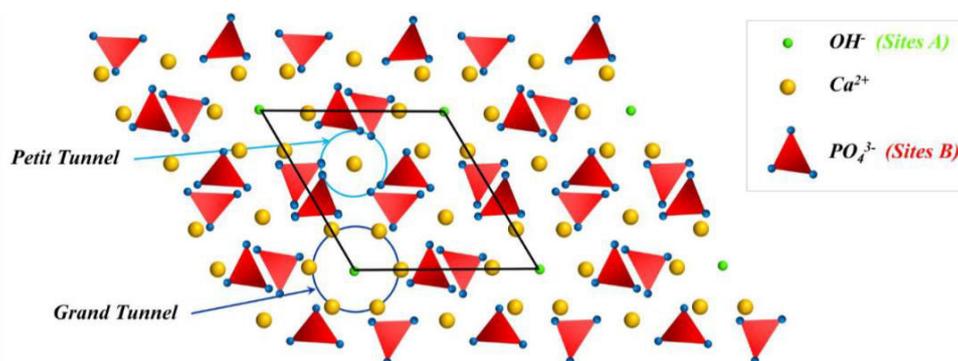


Figure 8 : Structure cristalline de l'hydroxyapatite.

L'hydroxyapatite est une référence pour les matériaux phosphocalciques implantables. Elle est utilisée comme substitut osseux depuis de nombreuses années. Sa première utilisation date des années 80 sous forme de dépôt plasma sur métaux. L'hydroxyapatite possède une

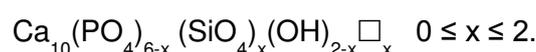
bonne affinité pour les cellules et les protéines [34], [38], [39]. En effet, les implants revêtus d'hydroxyapatite montreraient une meilleure ostéointégration par rapport aux métaux et cela grâce à leurs capacités d'adsorption des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire [40]. Associée à d'autres matériaux comme les polymères PMMA (polyméthacrylate de méthyle) ou le titane, l'hydroxyapatite favoriserait la prolifération et la différenciation des ostéoblastes [41], [42].

La structure à base de tunnels permet à l'hydroxyapatite d'admettre de nombreuses substitutions ioniques. Par exemple, les ions carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) peuvent se substituer aux ions hydroxydes (substitution de type A) et/ou aux ions phosphates (substitution de type B) [43]. L'incorporation de silicium implique, elle, la substitution d'un groupement phosphate  $\text{PO}_4^{3-}$  par un groupement silicate  $\text{SiO}_4^{4-}$  [44],[45]. De manière générale, ces substitutions se traduisent par l'apparition de lacunes en sites cationiques ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et/ou hydroxydes ( $\text{OH}^-$ ). Cela amène à une non-stœchiométrie de l'apatite entraînant une modification de sa cristallinité et/ou une diminution de sa stabilité thermique.

D'autres substitutions peuvent également être effectuées par des éléments tels que l'argent qui présente des qualités en tant qu'agent antibactérien, le strontium pour son rôle dans la minéralisation, les ions fluorures pour leur contribution à la croissance osseuse ou encore le zinc qui a un effet inhibiteur sur l'activité des cellules ostéoclastes *in vitro* [46].

## I.2.2. Hydroxyapatite silicatée

Les hydroxyapatites silicatées (SiHA) ont fait l'objet de plusieurs études afin de déterminer le rôle du silicium dans la repousse osseuse. En effet, le silicium semble être un facteur important pour la formation osseuse et la calcification [3]. Schwarz *et al.* ont pu mettre en évidence une meilleure croissance de rats ayant une alimentation riche en silicium [47]. *A contrario*, une carence en silicium engendre un développement squelettique et cartilagineux moins important [48], [49]. De plus, le silicium a un effet positif dans la minéralisation de la matrice osseuse en augmentant sa densité [50], [51] et participe à la synthèse du collagène de type I [52]. Enfin, des études en milieux de cultures cellulaires ont démontré l'implication du silicium sur la prolifération et la différenciation des ostéoblastes et des ostéoclastes [52–54]. La substitution des ions phosphates  $\text{PO}_4^{3-}$  par les ions silicates  $\text{SiO}_4^{4-}$  est basée sur le modèle suivant [44] :



L'électroneutralité est respectée en créant des lacunes sur le site hydroxyde avec un taux massique maximum théorique de silicium pouvant être introduit de 5,82 % correspondant à 2 moles de silicate.

Plusieurs taux de substitutions ont été étudiés pour l'élaboration des hydroxyapatites silicatées [45, 55–58]. Palard *et al.* ont réalisé des synthèses par précipitation en voie aqueuse pour différents taux de silicium variant de  $x = 0,2$  à  $x = 4$  [58]. Les poudres obtenues après synthèse indiquaient la présence d'une phase d'apatite carbonatée de type B et d'une phase silicatée ( $\text{CaSiO}_3$ ), seul un traitement thermique au-dessus de  $700\text{ °C}$  permettant l'incorporation des groupements silicates dans la structure apatite. L'obtention d'une hydroxyapatite silicatée monophasée n'est toutefois possible que pour des teneurs en silicium inférieures à une mole pour une poudre, et n'excédant pas  $0,5\text{ mol}$  pour des céramiques denses. La substitution des groupements phosphates par les groupements silicates engendre une modification des paramètres de maille de la structure apatite [58], [59], [60]. La maille s'allonge selon l'axe  $c$  proportionnellement au taux de silicium en raison de la taille plus importante des groupements silicates par rapport aux groupements phosphates.

L'effet biologique du silicium en substitution demeure confus dans l'hydroxyapatite. En effet, après immersion dans des solutions de type *Simulated Body Fluid* (SBF) [61] ou sérum foetal bovin [2], le silicium semble apporter une meilleure bioactivité par rapport à l'hydroxyapatite pure tout en gardant des propriétés de biocompatibilité [62], [63]. D'autres études ont montré une croissance osseuse plus importante pour l'hydroxyapatite silicatée comparée à l'hydroxyapatite [64], [53], [65], due probablement à la dégradation *in vivo* des SiHA. L'incorporation du silicium dans la structure de l'hydroxyapatite favoriserait la dissolution du fait d'un changement de microstructure, le silicium engendrant une réduction de la taille des grains par rapport à l'HA [66]. Cependant cette hypothèse sur la solubilité élevée des SiHA est remise en question par Bohner [67]. En effet, l'augmentation de la solubilité pourrait être due à une incorporation très partielle du silicium dans la maille de l'apatite et donc à la présence d'une phase de silicium secondaire soluble. Ce point a été confirmé par Gasquères *et al.* par résonance magnétique nucléaire (RMN) solide du silicium. Le silicium ne serait que partiellement incorporé dans la structure de l'hydroxyapatite, le reste étant présent sous forme d'une phase amorphe de gel de silice [68].

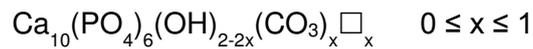
Même si l'intérêt du silicium reste à discuter d'un point de vue biologique, son incorporation pourrait permettre une fonctionnalisation de surface par immobilisation covalente de molécules bioorganiques favorisant l'adhésion des cellules impliquées dans la formation osseuse [69], [70].

### **I.2.3. Hydroxyapatite carbonatée**

Les hydroxyapatites carbonatées (CHA) sont des hydroxyapatites synthétiques partiellement substituées par des ions carbonates, de formule chimique très proche de celle de l'apatite biologique naturelle ce qui leur confère des propriétés biologiques particulièrement

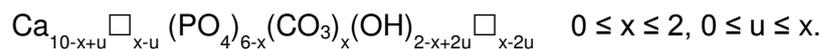
intéressantes notamment pour les hydroxyapatites de taille nanométrique. En effet, l'os naturel contient entre 3 et 8 % massique d'ions carbonates [71], [72].

Les ions carbonates peuvent être présents sur les sites cristallographiques de la maille d'hydroxyapatite selon deux mécanismes distincts. Ils peuvent se substituer aux ions hydroxydes OH<sup>-</sup> (substitution de type A), l'apatite formée est alors appelée « apatite carbonatée type A » (C<sub>A</sub>HA) de formule chimique générale [73] :



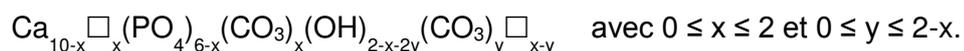
où x correspond à la quantité d'ions carbonates substitués, et  $\square$  représente les lacunes assurant la neutralité de la maille. Cette substitution entraîne une contraction de la maille selon l'axe c et une élévation selon l'axe a [74].

Les ions carbonates peuvent également se substituer aux ions phosphates PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (substitution de type B), l'apatite formée est alors appelée « apatite carbonatée type B » (C<sub>B</sub>HA) de formule chimique générale [75]



x correspondant à la quantité d'ions carbonates substitués et u au comblement partiel des lacunes d'ions calcium et d'hydroxydes par le couple [Ca / (OH)<sub>2</sub>]. Cette substitution engendre une diminution du paramètre de maille a et une augmentation du paramètre c [71], [76].

Il est également possible d'avoir des substitutions en site A et en site B. Il s'agira alors d'une apatite carbonatée mixte A/B (C<sub>AB</sub>HA) de formule chimique générale [43] :



La précipitation en voie aqueuse est la voie la plus utilisée pour la synthèse d'une poudre phosphocalcique carbonatée de type apatite [43]. L'élaboration de céramiques d'hydroxyapatites carbonatées nécessite des conditions de frittage particulières. Afin d'éviter toute décomposition due à la décarbonatation de la poudre, il est nécessaire de faire les traitements thermiques en atmosphère contrôlée sous CO<sub>2</sub>. Les conditions et paramètres de frittage (pression partielle de CO<sub>2</sub>, de vapeur d'eau, température, temps) doivent être ajustés en fonction du taux d'ions carbonates et du type d'apatite carbonatée (C<sub>B</sub>, C<sub>A</sub>, C<sub>AB</sub>) [77].

La carbonatation conduit à une augmentation de la solubilité, en milieu acide, du composé par rapport à celle de l'hydroxyapatite stœchiométrique (acide acétique, pH = 5, 37 °C) [78]. En effet, la dissolution d'une hydroxyapatite carbonatée (CHA) frittée à 750 °C est plus rapide (30 s) comparée à celle d'une hydroxyapatite (HA) frittée à 1200 °C (3,8 jours). Les ions carbonates et les lacunes jouent alors un rôle important dans le mécanisme de dissolution en milieu acide. Ces résultats sont confirmés par Tadic *et al.* qui ont également mis en évidence

la solubilité supérieure due à la présence des ions carbonates, en milieu acide, pendant 72 h et à pH 4,4 [79]. Ils ont observé 62,5 % de masse restante pour un phosphate de calcium amorphe carbonaté contre 75,5 % pour une apatite nanocristalline carbonatée (3 à 5 % en masse d'ions carbonate) et enfin 94,4 % pour une hydroxyapatite amorphe. *In vitro*, Tadic *et al.* ont montré avec des ostéoclastes que l'hydroxyapatite carbonatée frittée est aussi soluble que l'os déprotéiné [79].

D'un point de vue biologique, la présence des ions carbonates (9 %m) au sein des céramiques en hydroxyapatite semble améliorer les propriétés d'ostéoconduction et de biorésorption [80]. Concernant le comportement des cellules, la différenciation des ostéoclastes est plus élevée lors de culture *in vitro* sur CHA (jusqu'à 2,35 %m) que sur HA [81] [82]. Il en est de même pour la prolifération des pré-ostéoblastes MC3T3-E<sub>1</sub>. Ces résultats concernant la prolifération ostéoblastique ont été obtenus par Germaini *et al.* [82] pour un taux de carbonates de 4,4 % en masse et par Pieters *et al.* [83] pour un taux de carbonates de 11 % en masse. Mais, Rupani *et al.* ont montré une prolifération cellulaire ainsi qu'une quantité totale du collagène produite à 7 et 28 jours identiques sur HA et CHA (4,9 %m) [84].

L'hydroxyapatite carbonatée semble présenter de bonnes propriétés biologiques pour une utilisation en tant que substitut osseux. Cependant, les céramiques en CHA présentent des microstructures totalement différentes de celle des céramiques en HA (porosité, rugosité...) qui ne sont pas prises en compte dans ces études biologiques. Le rôle exact de la composition chimique demeure donc confus.

#### **1.2.4. Ostéointégration des substituts osseux phosphocalciques**

L'ostéogénèse et l'ostéoconduction sont des éléments essentiels à l'établissement d'une liaison finale entre l'os receveur et l'implant (ostéointégration). Un implant pourra être ostéointégré si le matériau qui le constitue est biocompatible, si sa surface permet des réactions avec les tissus environnants et si son architecture lui autorise un contact intime avec le site receveur afin d'assurer d'abord le maintien de l'os, puis sa colonisation par les cellules osseuses. Un dispositif implantable poreux (*scaffold*)<sup>3</sup> permettra également une bonne répartition des contraintes.

Les principales étapes impliquées dans le processus d'ostéointégration ont été discutées par P. Ducheyne et sont présentées sur la Figure 9. Elles reprennent les différentes étapes du remodelage osseux et les processus chimiques de surface (dissolution/précipitation) des phosphates de calcium [85] :

---

<sup>3</sup> Ce terme sera utilisé dans la suite de ce manuscrit pour distinguer tout implant phosphocalcique présentant une micro et une macro porosité données.

- dissolution du phosphate de calcium. Celle-ci est fonction de sa structure cristalline, de sa cristallinité et de sa composition chimique (1) ;
- précipitation et croissance épitaxiale de fins cristaux d'apatite en surface de l'implant (2) ;
- interdiffusion et échanges ioniques avec la surface (3) ;
- intégration de protéines non collagéniques adsorbées en surface (ostéopontine, sialoprotéine) (4) ;
- en parallèle, les ions calcium en solution influencent l'activité cellulaire, favorisent le chimiotactisme (5) et l'attachement des cellules osseuses (8) ;
- adhésion des cellules preostéoblastiques (preOB) (9) ;
- différenciation des cellules au contact du substrat en ostéoblastes (OB) et en ostéoclastes (OC) à partir des cellules souches de leurs lignages respectifs (10) ;
- prolifération des ostéoblastes (11) ;
- sécrétion de matrice collagénique (CO) par les ostéoblastes et minéralisation (12).

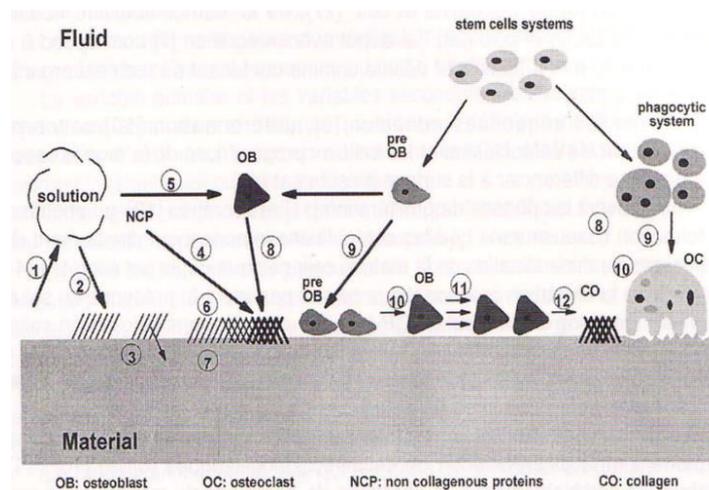


Figure 9 : Schéma illustrant les principales étapes du processus d'ostéointégration d'un phosphate de calcium [85].

Les paragraphes suivants présenteront en détail les interactions substitut osseux-protéines, substitut osseux-cellules et leurs effets sur l'activité cellulaire et enfin l'adhésion cellulaire.

#### 1.2.4.1. Interaction substitut osseux - protéines

Une fois un substitut osseux implanté, il interagit avec les différentes protéines présentes dans le milieu physiologique (étape (4) - Figure 9). *In vitro*, l'état des protéines est souvent assimilé à un état dilué et soluble. Cependant, *in vivo* la matrice extracellulaire est un milieu très dense

en protéines et en sucres lesquels interagissent entre eux, l'activité d'une protéine donnée dépendra donc de son environnement.

Les interactions entre une céramique phosphocalcique et une protéine dépendent des caractéristiques de la céramique (composition, cristallinité, énergie de surface...). Rouahi *et al.* ont étudié l'influence des caractéristiques physico-chimiques d'une poudre d'HA et d'une céramique en HA sur l'adsorption protéique et la réponse cellulaire [86]. Leur potentiel d'adsorption protéique a été testé après immersion dans un milieu de culture contenant 15 % de sérum de veau fœtal. Les résultats ont montré une relation directe entre la surface spécifique (SSA) et la capacité d'adsorption des protéines des poudres et des céramiques en HA. Plus la surface spécifique des particules d'HA est élevée (25,4 m<sup>2</sup>/g), plus leur adsorption de protéines est élevée (78 ± 2,3 µg/ml). Le traitement thermique amène à une surface spécifique plus faible (0,9 m<sup>2</sup>/g) avec une augmentation du taux de densification. Plus la microporosité des céramiques est basse, moins l'adsorption de protéines est élevée (65,7 ± 2,5 µg/ml) et l'adhésion des cellules réduite. D'autres travaux de Rouahi *et al.* ont montré qu'une hydroxyapatite microporeuse (12,5 % de porosité) présente une adsorption de protéines (fibronectine et albumine de sérum bovin) meilleure qu'une hydroxyapatite dense (2,5 % de porosité), les quantités de protéines adsorbées étaient respectivement de 66,02 µg/m<sup>2</sup> contre 17,20 µg/m<sup>2</sup> [87]. El-Ghannam *et al.* ont examiné les protéines adsorbées sur un verre bioactif traité par une solution d'électrolyte tamponnée au Tris<sup>4</sup> (génération d'une couche superficielle riche en phosphates), un verre bioactif non traité et sur une céramique poreuse en hydroxyapatite. Tous les substrats ont été immergés dans un milieu de culture tissulaire contenant 10% de sérum. La céramique poreuse en hydroxyapatite (SSA : 4 m<sup>2</sup>/g, volume de pores : 50-60 %) fixait une quantité de protéine totale supérieure à celle des autres substrats denses [88] montrant l'affinité des protéines pour ce matériau.

Si la surface spécifique influence l'adsorption des protéines, ces dernières et plus particulièrement les acides aminés qui les constituent ont un impact sur la croissance cristalline de l'HA. La cinétique de croissance de cristaux d'hydroxyapatite (HA) en présence d'acides aminés (acide aspartique et acide glutamique) a été étudiée par Koutsopoulos *et al.* dans des conditions proches des conditions biologiques (milieu NaCl, pH 7,4, température 37 °C) [89]. En présence d'acide aspartique et d'acide glutamique, la cinétique de croissance des cristaux d'HA diminue. Ce résultat est dû à l'adsorption et au blocage des sites de croissance actifs à la surface des cristaux HA. Le même effet inhibiteur a été observé avec l'adsorption de protéines sériques, comme l'albumine, sur des cristaux d'HA [90]. Par exemple, à faible

---

<sup>4</sup> Tris : abréviation de trishydroxyméthylaminométhane de formule chimique : C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, utilisé comme solution tampon en biochimie et notamment pour les acides nucléiques avec un pH entre 6,5 et 9,7.

concentration, l'albumine favorise la croissance de phosphate octocalcique (phosphate de calcium de formule  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et précurseur de l'HA lors de la biominéralisation), mais la ralentit à forte concentration [91]. Par ailleurs, Hunter *et al.* ont suggéré que la nucléation de l'hydroxyapatite en présence de sialoprotéine osseuse BSP (*Bone sialoprotein*) implique des séquences peptidiques riches en acide glutamique, mais que les séquences d'acide aspartique inhibent la croissance osseuse [92]. Harris *et al.* attribuent la nucléation de l'hydroxyapatite à l'interaction avec un seul motif d'acide glutamique de la BSP [93]. Pour Matsumoto *et al.*, les séquences des polyacides des protéines et notamment les acides glutamique et aspartique possèdent la même affinité pour l'hydroxyapatite mais la différence observée dans leur activité peut être due au changement de morphologie de l'HA après adsorption [94]. D'autres études *in vitro* estiment que le rôle des acides aminés dans la précipitation de HA est affecté par leur mobilité [95]. Les acides aminés dissous sont capables d'inhiber la précipitation et la croissance de HA en se liant aux noyaux de nucléation des phosphates de calcium empêchant ainsi leur croissance. Les acides aminés liés à la surface peuvent favoriser la précipitation de l'HA en complexant les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  augmentant ainsi la sursaturation locale.

En suspension, les protéines osseuses telles que le collagène ou l'ostéopontine favorisent la nucléation et le développement de phosphate de calcium [96]. Cependant, *in vivo*, l'effet global des acides aminés sur les phosphates de calcium mérite d'être davantage étudié et dans des conditions proches des conditions physiologiques où la présence de collagène, de cellules et d'autres protéines influencent fortement les précipitations. Une étude *in vitro* sur l'adsorption simultanée de plusieurs protéines du plasma humain sur différents substrats (zircone, alumine et hydroxyapatite) a montré que les céramiques phosphocalciques n'induisaient pas plus d'adsorption que les autres matériaux malgré l'affinité reconnue de l'HA pour les protéines [97].

En conclusion, une protéine adsorbée pourrait déclencher deux phénomènes en fonction de sa concentration : favoriser la nucléation à faible concentration et défavoriser la croissance dans un plan du cristal HA à forte concentration. Parallèlement, une même protéine pourrait jouer plusieurs rôles dans le processus de biominéralisation : nucléation, croissance, régulation de la morphologie de la phase minérale [98].

#### **1.2.4.2. Interaction substitut osseux - cellules et effets sur l'activité cellulaire**

L'attachement de la cellule à un matériau débute par la reconnaissance de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) adsorbées en surface grâce à des récepteurs spécifiques (intégrines). Cela déclenche plusieurs cascades de signalisation conduisant à la formation de structures appelées adhésions focales permettant un ancrage de la cellule au matériau.

Ensuite, se produit un réarrangement du cytosquelette conduisant à un étalement complet de la cellule (adhésion forte). Le comportement physiologique des cellules par la suite (prolifération et différenciation) est très dépendant de la qualité de l'adhésion cellulaire.

L'adhésion cellulaire (Figure 10) consiste d'abord à un ancrage initial de la cellule par la reconnaissance entre les intégrines et les protéines de la MEC. Cette interaction est ensuite renforcée par l'étalement de la cellule et l'augmentation des liens protéines adhésives-intégrines.

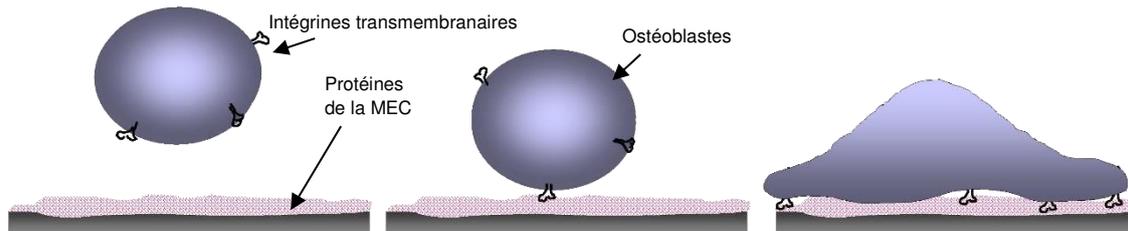


Figure 10 : Représentation schématique de l'adhésion cellulaire d'ostéoblastes aux protéines de la MEC adsorbées à la surface d'un matériau [99].

Des études *in vitro* ont montré que les phosphates de calcium jouaient un rôle important dans l'attachement cellulaire. Dalby *et al.* ont observé une prolifération et une différenciation des ostéoblastes plus importante sur un ciment PMMA (polyméthacrylate de méthyle) contenant 17,5 % en masse d'HA comparé à un ciment PMMA de référence [100]. De même, plusieurs auteurs ont mis en évidence la différenciation de cellules mésenchymateuses humaines (hMSCs pour *Human Mesenchymal Stem Cells*) en présence de phosphate de calcium tels que l'HA [101], ou le  $\beta$ -TCP (phosphate tricalcique) [102]. Les substitutions ioniques peuvent également influencer le comportement cellulaire. La présence de strontium dans le revêtement de couches minces en HA sur des substrats en titane améliore l'activité et la différenciation des ostéoblastes, tout en inhibant la production et la prolifération des ostéoclastes pour une teneur en strontium relativement élevée (3-7%). Ces résultats suggèrent que la présence de strontium peut améliorer l'effet positif des revêtements sur l'ostéointégration et la régénération osseuse, et prévenir la résorption osseuse indésirable [103].

Par ailleurs, l'adhésion, la prolifération ainsi que la différenciation des ostéoblastes seraient plus élevées sur des surfaces hydrophiles. L'adhésion des cellules et leur étalement dépendraient alors de l'énergie de surface du matériau. Un composite verre/phosphate de calcium (CaP) très hydrophile présente des valeurs d'adhésion cellulaire plus importantes ainsi qu'une différenciation plus précoce qu'un verre/PLA (PLA pour *Polylactic Acid*) [104]. D'autres travaux ont mis en évidence l'importance d'une forte rugosité sur la différenciation des ostéoblastes. Un revêtement nanostructuré en titanate de calcium ( $\text{CaTiO}_3$ ) produit par

traitement hydrothermal a été utilisé pour améliorer l'ostéointégration d'implants en titane micro-durcis. Cela a permis d'accélérer la prolifération et la différenciation des ostéoblastes en phase de cicatrisation osseuse précoce [105]. Des films minces à base de polystyrène (PS) et de poly-L-lactide (PLLA pour *Poly(L-Lactic Acid)*) contenant des puits nanométriques distribués de manière aléatoire, ont été développés en utilisant la démixtion des deux polymères et en ajustant leur composition (50/50). Des ostéoblastes embryonnaires humains (hFOB pour *human Fetal Osteoblast*) ont été cultivés sur ces différents substrats [106]. Les hFOB cultivées étaient bien réparties sur les surfaces ayant des puits de profondeur de 14 et 29 nm et moins étalées sur une surface de 45 nm de profondeur ou sur une surface lisse en acide polylactique. La morphologie ainsi que l'étalement des cellules varient alors en fonction de la topographie à l'échelle nanométrique [106].

L'architecture poreuse a également un impact sur la réponse cellulaire. Karageorgiou et Kaplan ont estimé que la taille minimale requise pour les macropores est d'environ 100  $\mu\text{m}$  en raison de la taille des cellules, des besoins de migration et du transport des éléments nutritifs. Cependant, une taille de pores supérieure à 300  $\mu\text{m}$  est recommandée afin d'améliorer la formation osseuse. Une telle porosité permettrait une distribution efficace de l'oxygène *via* une meilleure vascularisation du biomatériau, alors qu'une porosité inférieure entraînerait une concentration en oxygène insuffisante pour la survie cellulaire et la formation de cartilage avant l'os [107]. Lasgorceix *et al.* ont montré que la colonisation par les cellules préostéoblastiques est fortement influencée par la géométrie et la dimension des macropores des *scaffolds*. Les cellules (MC3T3-E<sub>1</sub> murines) se répartissent de façon homogène sur les contours des macropores à section circulaire, tandis qu'avec des géométries anguleuses, les cellules recouvrent préférentiellement l'intérieur des angles [108].

L'architecture poreuse influence le comportement cellulaire mais globalement, l'adhésion de la cellule au matériau est dépendante de la reconnaissance des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) adsorbées en surface et donc du caractère mouillant du substitut.

#### **1.2.4.3. Adhésion cellulaire**

Une partie de ces travaux de thèse est consacrée à l'étude des interactions physiques entre une biomolécule d'intérêt et les céramiques phosphocalciques. La protéine choisie est la fibronectine qui est impliquée dans le phénomène de l'adhésion cellulaire.

Les cellules pré-ostéoblastiques adhèrent au substrat en développant des adhésions focales fortes avant de se différencier en ostéoblastes (étape (11) de la Figure 9). Mais, les cellules adhèrent également aux cellules voisines par le biais de protéines membranaires spécifiques et aux protéines présentes dans la matrice extracellulaire à travers les intégrines transmembranaires  $\alpha$  et  $\beta$  (Figure 11). Les intégrines, qui sont des mécanorécepteurs

transmembranaires, assurent un lien physique entre les protéines de la MEC et l'actine<sup>5</sup> cytoplasmique (cytosquelette) permettant ainsi de contrôler l'attachement, la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire [109]. Regroupées en clusters, ces intégrines constituent les contacts focaux.

Les premières adhésions font moins d'un micromètre et s'agrègent en complexe d'une durée de vie très courte. Cependant la présence des intégrines permet leur développement en adhésions focales plus matures et stables en fonction des sollicitations. Riveline *et al.* ont mis en évidence la croissance des adhésions focales dans le sens de la force appliquée [110]. Cependant Beningo *et al.* contredisent cette évolution en montrant une relation inverse entre la distribution des forces appliquées et la distribution des adhésions focales des cellules migrantes (à l'avant des cellules) et aucun lien entre la force et l'étalement des cellules à l'arrière de celles-ci [111].

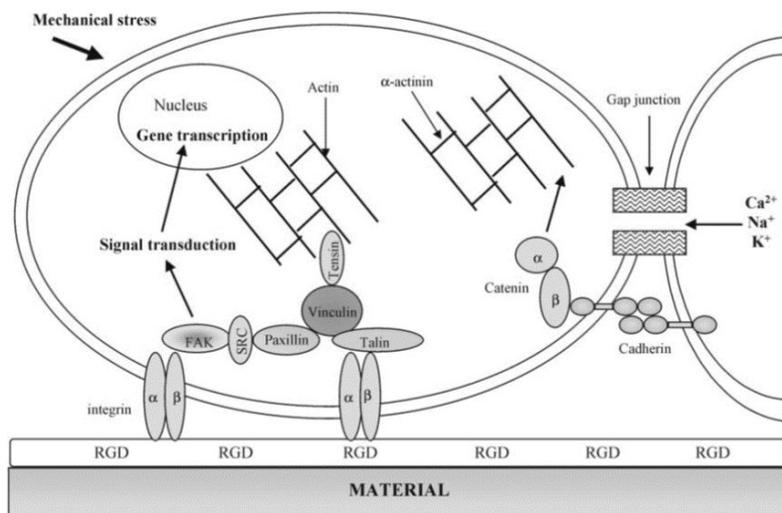


Figure 11 : Schéma représentant les intégrines et les protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire [8].

L'adhésion (voir Figure 10) des cellules ostéoblastiques [8] dépend d'abord de l'adsorption de protéines telles que la fibronectine, le collagène (...) à la surface des matériaux à base de phosphate de calcium [40], [88], [112]. Chacune de ces protéines possède plusieurs domaines ayant des sites de liaisons spécifiques. Ainsi, en favorisant l'adsorption de ces protéines d'adhésion sous une conformation adéquate, les matériaux pourraient favoriser l'adhésion et l'étalement des cellules puis leur activité physiologique [40]. Plusieurs études ont montré l'impact de la matrice extracellulaire sur l'organisation interne des cellules. La densité des protéines impliquées dans l'adhésion a un impact sur l'étalement de cellules [113] et sur la génération des forces de traction [114].

<sup>5</sup> Actine : protéine du cytosquelette des cellules eucaryotes et impliquée dans de nombreux mouvements intracellulaires.

La fibronectine est l'une des protéines qui favorise le plus l'adhésion cellulaire, permettant une différenciation et une survie des ostéoblastes. Son affinité pour un support permet l'étalement des ostéoblastes par l'activation des voies de signalisation intracellulaires [115] et des variations de l'adhésion cellulaire sont observées en fonction de l'expression des intégrines, elle-même fonction du matériau utilisé [116]. Les protéines adhésives comme la vitronectine ou la fibronectine se lient aux intégrines par la séquence RGD<sup>6</sup> et peuvent adopter plusieurs structures (conformations) à la surface du substrat. La séquence RGD est un motif peptidique reconnu par une grande variété d'intégrines présentes sur différents types cellulaires. Une fois reconnue, elle facilite l'adhésion d'un grand nombre de types cellulaires [117]. Etant impliquées dans la signalisation intracellulaire (transfert des signaux de la MEC vers les cellules), les intégrines pourront avoir un impact sur la survie et la différenciation des cellules [118], [119].

La cellularisation d'un substitut osseux nécessite alors son association à des biomolécules d'intérêt (protéines de la MEC) impliquées dans des phénomènes tels que l'adhésion cellulaire afin de lui conférer des propriétés ostéoinductives.

### **I.3. De l'ostéoconduction à l'ostéoinduction**

Les céramiques phosphocalciques ont la capacité de promouvoir la formation osseuse lorsque le contact est direct entre l'os et le matériau implanté [120] et que la zone à reconstruire est petite. Cependant cette propriété d'ostéoconduction est peu efficace lorsqu'il s'agit d'une régénération de larges défauts osseux dans lesquels le contact os-implant ne se fait qu'en périphérie de la zone à reconstruire. Il est donc nécessaire de développer aujourd'hui des substituts osseux capables de reconstruire un tissu osseux sans contact direct avec l'os. L'ostéoinduction est un processus biologique actif qui induit une différenciation des cellules progénitrices en ostéoblastes et assure donc l'ostéogenèse dans le matériau. Cela permettrait une croissance osseuse dans l'ensemble du matériau et donc une meilleure reconstruction de la zone ciblée. La propriété d'ostéoinduction peut être obtenue en développant des matériaux inorganiques ostéoinducteurs de nature [121]. En effet, des céramiques biphasiques de phosphates de calcium (BCP) avec une grande quantité de pores et une surface spécifique élevée présenteraient une formation osseuse plus significative après 12 semaines d'implantation intramusculaire chez des chèvres par rapport à des céramiques BCP avec une surface spécifique faible [122]. Une seconde approche est d'associer les matériaux inorganiques à des facteurs de croissance tels que ceux de la famille des BMPs [123]. La BMP-2 semble induire la migration de monocytes et activer la réponse du facteur TGF- $\beta$  qui

---

<sup>6</sup> RGD : séquence peptidique contenant l'Arginine, la Glycine et l'Acide aspartique présente dans différentes protéines de la MEC dont la fibronectine.

participe à la migration des cellules souches mésenchymateuses (et des ostéoblastes) ainsi qu'à leur différenciation et leur prolifération [124]. Une libération multiple de facteurs de croissance tels que la BMP-2, impliquée dans la croissance osseuse et le VEGF, impliqué dans l'angiogenèse peut permettre d'imiter les conditions naturelles de réparation d'une fracture osseuse. Par conséquent, un assemblage capable de libérer un facteur angiogénique actif et un facteur ostéogénique, favorisera la vascularisation précoce et attirera les cellules précurseurs ostéogéniques et leur nutrition/oxygénation. Les systèmes biodégradables à double libération de facteurs de croissance (VEGF et BMP-2) ont montré un effet significatif de la libération de facteurs angiogéniques (VEGF) et ostéogéniques (BMP-2) sur la régénération osseuse dans un modèle de défaut osseux du fémur [125].

Nous nous intéresserons par la suite aux principales protéines impliquées dans les phénomènes de l'angiogenèse et l'adhésion cellulaire, respectivement le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) reconnu comme régulateur clé dans la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, et la fibronectine (Fn), fortement impliquée dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire.

### **I.3.1. Qu'est-ce qu'une protéine ?**

#### **I.3.1.1. Aspects généraux**

Les protéines sont des biomolécules complexes. Elles jouent un rôle vital dans la structure et les fonctions cellulaires, permettant ainsi l'expression de l'information génétique (transcription de l'information génétique -ADN- en ARN et traduction en protéines). Elles sont constituées par une ou plusieurs chaînes polypeptidiques construites à partir de 21 acides aminés. Ces aminoacides sont liés entre eux par des liaisons amides, les liaisons peptidiques.

Les acides aminés sont des molécules bifonctionnelles avec un groupement amine primaire ( $\text{NH}_2$ ) sur le carbone porteur du groupement carboxyle ( $\text{C}(=\text{O})\text{-OH}$ ), dit carbone  $\alpha$  (Figure 12). Les 21 acides aminés rencontrés chez les eucaryotes<sup>7</sup> sont présentés en annexe 1 accompagnés de leurs différentes chaînes latérales R. Les chaînes des aminoacides de la plupart des protéines comprennent entre 100 et 400 résidus (un résidu = un acide aminé) pour un poids moléculaire compris entre 10 000 et 40 000 Da (1 Da = 1 unité de masse atomique). Toutes les protéines eucaryotes contiennent les mêmes acides aminés, seuls la proportion et l'ordre d'enchaînement varient.

La connaissance du comportement des acides aminés en fonction du pH du milieu est nécessaire pour comprendre les propriétés ioniques des protéines. Le point isoélectrique (pI)

---

<sup>7</sup> Eucaryotes : ensemble d'organismes unicellulaires ou multicellulaires pour lesquels l'ADN est contenu dans un noyau.

correspond à la valeur de pH pour laquelle la charge totale de la biomolécule est nulle. Pour un pH inférieur à la valeur du point isoélectrique, la charge globale de la protéine sera positive. Dans le cas contraire, la charge sera négative. Les protéines sont donc des amphotères qui selon le pH du milieu se comportent soit comme des acides faibles (donneurs de protons), soit comme des bases faibles (accepteurs de protons). Ce caractère est conditionné par les différentes fonctions portées par les chaînes latérales R.

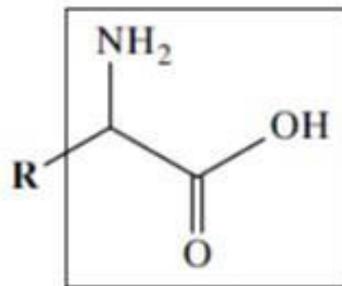


Figure 12 : Formule générale d'un acide aminé.

La structure des protéines est définie suivant plusieurs niveaux d'organisation :

- la structure primaire qui correspond à la séquence des résidus acides aminés ;
- la structure secondaire qui correspond à l'organisation spécifique de fragments courts (hélice- $\alpha$  et feuillets- $\beta$ ) selon un axe privilégié et est stabilisée par des liaisons hydrogène (Figure 13) ;
- la structure tertiaire ou forme tridimensionnelle qui est l'organisation spatiale complète de la protéine dans les trois dimensions de l'espace ;
- la structure quaternaire qui représente un arrangement dans l'espace de plusieurs chaînes (monomères) liées entre elles par des liaisons non covalentes ou par des ponts disulfures conduisant à un édifice protéique complexe. Plus précisément, le pont disulfure est une liaison covalente (S-S) qui se forme entre les deux atomes de soufre des fonctions thiol de deux cystéines (acides aminés) dans une protéine (voir exemple Figure 17).

La conformation native est généralement obtenue dans les conditions de la biosynthèse. La chaîne se replie en adoptant une structure unique. Mais il est possible d'avoir un nombre infini de conformations suite à la libre rotation autour de l'atome de carbone  $\alpha$ . Les valeurs des angles  $\Psi$  et  $\Phi$  sont conditionnées par les propriétés chimiques de la chaîne (Figure 14).

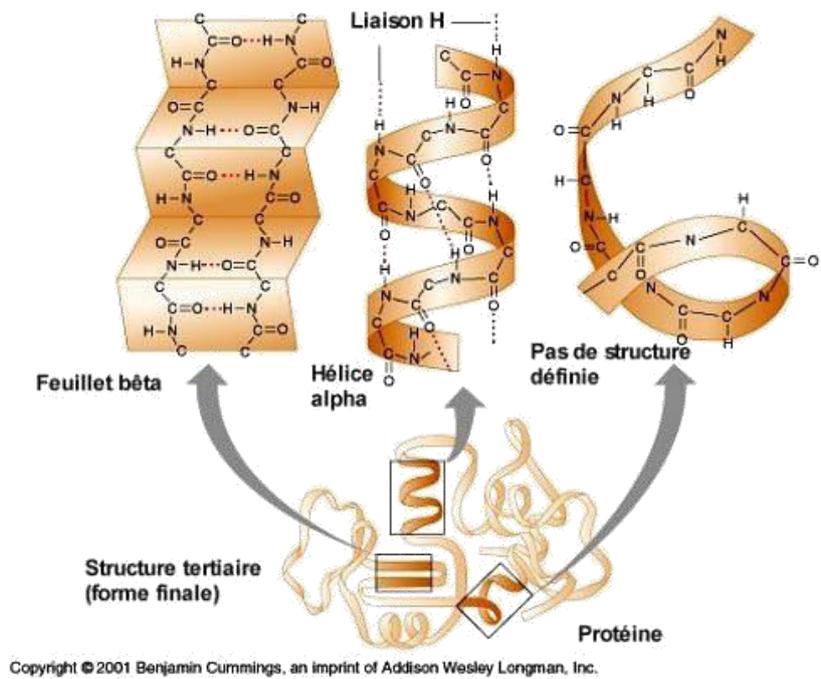


Figure 13 : Schéma représentant les structures secondaire et tertiaire d'une protéine.

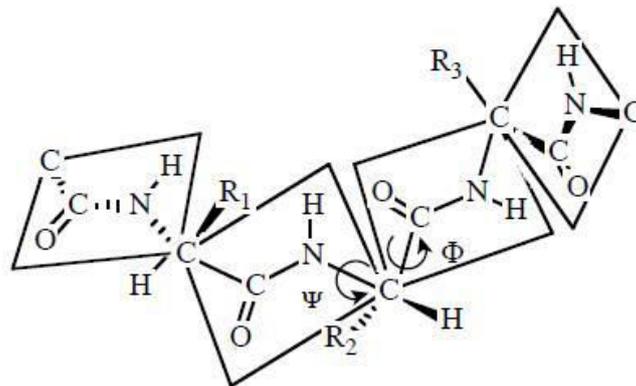


Figure 14 : Schéma illustrant la structure spatiale d'une chaîne polypeptidique (protéine) et mettant en avant la libre rotation (angles  $\Psi$  et  $\phi$ ) autour de l'atome de carbone portant la chaîne latérale.

Deux grandes familles de protéines se distinguent : les protéines fibreuses et les protéines globulaires. Les protéines fibreuses se présentent sous forme d'agrégats ordonnés selon un axe commun conduisant à la formation de fibre. La structure secondaire est soit en hélice- $\alpha$  (kératine en forme de torsades de dimères ou collagène fibrillaire), soit en feuillets- $\beta$  (empilement des protéines fibroïnes). La Figure 15 représente en exemple des filaments de kératine constitués de l'assemblage de protéines fibreuses. Les protéines globulaires sont des oligomères qui présentent une structure sphérique. Leurs structures tertiaires peuvent contenir des motifs hélices-  $\alpha$  et/ou des feuillets- $\beta$  (Figure 16). Il existe quelques protéines qui sont à la fois fibreuses et globulaires telle que l'actine.



Figure 15 : Filaments de kératine présentant la répétition de la séquence : a, b, c, d, e, f, g. ([https://slideplayer.fr/slide/3699751/Août 2018](https://slideplayer.fr/slide/3699751/Août%202018))

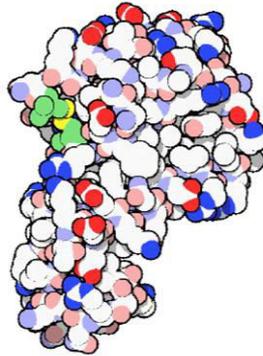


Figure 16 : Exemple de protéine globulaire, le lysozyme. ([https://pdb101.rcsb.org/motm/9/Août 2018](https://pdb101.rcsb.org/motm/9/Août%202018))

La conformation native des protéines (structure tertiaire) peut être affectée et modifiée suite à des traitements mécaniques, physiques (chaleur, froid...) ou chimiques (pH, solvants...). Sous l'effet de ces agents dénaturants, les faibles forces impliquées dans la stabilisation de la conformation de la protéine (liaisons hydrogène, interactions hydrophobes, forces de Van der Waals et liaisons ioniques) sont minimisées puis rompues. Les liaisons qui rompent en premier sont les liaisons de faible énergie c'est-à-dire les ponts  $\beta$  qui ne sont stabilisés que par deux liaisons hydrogène puis les hélices- $\alpha$ . Ceci engendre un changement de forme par déplissement. En revanche, les ponts disulfures, liaisons covalentes résultant d'une réaction d'oxydation, sont plus difficiles à rompre.

Les deux protéines d'intérêt, fibronectine et VEGF utilisées dans le présent travail sont plus amplement décrites dans les deux paragraphes suivants.

### I.3.1.2. Fibronectine

Comme mentionné dans le paragraphe I.2.4.3, la fibronectine (Fn) est une protéine de la matrice extracellulaire impliquée dans l'adhésion cellulaire. Elle est, par exemple, impliquée dans l'adhésion des cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux (ADSCs pour *Adipose tissue-Derived Stem Cells*) [126]. Elle joue le lien entre une surface et les intégrines transmembranaires afin de permettre l'étalement puis l'adhésion des cellules ostéoblastes (Figure 10). La liaison Fn-intégrine est essentielle à la maturation des cellules précurseurs

vers un phénotype de cellule ostéoblastique différenciée [127] et à la minéralisation de la matrice osseuse [128].

L'activité biologique de la fibronectine dépend principalement de sa structure qui est liée aux propriétés physiques et chimiques de la surface du substrat sur lequel elle est déposée. Bergkvist *et al.* ont étudié la structure de la Fn adsorbée sur des surfaces de mica, silice et silice méthylée par microscopie à force atomique à contact intermittent [129]. Sur les surfaces de silice, hydrophiles, la plupart des molécules (70 %) avaient une structure allongée avec des interactions de chaînes intramoléculaires partielles. En comparaison, pour les molécules adsorbées sur des surfaces hydrophobes et méthylées, une structure protéique compacte prédominait (70%). L'influence de la topographie de surface sur l'adhésion, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes en présence d'une couche de Fn adsorbée a été étudiée en utilisant des films minces de CaP. Les couches de Fn sur les films minces de CaP dotés d'une microstructure et d'une rugosité nanométrique ont donné lieu à une augmentation du nombre d'adhésions focales et à une différenciation cellulaire précoce améliorée [112]. Si la fibronectine stimule l'adhésion des cellules osseuses, une dénaturation de ces structures secondaires (changement de structure) ou une exposition différente de certains de ses sites peuvent être contre-productives. Ceci implique une forte dépendance à la structure (conformation) de la fibronectine plutôt qu'à sa quantité [130], [131]. Les changements de conformation de la Fn peuvent se produire à la surface d'un substrat. Ils sont plus importants dans le cas d'une liaison covalente que dans celui d'une adsorption. Il a ainsi été montré qu'une fibronectine adsorbée sur un verre hydrophile induisait une meilleure adhésion et un meilleur étalement de cellules endothéliales bovines par rapport à un verre hydrophobe fonctionnalisé de manière covalente par la Fn [131].

La fibronectine peut se présenter sous forme globulaire soluble circulant dans le sang à une concentration de 300 mg/L, mais également sous forme fibrillaire insoluble dans la matrice extracellulaire. Son point isoélectrique est d'environ 5,38.

C'est un dimère en forme de V d'une taille de 100 nm et d'un poids moléculaire de 450 à 500 kDa. Il s'agit d'une glycoprotéine dont les deux monomères sont liés par deux ponts disulfures (R-S-S-R) en leur extrémité C-terminale (Figure 17). Chaque monomère possède environ 2000 acides aminés qui sont organisés en cinq domaines reliés par des segments polypeptidiques (segments gris - Figure 17). Ces domaines sont constitués par la répétition d'une combinaison de modules de type I (45 acides aminés), II (60 acides aminés) et III (90 acides aminés). Ces trois modules sont composés majoritairement de feuillets- $\beta$  antiparallèles et de replis comme le montre la Figure 18.

Ces différents modules sont impliqués dans les liaisons avec les cellules (*cell binding domain*), et d'autres constituants tels que le collagène (*collagen binding domain*) ou encore l'héparine

qui est un anticoagulant (*heparin binding domain*). Ceci permettrait un maintien de la cohésion du système de la matrice extracellulaire (MEC). Le domaine d'interaction avec les intégrines (récepteurs transmembranaires) comprend la séquence RGD (arginine, glycine, acide aspartique) et un module répété de type III. Ce dernier favorise l'étalement cellulaire lorsqu'il est accompagné du motif RGD. Seul, il ne possède aucun rôle d'attachement par rapport aux intégrines [132].

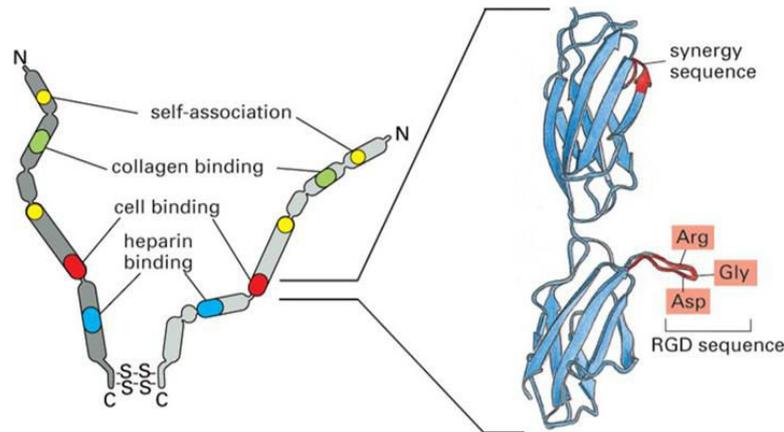


Figure 17 : Représentation schématique du dimère de fibronectine, mettant en avant les ponts disulfures reliant les deux monomères [132].



Figure 18 : Représentation des différents modules de la fibronectine [132].

### I.3.1.3. Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF pour *Vascular Endothelial Growth Factor*) stimule l'activité cellulaire par interaction avec trois récepteurs transmembranaires : le VEGF-R1, le VEGF-R2 et le VEGF-R3 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*). Deux de ces récepteurs, VEGF-R1 et VEGF-R2, sont exprimés par les cellules endothéliales. L'activité du VEGF-R1 assure le maintien des vaisseaux avec une forte affinité pour le VEGF, alors que le VEGF-R2 est impliqué dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales.

Des études *in vitro* ont montré l'efficacité d'une immobilisation du VEGF sur une matrice collagénique. En effet, la quantité des cellules endothéliales y était 1,5 plus élevée que sur le matériau de contrôle (adsorption de VEGF soluble) [133]. L'utilisation de molécules organiques intermédiaires appelées *spacers* telles que les dihydrazides d'acide adipique (C=ONHNH<sub>2</sub>) faisant le lien entre un agent de couplage (*cross linker*), le carbodiimide/NHS, et la protéine VEGF ont amélioré son accessibilité et donc l'établissement d'une liaison ligand / récepteur VEGFR [134]. Ainsi, le VEGF immobilisé a augmenté la prolifération des cellules endothéliales. Cette stratégie d'immobilisation ainsi que les anglicismes *spacer* et *cross linker* seront plus amplement explicités par la suite.

Dans le cadre des substituts osseux, le VEGF fait partie des facteurs de croissance angiogéniques qui pourraient favoriser la vascularisation d'un biomatériau poreux et donc l'amélioration de la formation de tissu osseux. Mais, à des concentrations locales élevées, le VEGF conduit à la formation de vaisseaux non fonctionnels et mal formés. Une libération régulée et continue de VEGF et à de faibles concentrations par des *scaffolds* pourrait influencer de façon positive l'ostéointégration de ces derniers. En effet, une biodisponibilité prolongée à de faibles concentrations permettrait la mise en place d'un réseau vasculaire dense et important afin d'améliorer l'apport en oxygène, nutriments, facteurs solubles et en cellules progénitrices ainsi qu'assurer l'évacuation des métabolites [135].

La famille des VEGFs est constituée de sept protéines : A, B, C, D, E, F et le PlGF (*Placental Growth Factor*). Chacune de ces protéines présente un mode de fonctionnement différent. Le VEGF-A est une des protéines de la famille VEGFs la plus étudiée car elle est connue comme étant un facteur de croissance majeur des cellules endothéliales.

Le VEGF-A peut être transcrit sous plusieurs formes dont les quatre isoformes majoritairement sont : VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> et le VEGF<sub>206</sub>. Ces formes de VEGF contiennent respectivement 121, 165, 189 et 206 acides aminés. Le VEGF<sub>165</sub> est l'isoforme dominant chez l'homme, celui-ci est donc couramment appelé VEGF (notation qui sera employée dans la suite du présent document). C'est l'isoforme impliqué dans la vascularisation du tissu osseux. Le VEGF<sub>189</sub> est considéré comme le facteur angiogénique le plus puissant et est impliqué dans la vascularisation de certains cancers. La séquence primaire du VEGF ainsi que les 165 acides aminés qu'il contient sont présentés en annexe 2.

La structure tridimensionnelle du VEGF (Figure 19) est un homodimère antiparallèle de 45 kDa constitué de deux monomères reliés par deux ponts disulfures. Chaque monomère est composé de sept feuillets- $\beta$  et de deux hélices- $\alpha$ . La région N-terminale du monomère est représentée par une hélice- $\alpha$ 1. Une région appelée « nœud à cystéine » fait également partie de la structure des monomères du VEGF. Elle est commune à de nombreux facteurs de

croissance et constituée de 6 cystéines qui forment des ponts disulfures entre les monomères. Le point isoélectrique d'un monomère est de 8,3 et sa taille d'environ 6 nm.

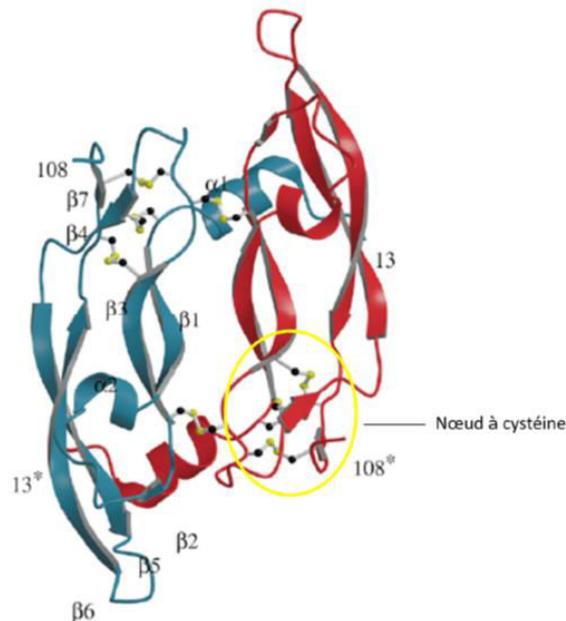


Figure 19 : Schéma représentant la structure tridimensionnelle du dimère du VEGF. Le monomère 1 est représenté en bleu et le monomère 2 en rouge, une des deux régions en nœud à cystéine est encerclée en jaune [136].

### I.3.2. Fonctionnalisation de surface de substituts osseux phosphocalciques

La fonctionnalisation de surface désigne l'optimisation et/ou l'ajout de biomolécule d'intérêt à la surface d'un substitut osseux dans le but d'améliorer sa biointégration. Plusieurs approches peuvent être adoptées afin de modifier la surface du biomatériau [137] et le rendre ostéoinducteur. Les différentes voies de fonctionnalisation sont l'adsorption directe d'une protéine ou l'établissement d'un lien chimique fort par immobilisation covalente de celle-ci à la surface du biomatériau.

#### I.3.2.1. Adsorption

L'adsorption est un phénomène de fixation de molécules (adsorbats) sur une surface solide (adsorbant). Les interactions mises en jeu entre l'adsorbat et la surface de l'adsorbant peuvent être classées en deux familles : l'adsorption physique (physisorption) qui implique des liaisons faibles de type Van der Waals entre la molécule et la surface et l'adsorption chimique (chimisorption) qui fait appel à des liaisons fortes (liaisons ioniques quelques centaines de kJ/mol). Ce paragraphe sera focalisé sur l'adsorption physique des protéines à la surface des substrats phosphocalciques.

L'hydroxyapatite est un matériau hydrophile, ce qui favorise, *in situ*, l'adsorption des protéines à sa surface permettant ainsi d'augmenter l'attachement des ostéoblastes [138]. Bien que l'adsorption, *ex situ*, de protéines ait été largement exploitée, le comportement des protéines au cours de leur adsorption reste complexe. En effet, l'adsorption de protéines sur une surface solide est un phénomène qui dépend de plusieurs paramètres tels que la structure des protéines ainsi que la quantité adsorbée en surface [139].

L'adsorption s'effectue généralement par une immersion du matériau dans une solution de protéine, Trois facteurs sont à prendre en compte : les propriétés intrinsèques de la protéine, les propriétés de surface du substrat et les interactions protéine-surface. Lors d'une adsorption les liaisons qui se forment entre une protéine et une surface sont des liaisons faibles : interactions de type Van der Waals (Debye : 0,02 à 0,5 kJ/mol, Keesom : 0,5 à 3 kJ/mol, London : 0,5 à 30 kJ/mol) ou liaisons hydrogènes (de 5 à 30 kJ/mol). Elles dépendent de la chimie de la surface du substrat (charges et fonctions de surface), des acides aminés présents dans la protéine, des liaisons intramoléculaires dans la structure native de la protéine, mais également du solvant utilisé (pH, force ionique, etc.). Il est également possible que la structure native (conformation) de la protéine visée bascule d'un état à un autre durant l'interaction établie avec la surface.

La Figure 20 représente les effets de l'adsorption d'acides aminés, possédant des charges différentes, à la surface de substrats en HA sur l'affinité de deux protéines : la BSA (*Bovine Serum Albumin*) et le lysozyme<sup>8</sup> (LSZ). La pré-adsorption d'arginine (Arg) et d'acide aspartique (Asp) qui ont respectivement des charges positives et négatives, modifie les charges de surface du substrat. L'HA pré-adsorbée par l'arginine présente une plus grande affinité envers la protéine BSA chargée négativement en raison de la présence des fonctions  $\text{NH}_3^+$  apportés par l'arginine. Cette dernière se lie aux ions  $\text{PO}_4^{3-}$  par ses fonctions  $\text{NH}_2^+$  diminuant ainsi le nombre de  $\text{PO}_4^{3-}$  libres en surface, laissant les ions  $\text{Ca}^{2+}$  libres et ajoutant des fonctions  $\text{NH}_3^+$ . L'HA pré-adsorbée par l'acide aspartique a montré une plus grande affinité pour le lysozyme chargé positivement. L'acide aspartique se lie aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  par ses fonctions  $\text{COO}^-$ . Cela diminue le nombre d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  présents en surface, laissant libres les sites  $\text{PO}_4^{3-}$  et ajoutant des fonctions  $\text{COO}^-$  disponibles pour interagir avec le lysozyme.

---

<sup>8</sup> Protéine globulaire d'une centaine d'acides aminés impliquée dans la défense contre les infections bactériennes.

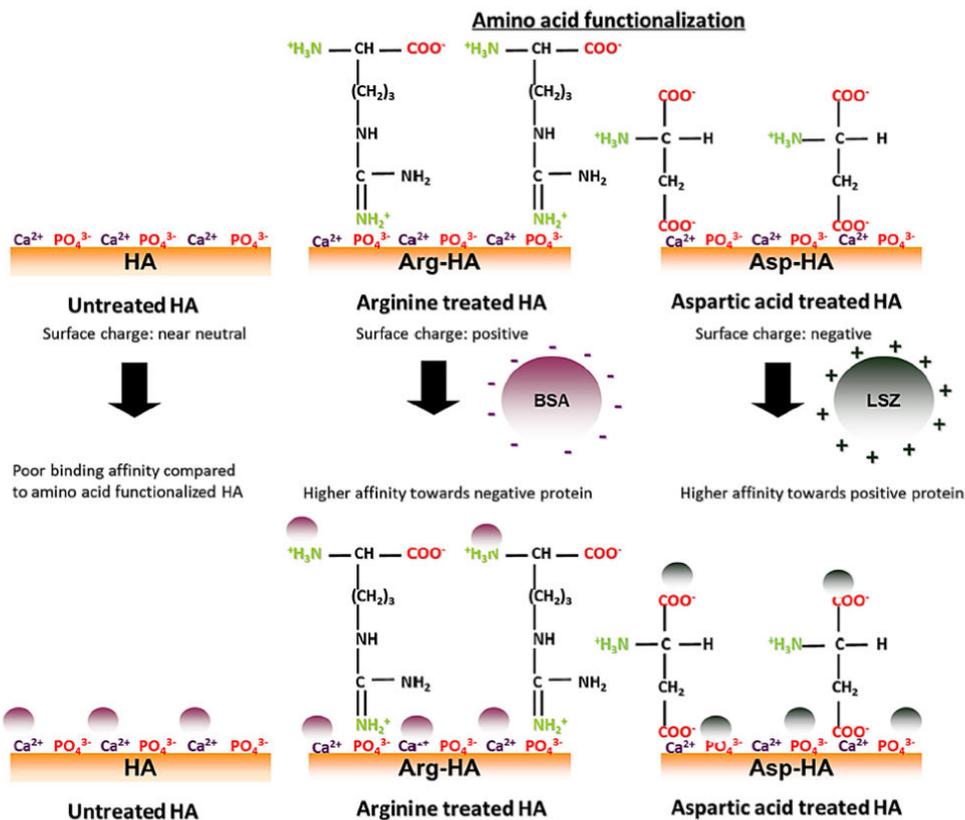


Figure 20 : De gauche à droite : adsorption de la BSA sur une surface HA native, adsorption de la BSA sur une surface HA pré-adsorbée par de l'arginine (Arg), adsorption de la lysozyme sur une surface HA pré-adsorbée par de l'acide aspartique (Asp) [140].

Ainsi, les ions de surface du substrat ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$ ) peuvent interagir avec les groupes fonctionnels chargés présents dans la protéine (fonctions amines, fonctions carboxyles) ou très riche en électrons (noyaux aromatiques) comme cela vient d'être illustré sur la Figure 20 [140], [141]. La chimie de surface du substrat a donc un impact essentiel. Par exemple, le taux d'adsorption de la protéine salivaire acide (PRP1, protéine riche en proline) a tendance à diminuer avec l'augmentation du taux de carbonates dans le cas d'hydroxyapatites carbonatées par rapport à une hydroxyapatite HA non substituée [142]. L'albumine de sérum bovin (BSA) est connue pour sa grande affinité pour l'hydroxyapatite [143]. Une étude menée par Zeng *et al.* [144] de la réponse des fonctions amides caractéristiques de la protéine par spectroscopie infrarouge a permis de mettre en évidence une plus grande affinité de la protéine pour des surfaces de phosphates de calcium par rapport à des substrats en titane oxydé en surface. Mais ces travaux montrent également qu'une grande quantité de BSA adsorbée à la surface des substrats phosphocalciques provoque un changement de la structure de la protéine contrairement au titane sur lequel l'adsorption est faible. D'autres travaux conduits par Xu *et al.* [145], ont montré que la concentration avait un impact. Le mode d'adsorption de la BSA sur une membrane de polyéthylène poreux (PE) a été étudié en fonction de la concentration des solutions d'imprégnation. Au-dessous d'une concentration

critique (environ 1000 ppm) l'adsorption semble se dérouler normalement, mais au-delà de cette concentration, les molécules de la BSA ont tendance à s'agglomérer avant de s'adsorber à la surface.

A pH neutre, les protéines basiques et les protéines acides portent respectivement des charges globales positives et des charges globales négatives. Ainsi, l'hydroxyapatite chargée négativement au pH de 7,4 en tampon PBS (pour *phosphate buffered saline*) a plus d'affinité pour des protéines basiques que pour des protéines acides [39]. Une diminution du pH pourrait donc conduire à une augmentation de l'adsorption des protéines acides.

Lors d'une adsorption, l'état déplié de la protéine subit une perte significative d'entropie, la protéine adopte alors un état replié (gain de la structure secondaire). Des surfaces présentant une hydrophobicité intermédiaire peuvent stabiliser cette structure. La structure secondaire d'une protéine telle que la fibronectine lors d'adsorption peut être expliquée par le fait que la chaîne polypeptidique a tendance à rester pliée sur une surface hydrophobe (Image b-Figure 21). En effet, le passage à l'état replié est principalement guidé par les interactions hydrophobes, la formation de liaisons hydrogène et les forces de Van der Waals. Cette structure secondaire pourrait être perturbée face à des surfaces hautement hydrophiles avec un état déplié de la protéine (Image a-Figure 21). En fonction du degré d'hydrophobicité de la surface, les protéines se comportent différemment : adsorbées et désagrégées, adsorbées et pliées ou bien adsorbées avec une faible agrégation [146]. La fibronectine peut adopter un comportement agrégé (adsorption de la fibronectine à 0,01 g/L durant 15 h) ou fibrilleux (adsorption de la fibronectine à 1 g/L durant 30 min) à la surface d'une céramique en HA [99]. En plus de ces paramètres, l'adsorption de la fibronectine semble également dépendre de la taille des grains et de la porosité [147].

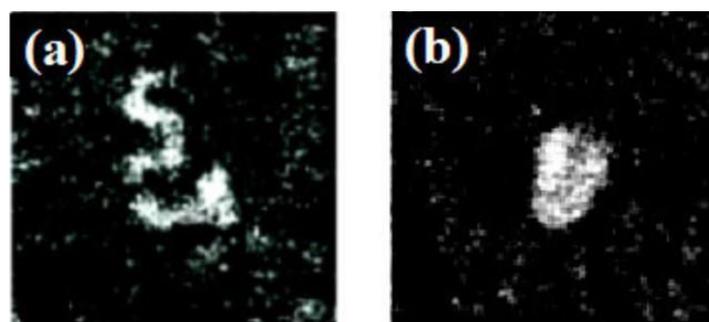


Figure 21 : Image AFM de fibronectine adsorbée sur (a) une surface hydrophile et sur (b) une surface hydrophobe. Chaque image représente un champ de 750x750 nm [129].

Midy *et al.* ont étudié l'influence de la surface spécifique sur l'adsorption du VEGF [148] laquelle augmente proportionnellement avec la surface spécifique. Avec une solution d'imprégnation à 5 µg/ml, la quantité adsorbée sur une hydroxyapatite stœchiométrique est

inférieure à celle adsorbée sur une hydroxyapatite carbonatée nanocristalline (2,54 % m de  $\text{CO}_3^{2-}$ ). En effet, avec une surface spécifique de  $16 \text{ m}^2/\text{g}$ , la poudre d'HA absorbe  $0,071 \mu\text{g}/\text{m}^2$  de protéine alors que la poudre de CHA absorbe  $0,463 \mu\text{g}/\text{m}^2$  de VEGF en ayant une surface spécifique de  $156 \text{ m}^2/\text{g}$  [148]. Cette affinité du VEGF pour la CHA peut s'expliquer par les différences de composition et/ou de morphologie entre HA et CHA. Les cristaux de la CHA présentent des groupements phosphates et carbonates probablement localisés à la surface du cristal. De plus, la CHA présente une surface spécifique très élevée avec des grains d'une taille nanométrique, ce qui pourrait favoriser cette forte adsorption. Cependant, Midy *et al.* n'ont pas tenu compte des charges de surface des poudres d'HA et de CHA (charges similaires ou non). Ce paramètre pouvant avoir une influence sur l'adsorption des protéines.

Lode *et al.* ont étudié la libération de VEGF humain recombinant (VEGF<sub>165</sub>) après adsorption sur un ciment à base de phosphate de calcium [149]. Les résultats montrent une forte affinité du VEGF pour le ciment, seulement 2,5 % m du VEGF adsorbé initialement (400 ng) ont été détectés dans les solutions de rinçage. Le VEGF adsorbé a ensuite été libéré progressivement au cours d'une période de 7 jours. Un test de prolifération utilisant des cellules endothéliales a révélé un maintien de l'activité biologique du VEGF après sa libération par le ciment. Dans le cas des ciments modifiés à la phosphosérine<sup>9</sup>, l'efficacité biologique du VEGF libéré était même supérieure à celle du VEGF témoin non libéré. La modification par la phosphosérine peut favoriser l'activation de l'angiogenèse par l'administration de VEGF [149]. Le taux d'adsorption du VEGF ont également été étudié sur une hydroxyapatite mésoporeuse (SSA =  $208 \pm 13 \text{ m}^2/\text{g}$ , taille des pores =  $15,35 \pm 1,70 \text{ nm}$ ) [150]. L'HA a adsorbé 35 % m du VEGF (50 ng), le VEGF a ensuite été libéré progressivement en solution pendant 20 jours. Ces apatites chargées en VEGF ont pour finalité une amélioration de la vascularisation des substituts osseux.

Les protéines adsorbées sont initialement retenues à la surface par des forces faibles et en fonction de l'environnement de l'implant, elles peuvent se désorber de la surface d'une manière incontrôlée pour interagir avec les cellules [134]. L'immobilisation de protéines par liaison chimique forte (covalente) à la surface d'un substrat peut augmenter le contrôle des interactions cellules-biomatériaux [134], [151]. La liaison covalente est établie entre les fonctions chimiques présentes dans la biomolécule et le substrat. Ce type d'immobilisation doit permettre de contrôler la quantité de la protéine présente à la surface et éviter une libération rapide incontrôlée lors d'une simple adsorption de protéine. De plus, cette approche apparaît

---

<sup>9</sup> Phosphosérine : dérivé phosphorylé de la sérine (acide aminé) qui permet de modifier la structure d'une protéine en activant ou en inhibant ses fonctions.

pertinente lorsque les surfaces spécifiques des substituts osseux sont faibles, ce qui est le cas des céramiques denses.

### I.3.2.2. Immobilisation covalente

La fonctionnalisation des substrats céramiques inorganiques par ancrage de molécules organiques à leur surface est une des méthodes développées afin de contrôler les interactions cellule-matière et protéine-matière et d'augmenter la biocompatibilité d'un matériau. Elle permet d'établir des liaisons covalentes fortes (plusieurs centaines de de kJ/mol) entre une biomolécule d'intérêt (ici des protéines) et la surface d'un substrat.

Cette fonctionnalisation par ancrage nécessite l'utilisation de molécules organiques intermédiaires (Figure 22) qui permettent d'établir ce lien chimique fort substrat/protéine, de contrôler la densité surfacique et la cinétique de la libération des protéines. En effet, afin de pouvoir immobiliser des protéines, il est impératif que le substrat présente à sa surface des fonctions chimiques appropriées (fonctions amines (-NH<sub>2</sub>) ou acides carboxyliques (-COOH)) capables d'engager une liaison covalente soit directement avec la protéine d'intérêt soit avec un intermédiaire. Un matériau qui ne présente pas ces fonctions, nécessite au préalable un traitement de surface comme par exemple une silanisation (le silane utilisé est alors appelé *cross linker*) qui apporte la ou les fonctions requises à sa fonctionnalisation. Une deuxième étape sera l'ajout d'une molécule di-fonctionnelle (*spacer*) nécessaire à l'établissement du lien entre le silane et la protéine. La fonctionnalisation de surface comporte alors une phase inorganique, le substrat et une phase organique qui regroupe le *cross linker*, le *spacer* et la protéine d'intérêt. L'adsorption des protéines sera limitée ou réduite par rinçage après fonctionnalisation.

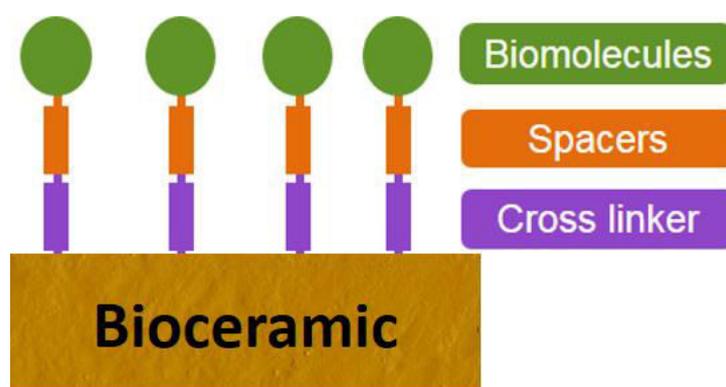


Figure 22 : Principe général de l'immobilisation covalente d'une biomolécule d'intérêt à la surface d'une céramique.

### **I.3.2.2.1. Phase inorganique**

Les propriétés de surface du substrat jouent un rôle primordial sur la fonctionnalisation de celle-ci, leurs modifications offrent des possibilités pour contrôler l'interaction avec la phase organique. La morphologie, la composition chimique, la cristallinité, la solubilité ainsi que la charge de surface font partie des propriétés les plus impliquées dans la fonctionnalisation. Parmi les matériaux fonctionnalisables pour des applications en substituts osseux, on trouve : l'alumine, la zircone, le titane et les phosphates de calcium.

Les matériaux à fonctionnaliser peuvent se présenter sous différentes formes et microstructures. On retrouve des particules colloïdales avec des tailles allant du nanomètre au micromètre. Les nanoparticules de silice mésoporeuse ou de phosphates de calcium sont par exemple étudiées pour la délivrance des médicaments du fait de leur stabilité en milieux physiologiques [152]. Des implants massifs poreux (*scaffolds*) qui permettent grâce à leur porosité interconnectée une migration cellulaire, une vascularisation et une croissance osseuse sont également étudiés. Le but de la fonctionnalisation de ce type de substrat est d'obtenir des réponses biologiques spécifiques en contrôlant le comportement cellulaire. La fonctionnalisation par la BMP-2 a notamment été réalisée sur des *scaffolds* en alumine [153] et en phosphates de calcium [154]. Les membranes à base d'alumine, de zircone ou de silice présentent une stabilité chimique et mécanique élevée et sont peu coûteuses. Les membranes d'alumines s'avèrent être parmi les meilleurs candidats pour l'immobilisation covalente de cellules, d'enzymes ou d'anticorps car elles possèdent une bonne résistance aux solvants organiques et une porosité uniforme [155].

### **I.3.2.2.2. Phase organique**

Plusieurs études ont été menées sur la modification de surface par des silanes et/ou des polyéthylène glycol (PEG) pour des matériaux en hydroxyapatite [156], en titane [157], en silice [158], en oxydes métalliques [159] et en alumine [160]. Bien qu'ils soient moins étudiés que les silanes, les composés organophosphorés présentent un grand intérêt en tant que *cross linker* dans la modification de surface des oxydes métalliques [161], [162]. La plupart des protocoles de fonctionnalisation de surface par une biomolécule d'intérêt sont basés sur approche multi-étapes « *grafting from* » impliquant trois étapes successives allant du substrat à la biomolécule d'intérêt. La première étape est l'étape clé de la fonctionnalisation et sert à faire un lien organique/inorganique. Cette étape est abordée plus en détail dans le paragraphe suivant.

## a) Silanisation

La modification initiale de surface par un *cross linker* silane est la technique la plus utilisée pour fixer des groupes fonctionnels sur des surfaces inorganiques. Les silanes sont utilisés comme des modificateurs interfaciaux. La silanisation est une technique simple, peu coûteuse et applicable à différents types de matériaux : particules colloïdales, matériaux poreux, surfaces planes, des matériaux composites renforcés par des polymères [163].

Un organosilane est un composé de formule générale  $R_nSiX_{(4-n)}$  ( $n = 1, 2, 3, 4$ ) où X désigne un groupement hydrolysable (alcoyle, halogénure, carboxylate) et R un groupement organique non hydrolysable. Le terme "fonctionnalité" qualifie le nombre de groupements hydrolysables autour de l'atome du silicium qui peut donc aller de 1 à 4. La Figure 23 présente les organosilanes couramment rencontrés dans la littérature pour la modification de surface. La fonction portée par la chaîne non hydrolysable permet d'entrevoir différents types de chimie. Le recouvrement de la surface du substrat après silanisation dépend de la nature de l'organosilane utilisé.

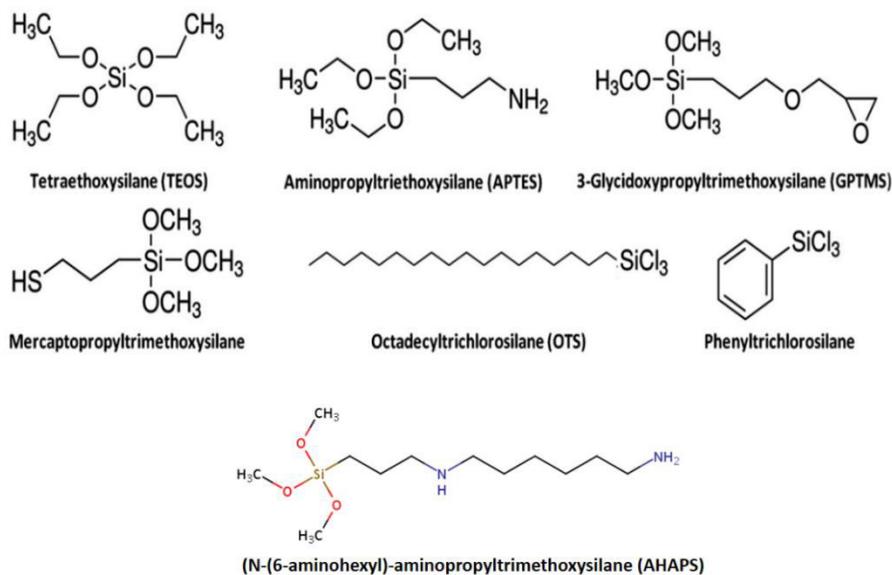


Figure 23 : Exemples d'organosilanes couramment utilisés pour la modification de surface [155].

Lors d'une silanisation de surface en milieu aqueux, l'hydrolyse des fonctions alcoyles de l'organosilane conduit à la formation de silanols réactifs. Une fois cette première étape terminée, les silanols se condensent pour former des oligomères hyperbranchés tridimensionnels *via* des liaisons siloxanes (Si-O-Si), (Figure 24-carré vert). Cette réaction intramoléculaire est appelée homocondensation. La formation d'un réseau tridimensionnel est obtenue dans le cas d'organosilanes multifonctionnels, ainsi l'homocondensation sera conditionnée par le nombre de bras hydrolysables et disponibles.

Une réaction de condensation peut également se produire à la surface d'un substrat porteur de groupements OH. Il s'agit d'une réaction appelée hétérocondensation (réaction entre une partie organique (silanols) et une partie inorganique (OH du substrat)) (Figure 24 - *step II*). Cette réaction conduit à la formation d'une liaison covalente stable M-O-Si où M représente un élément chimique existant dans la structure du substrat et portant les groupements OH de surface. Cette réaction s'accompagne aussi de la libération d'alcools libres en tant que produits secondaires.

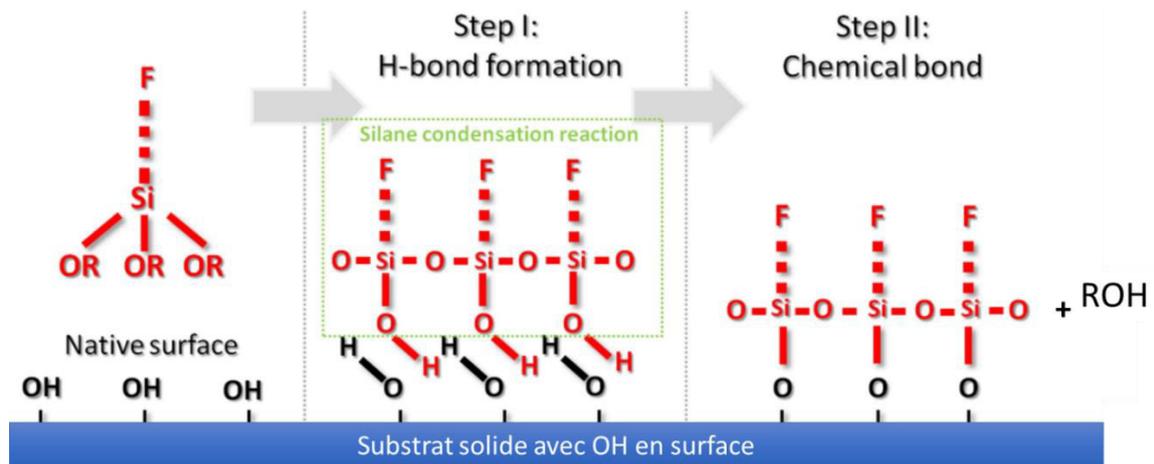


Figure 24 : Silanisation d'un substrat solide présentant des fonctions OH disponibles en surface [155].

La silanisation sera fortement influencée par le silane et le substrat. La plupart des études utilisant la silanisation comme première étape de modification de surface ont été effectuées avec le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) [154], [164], [165], [166], [69], [167], [168], [169], [170], [171], [172]. L'intérêt de l'APTES réside dans ses groupes fonctionnels -NH<sub>2</sub> qui seront utilisés ultérieurement pour réagir avec des groupements spécifiques comme par exemple les aldéhydes. La silanisation par de l'APTES de wafers de silicium a permis de mettre en évidence un recouvrement multicouche de la surface et la présence d'hétérogénéités (amas) [173]. Bien que l'assemblage moléculaire soit meilleur dans le cas de l'AHAPS (N-(6-aminohexyl)-aminopropyltriméthoxysilane) par rapport à l'APTES, le repliement ou le retournement de la molécule de silane affecte de manière significative l'accessibilité des groupes amines et par conséquent, la possibilité de liaison ultérieure des biomolécules.

Cependant, Poli *et al.* ont pu quantifier les groupements amines disponibles à la surface des substrats en HA et en SiHA (silanisation en milieu anhydre) par une méthode photométrique UV-Vis. Ils ont ainsi montré que la densité d'APTES sur des substrats denses phosphocalciques était de  $8 \cdot 10^{-20}$  mol/ $\mu\text{m}^2$  dans le cas de l'HA et  $10 \cdot 10^{-20}$  mol/ $\mu\text{m}^2$  pour SiHA [171].

## b) Ajout d'un *spacer* et immobilisation d'une biomolécule

La silanisation est suivie par l'ajout d'un *spacer* (molécule bi-fonctionnelle) afin d'avoir deux réactions spécifiques c'est-à-dire silane-*spacer* et *spacer*-biomolécule. Les stratégies les plus utilisées pour l'immobilisation covalente de peptides et de protéines sont basées sur la chimie du glutaraldéhyde (GA) [174], [175], [172], [176], [177] ou des carbodiimides EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide) [154], [178], [179], [180], [181].

La Figure 25 illustre les trois étapes impliquées dans la fixation d'une biomolécule (protéine ou enzyme) sur des supports inorganiques. La première étape consiste en une silanisation de surface par l'APTES (Figure 25-I). Ensuite le glutaraldéhyde utilisé comme *spacer* est fixé sur l'APTES (Figure 25-II). Les liaisons silane-GA et GA-biomolécule (Figure 25-III) se font par des réactions successives de condensation entre les fonctions aldéhydes du GA et les fonctions amines du silane puis de la biomolécule. La réaction entre le GA et la biomolécule met en évidence une fonction imine (N=C) (Figure 25-IV).

La Figure 26 présente une autre approche d'immobilisation covalente de biomolécule par un système carbodiimide (EDC) / N-hydroxysuccinimide (NHS). La fonctionnalisation commence d'abord par une préparation de la biomolécule par une réaction entre l'EDC et le groupe carboxylique (-COOH) de la biomolécule (Figure 26-I), ensuite le NHS réagit avec l'EDC pour donner un ester NHS réactif (Figure 26-II). Enfin, le NHS ester réagit avec une surface silanisée à terminaison amine (Figure 26-III), formant une liaison amide stable et permettant l'immobilisation de biomolécules (Figure 26-IV).

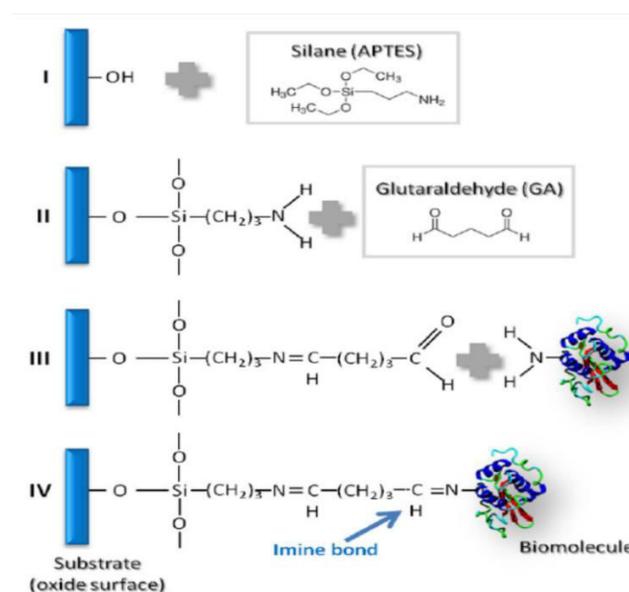


Figure 25 : Fonctionnalisation de surface utilisant le glutaraldéhyde comme molécule bi-fonctionnelle [155].

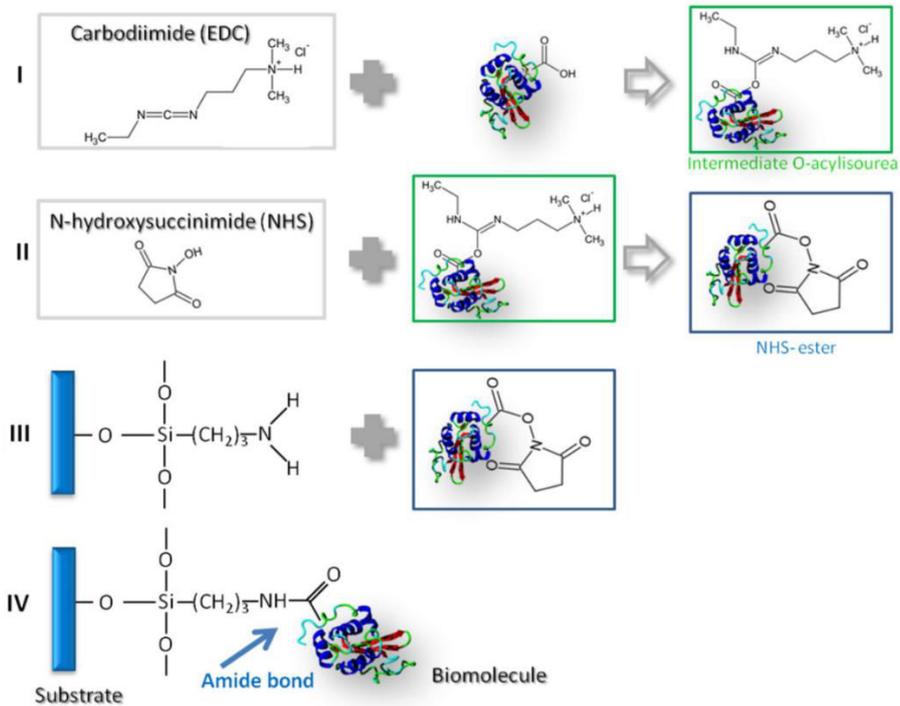


Figure 26 : Approche de fonctionnalisation EDC/NHS [155].

D'autres *spacers* sont également utilisés comme par exemple l'ester de bis-N hydroxysuccinimide d'acide subérique [169], l'héparine [182] ou bien le SMP (N-succinimidyl-3-maléimidopropionate) [165], [183], [170] qui est caractérisé par la présence d'une fonction maléimide externe pouvant réagir avec le groupement thiol des cystéines présentes dans une protéine. C'est cette dernière approche qui est illustrée sur la Figure 27, présentant la stratégie adoptée par Durrieu *et al.* pour l'immobilisation de peptides linéaires et cycliques sur des substrats à base de phosphates de calcium [164]. Après silanisation par l'APTES (Figure 27-1) puis ajout du SMP (Figure 27-2), les auteurs ont fait réagir la double liaison C=C du groupe maléimide avec le groupe thiol (R-SH) de la cystéine terminale (seul acide aminé à avoir ce groupement SH) présente dans les séquences peptidiques RGD cycliques et linéaires utilisées (Figure 27-3).

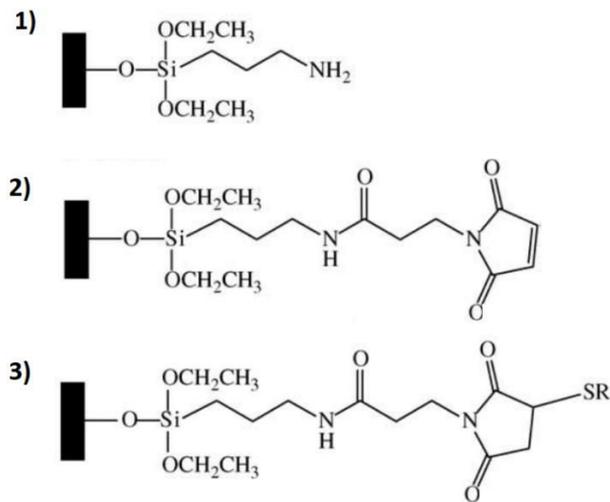


Figure 27 : Fonctionnalisation d'une surface en hydroxyapatite par un peptide RGD, 1) silanisation de surface, 2) ajout d'un SMP (N-succinimidyl-3-maléimidopropionate) et 3) immobilisation du peptide par réaction Maléimide-SH [164].

Dans le cas de l'immobilisation de protéine ne contenant pas de cystéine libre c'est-à-dire toutes les cystéines sont reliées entre elles par des ponts disulfures et donc aucun groupement thiol n'est disponible pour réagir avec une fonction maléimide, une thiolation de la protéine par chimie click est nécessaire [184]. Le réactif de Traut réagit avec les amines primaires pour former des thiols selon l'équation sur la Figure 28. Le couplage thiol-maléimide sera favorisé en milieu anhydre (par exemple en présence de diméthylsulfoxyde DMSO). En effet, en milieu aqueux et au-delà d'un pH de 8, les fonctions maléimides peuvent réagir avec les amines primaires de l'arginine ou de la lysine plutôt qu'avec le groupe thiol [185].

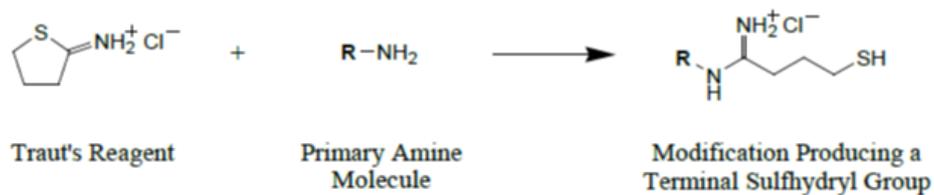


Figure 28 : Réaction de thiolation d'amine primaire utilisant le réactif de Traut (fiche Thermo Fisher Scientific).

#### I.4. Mise en évidence des interactions protéines-substrats et suivi de fonctionnalisation

La mise en évidence des interactions physiques et chimiques entre des biomolécules d'intérêt et la surface de substrats nécessite l'utilisation d'outils de caractérisation spécifiques. Ce paragraphe va décrire les différentes techniques de caractérisation utilisées et plus particulièrement la spectroscopie de force et l'imagerie Raman.

### I.4.1. Interactions physiques protéines-substrats

La microscopie à force atomique (AFM pour *atomic force microscopy*) appartient à la famille des microscopies en champ proche (SPM pour *scanning probe microscopy*) qui repose sur un même principe : le balayage d'une surface par une sonde physique afin de mesurer les interactions entre une pointe et la surface de l'échantillon analysé. Basée sur les forces de répulsion/attraction entre la surface et la pointe, la microscopie à force atomique connaît de nombreuses applications : topographies, mesures électriques ou magnétiques, *etc.* Au fil des années, l'AFM est devenu un outil fiable pour sonder les propriétés mécaniques statiques et dynamiques de matériaux mous avec une grande résolution offrant à cette technique de nombreux champs d'application pour l'étude de la mécanique des cellules vivantes [186]. Par exemple, l'AFM permet d'obtenir des informations sur la morphologie et réaliser des mesures d'élasticité sur les cellules (évaluation de la rigidité) [187].

#### I.4.1.1. Principe général de l'AFM

En microscopie à force atomique, une sonde extrêmement fine est fixée sur un levier de 100 à 200  $\mu\text{m}$  appelé *cantilever* et est montée sur un scanner à céramiques piezo-électriques (PZT). La Figure 29 représente le principe général de l'AFM et des images par microscopie électronique à balayage (MEB) d'une pointe AFM associée à son cantilever.

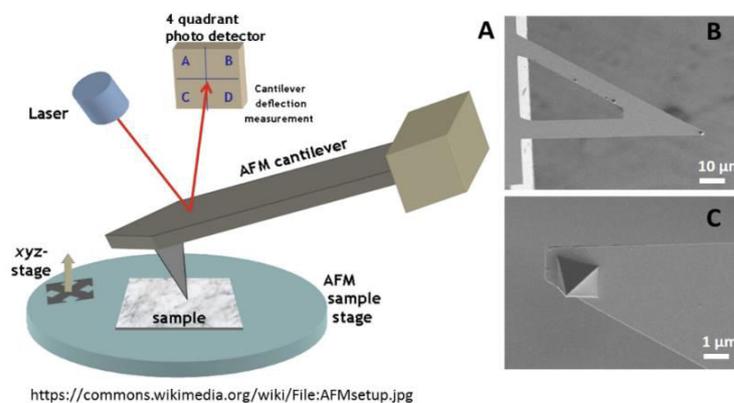


Figure 29 : A) Schéma du principe général d'un microscope à force atomique, B) images MEB d'un *cantilever* et C) d'une pointe AFM.

Il s'agit de détecter des forces inter-atomiques (forces électrostatiques, de Van der Waals, de friction, *etc.*) s'exerçant entre cette pointe, accrochée sur un *cantilever* de constante de raideur fixe, et la surface du substrat. Les forces agissant sur la pointe vont fléchir le *cantilever* soit vers le bas (forces attractives), soit vers le haut (forces répulsives). La mesure s'effectue de la manière suivante : un faisceau laser focalisé à l'extrémité de la face arrière du cantilever est réfléchi puis collecté sur une photodiode qui convertit la position du spot laser en une tension. La photodiode est découpée en quatre quadrants A, B, C, D (Figure 29). La répartition globale

du spot laser est mesurée sur les différents quadrants : la répartition de l'intensité lumineuse entre la partie haute (signal AB) et la partie basse (signal CD) renseigne sur la position verticale du spot et donc la déflexion du *cantilever*. La répartition de l'intensité lumineuse de la partie gauche (signal AC) à la partie droite (signal BD) indique la position latérale du spot et permet de déterminer la torsion du cantilever laquelle traduit les forces de frictions qui s'exercent entre la pointe et la surface lors du balayage. La sensibilité des photodiodes permet de déterminer des déflexions très faibles de l'ordre de 0,1 nm.

Les modes de fonctionnement les plus utilisés en AFM sont le mode contact et le mode intermittent (Figure 30).

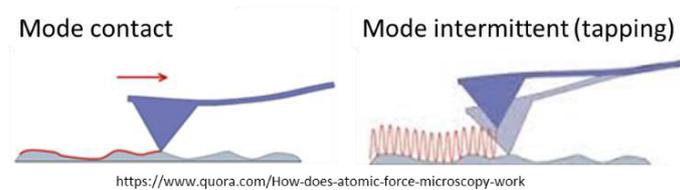


Figure 30 : Modes de fonctionnement d'un AFM.

En mode contact, la pointe balaye la surface à imager tout en restant en contact avec celle-ci et les mouvements de la pointe sont détectés par la déflexion du cantilever. Une valeur de tension de consigne (*setpoint*) correspondant à une force d'appui est fixée par l'utilisateur. Une boucle de rétroaction ou d'asservissement permet au scanner de déplacer verticalement la pointe sur chaque point de la surface tout en respectant la consigne. Ce mode présente quelques inconvénients : les forces de friction entre la pointe et la surface risquent d'endommager l'échantillon et/ou la pointe et donc limiter l'observation d'objets simplement déposés en surface. En effet, ces derniers sont susceptibles de bouger sous l'effet des forces de friction. Cependant, ce mode est très souvent utilisé pour des variations en Z de l'ordre de 0,01 nm et un balayage plus rapide de la surface.

Dans le cas du mode intermittent (mode *Tapping*), la pointe oscille à une fréquence élevée (par rapport à la fréquence de balayage) au voisinage de la surface à étudier. La pointe ne touche donc la surface que par intermittence et le signal enregistré représente la variation d'amplitude de l'oscillation.

#### I.4.1.2. Spectroscopie de force

La spectroscopie de force est une des applications de l'AFM. Elle permet de mesurer les forces d'interaction faibles (10 pN à 100 nN) entre la pointe AFM et la surface de l'échantillon avec une résolution spatiale allant jusqu'à l'Ångstrom.

Les courbes force-distance obtenues sont enregistrées à partir de la déflexion du cantilever en fonction du déplacement vertical Z du scanner piézo-électrique lors d'une approche-retrait de la pointe en un point de la surface du substrat. La Figure 31 représente une courbe force-distance. Au début l'ensemble pointe-cantilever est descendu par le scanner PZT vers la surface de l'échantillon avec une déflexion nulle du cantilever (étape A). Lorsque la pointe s'approche de la surface, le cantilever subit une déflexion progressive vers le bas sous l'effet des forces attractives de Van der Waals. Ces forces donnent lieu alors à un premier point de contact (étape B). Le scanner continue à descendre l'ensemble pointe-*cantilever*, ce dernier fléchit (étape C) jusqu'à atteindre la force (tension de consigne) fixée par l'utilisateur. Après un certain temps de contact, le scanner prend le chemin inverse et éloigne la pointe du matériau mais celle-ci reste accrochée à la surface du substrat à cause de la force d'adhésion qui s'exerce entre la pointe et la surface de l'échantillon. Cela provoque une déflexion du *cantilever* (étape D). L'étape E met en évidence le phénomène d'adhésion sur le matériau correspondant à l'observation d'un pic sur la courbe de retour. L'amplitude du pic représente alors la force d'adhésion. La pointe finit par se séparer brutalement de la surface « *pull-off* » (E = arrachement) et le cantilever revient à une déflexion nulle.

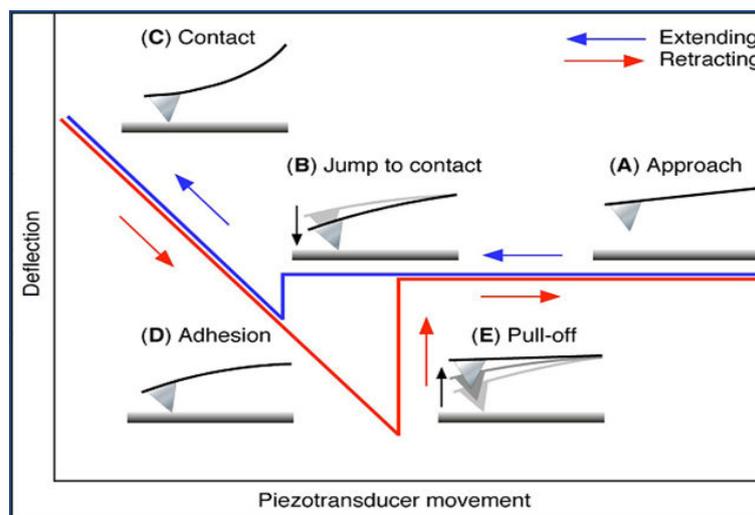


Figure 31 : Exemple d'une courbe force-distance [99].

La détermination du coefficient de sensibilité ainsi que de la constante de raideur du *cantilever* permet de remonter à la force d'interaction en utilisant la formule de Hooke :

$$F = k \times \alpha \times d$$

Avec,

F : force d'adhésion en N ;

k : constante de raideur de la pointe en N.m<sup>-1</sup> ;

$\alpha$  : coefficient de sensibilité de la mesure en m.V<sup>-1</sup> ;

d : déflexion du cantilever en V.

### I.4.1.3. Apport de la spectroscopie de force à l'étude des matériaux biologiques

La spectroscopie de force est une technique couramment utilisée afin d'obtenir des informations sur le repliement des protéines [188], [189] ou l'adhésion cellulaire [190], [191], [192].

L'affinité des protéines pour un substrat donné est mesurée en spectroscopie de force à l'aide d'une pointe fonctionnalisée par la protéine ou un assemblage de protéines. La pointe est d'abord approchée à la surface, puis rétractée, les biomolécules sont alors éloignées de la surface et étirées. La force est alors mesurée par la déflexion du *cantilever*. L'éloignement de la pointe de la surface peut éventuellement induire un dépliement des biomolécules comme illustre la Figure 32. Ces courbes de force impliquent des phénomènes de changement de conformation comme l'élongation, le dépliement ou la relaxation d'une protéine.

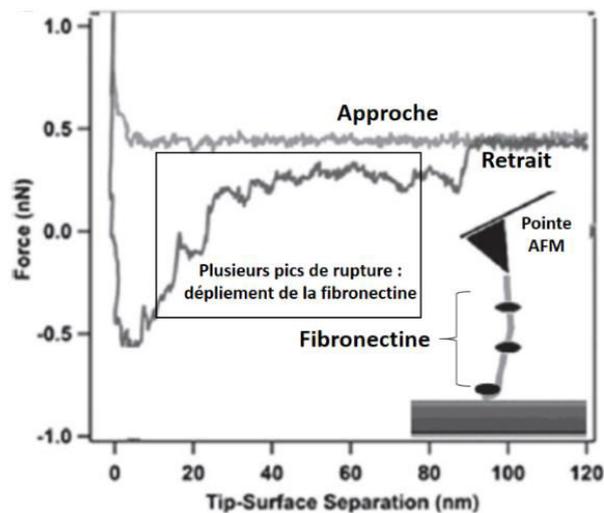


Figure 32 : Exemple d'une courbe de force (approche et retrait) entre une pointe fonctionnalisée par la fibronectine et un polymère polypyrrole (PPy) illustrant le phénomène de dépliement de la fibronectine [193].

De nombreuses études traitent de l'adhésion cellulaire en particulier à la surface de matériaux destinés à être implantés, c'est pourquoi plusieurs travaux portent sur la fibronectine et l'ostéopontine, protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire. Les travaux de Pietak *et al.* ont permis de déterminer les forces d'interactions entre l'ostéopontine et des biocéramiques à base de phosphate tricalcique stabilisé par du silicium (Si-TCP). Les résultats ont mis en évidence des forces de l'ordre de 2,5 nN [194].

Plus récemment, Gelmi *et al.* ont étudié les interactions et quantifié l'adhésion entre de la fibronectine, greffée sur une pointe AFM, et des films de polypyrrole (PPy) dopé avec des

glycosaminoglycanes (GAG) tels que le sulfate de chondroïtine (CS), l'acide hyaluronique (HA) et le sulfate de dextran (DS), connus pour avoir une certaine affinité pour la fibronectine [193]. Les images AFM force-volume réalisées sont présentées en Figure 33. Les images AFM de PPy/CS (Figure 33-A) et PPy/HA (Figure 33-B) montrent une différence dans la force et la distribution de l'adhésion des protéines. Le PPy/CS présente une force d'adhésion supérieure à celle du PPy/HA. Cela est dû à l'uniformité du dopage CS dans tout le polymère qui favorise une densité de liaison plus élevée. Ces images AFM force-volume ont permis de confirmer l'implication des dopants GAG dans l'adhésion de la Fn et montrent en outre que le type de dopant et les différences dans leur distribution spatiale affectent les forces d'adhésion des protéines.

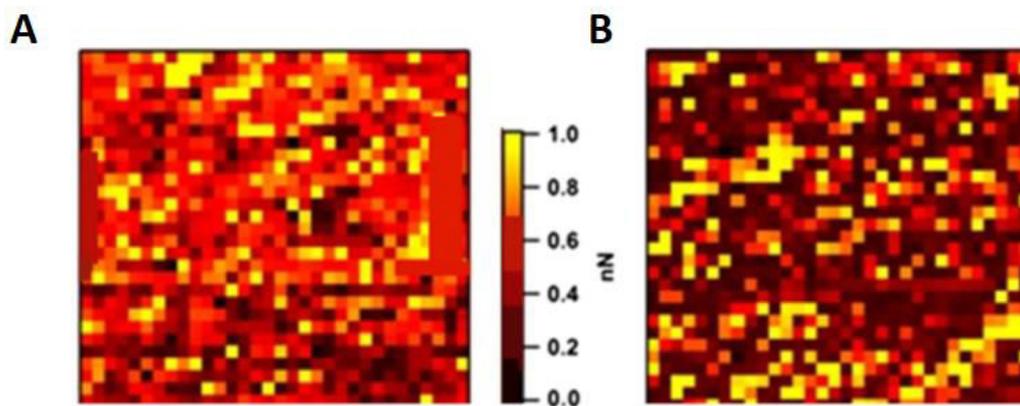


Figure 33 : Images AFM force-volume obtenues sur des films de polypyrrole (PPy) dopés avec A) le sulfate de chondroïtine (CS) et B) l'acide hyaluronique (HA). Les images AFM force-volume ont été effectuées en milieu PBS (*Phosphate-buffered saline*) sur des zones  $500 \times 500 \text{ nm}^2$  avec une résolution de  $32 \times 32$  courbes de forces, l'échelle en couleur est en nN [193].

Une autre approche consiste à étudier la répartition des protéines comme l'illustre les travaux de Dupont et Jacquemart [195]. Des couches de collagène, montrant une structure fibrillaire de dimensions nanométriques ont été obtenues par adsorption de collagène sur du polystyrène (PS), suivie d'un séchage à faible débit. La forme fibrillaire observée sur les images AFM topographiques a également été observée sur la carte d'adhésion obtenue dans l'eau (Figure 34). Aucune adhésion ou une très faible adhésion a été observée sur les fibres de collagène, alors qu'une adhésion plus élevée a été enregistrée dans les trous des fibres. Les mesures de force entre la pointe et la surface du polystyrène indiquent une adhésion de 1,9 nN, alors qu'il n'y a pas d'adhésion entre la pointe et le collagène (0,33 nN). Cela met en lumière une hétérogénéité de la surface d'un point de vue chimique et physique.

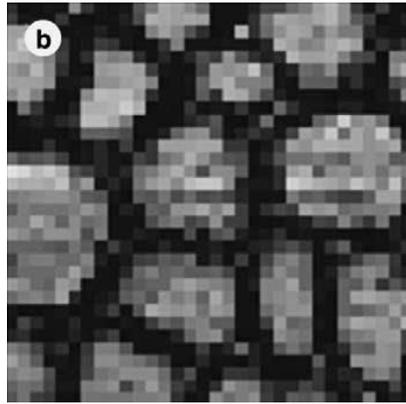


Figure 34 : Image AFM force-volume d'une couche de collagène adsorbée à la surface de polystyrène dans l'eau sur des zones de  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$  avec une résolution de  $32 \times 32$  courbes de forces, une échelle de hauteur en gris indique une force maximale de 1,5 nN [195].

Agapov *et al.* ont étudié l'influence concentration/rugosité sur les forces d'adhésion. Pour ce faire, ils ont effectué des mesures de forces entre différents tensioactifs fluorés et un copolymère en latex ayant une rugosité très faible (7 à 12 nm) [196]. Les images AFM force-volume réalisées sur des surfaces de  $40 \times 40 \mu\text{m}^2$  ont permis de mettre en évidence des zones de fortes et faibles adhésions avec des formes plus ou moins circulaires. L'adhésion semble augmenter en fonction de la concentration des solutions des tensioactifs fluorés (80, 160, 250 et 400 ppm). A l'inverse pour des échantillons similaires de rugosité inférieure à 7 nm l'adhésion semble uniforme quel que soit la concentration du tensioactif fluoré.

Comme nous l'avons vu, la fibronectine peut adopter différentes conformations en solution et influencer sur l'adhésion des ostéoblastes en fonction de sa concentration. Matsui *et al.* ont réalisé des images AFM de la surface de substrats en HA, la zone scannée étant de  $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ . Les résultats montrent qu'à faibles concentrations (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) les molécules de fibronectine adhèrent plus fortement et présentent une structure compacte (structure granulaire) alors qu'à des concentrations plus élevées entre (5 et 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), la structure est fibrillaire [197]. Ces observations suggèrent que la concentration en fibronectine influence sa structure et donc l'adhésion des cellules par la suite. Le contrôle du gradient de concentration en fibronectine est donc important pour la régulation des interactions entre biomatériaux et cellules.

Les études portant sur la distribution de la fibronectine surfacique ont été menées par Gonzalès-Garcia *et al.* avec différentes concentrations de fibronectine (2, 5, 10 et 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La répartition de la fibronectine à la surface nanométrique préparée à partir de polymères (acide polylactique et polystyrène) a été suivie par AFM [198]. Les résultats ont montré qu'une concentration élevée de la solution de fibronectine conduisait à une distribution uniforme de la protéine sur toute la surface.

La spectroscopie de force trouve également de nombreuses applications en biologie : évaluation des propriétés mécaniques des cellules [199], étude des cellules cancéreuses *etc.* Par exemple, Wang *et al.* ont montré avec une pointe fonctionnalisée par un anticorps CXCR4, qu'une cellule cancéreuse possède un module d'Young différent de celui des cellules saines, ce qui engendre des propriétés structurales et mécaniques différentes [200]. D'autres travaux réalisés sur des cellules neuronales ont mis en évidence une augmentation du module d'élasticité lorsque la cellule est en phase d'extension par rapport à une phase de non-activité [201].

#### **I.4.2. Suivi de fonctionnalisation de matériaux hybrides inorganiques/organiques**

Le suivi de la fonctionnalisation des matériaux hybrides inorganiques/organiques par des techniques d'imagerie a pour objectif dans notre cas, la mise en évidence de la partie organique. Dans le cas d'une fonctionnalisation multi-étapes, l'imagerie en fluorescence ou vibrationnelle permet d'accéder à la répartition spatiale des molécules organiques intermédiaires de fonctionnalisation (*cross linker* et *spacer*) et de la protéine immobilisée sur une surface plus large comparée aux surfaces étudiées en microscopie à force atomique (AFM). De plus, l'imagerie en fluorescence ou vibrationnelle fournit une réponse chimique (caractérisation chimique) contrairement à l'imagerie par AFM qui dans notre cas est utilisé comme un outil permettant de caractériser plutôt la morphologie de la surface (caractérisation physique).

Parmi les techniques permettant un suivi de fonctionnalisation on notera : l'imagerie en fluorescence, l'imagerie par spectroscopie infrarouge et l'imagerie Raman.

##### **I.4.2.1. Imagerie en fluorescence**

La microscopie en fluorescence est une technique d'imagerie optique mettant à profit le phénomène en fluorescence. C'est un phénomène d'émission lumineuse de la matière qui peut être provoquée par diverses formes d'excitation autre que la chaleur. La première observation du phénomène de fluorescence a été réalisée par Herschel en 1845 sur une solution de quinine exaltée par la lumière du soleil. C'est Stokes, en 1853, qui donnera pour la première fois le nom de fluorescence à ce phénomène, mais c'est Jablonski qui développera ce concept dans les années 1920-30. Une molécule dite fluorescente va absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et la restituer sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission) (Figure 35). La formation d'une image en fluorescence repose alors sur la détection de la lumière émise. Un échantillon fluoresce soit parce qu'il comporte un groupement chimique fluorescent soit suite à un marquage par des molécules fluorescentes.

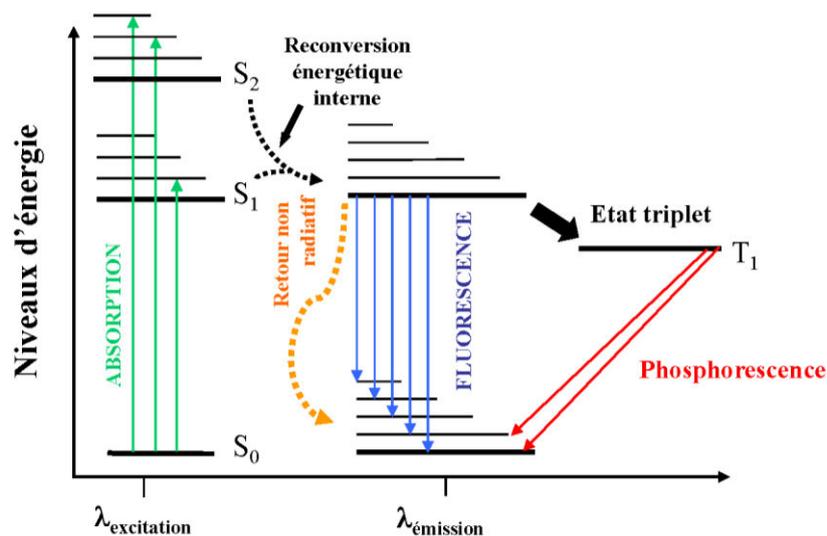


Figure 35 : Diagramme de Perrin-Jablonski représentant le phénomène de fluorescence. (Wikipédia/26-10-2018)

La microscopie en fluorescence est un outil de choix pour l'observation des échantillons biologiques. En effet, cette technique permet d'étudier la localisation des structures à l'échelle subcellulaire. Un marquage spécifique par des anticorps ou des sondes est nécessaire pour mettre en évidence des éléments biologiques. La Figure 36 présente une image en fluorescence en fausse couleur (chaque couleur correspond à une structure différente) de cellules MC3T3-E<sub>1</sub> (pré-ostéoblastes murins) cultivées sur un disque d'hydroxyapatite silicatée (SiHA) par Amandine MAGNAUDEIX, maître de conférences au laboratoire IRCER. Certaines structures cellulaires ont été mise en évidence par immunomarquage (utilisation d'anticorps visant une cible moléculaire spécifique) ou grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes (molécules fluorescentes ayant une affinité pour des structures cellulaires spécifiques). Sur la Figure 36, la couleur rouge clair au centre des cellules représente les adhésions focales des cellules. Elles ont été marquées avec un anticorps primaire anti-vinculine<sup>10</sup> produit chez le lapin, puis un anticorps secondaire anti-lapin (produit chez la chèvre) et couplé au fluorochrome Alexa Fluor A594. La couleur verte indique le cytosquelette d'actine marquée à la phalloïdine<sup>11</sup> couplée à l'Alexa Fluor A488. Enfin, les noyaux cellulaires, en bleu, et sont marqués au Hoechst 33342, une molécule qui se fixe au grand sillon de la molécule d'ADN.

<sup>10</sup> Vinculine : protéine membranaire et cytosquelettique présente au niveau des plaques d'adhésion focale.

<sup>11</sup> Phalloïdine : toxine qui se fixe spécifiquement aux filaments d'actine polymérisés et s'oppose à leur dépolymérisation.

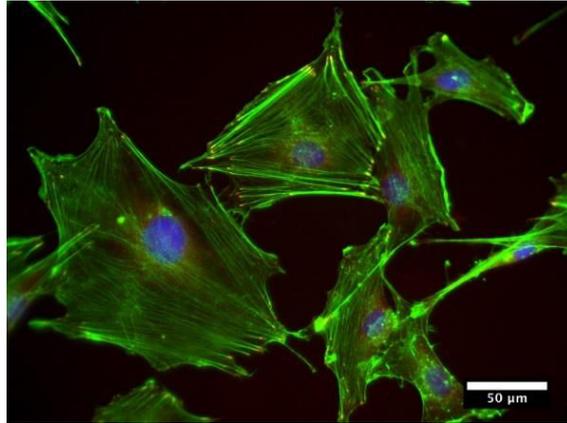


Figure 36 : Image en fluorescence des cellules MC3T3-E<sub>1</sub> en fausse couleur.

La microscopie en fluorescence peut être utilisée pour caractériser la présence de protéines en surface. C'est une technique sensible, l'augmentation de l'intensité de fluorescence étant directement liée à la quantité de molécules présentes. Par exemple, Llopis-Hernandez *et al.* ont caractérisé l'adsorption de fibronectine (Fn) sur des monocouches auto-assemblées mixtes (SAM pour *Self-Assembled Monolayers*) d'alcanéthiols à terminaison -CH<sub>3</sub> [202]. Les SAM assemblés sur de l'or sont des surfaces organiques hautement ordonnées capables de fournir différentes fonctionnalités chimiques et des propriétés de surface bien contrôlées. Après adsorption de la fibronectine (Fn) sur cette surface, des cellules MC3T3-E<sub>1</sub> y ont été cultivées et observées en microscopie après marquage immunofluorescent avec un anticorps anti-Fn. Les images obtenues (Figure 37) montrent que la fibronectine est adsorbée à la surface du matériau (fond rouge) et la manière dont les cellules réorganisent cette couche de fibronectine. En effet, l'intensité de fluorescence, qui traduit la présence de la fibronectine à la surface du substrat varie : plus la couleur rouge est intense plus il y a de la fibronectine. Les zones noires-sombres correspondent à la fibronectine adsorbée et les zones de couleur rouge vif à la sécrétion et formation de fibrilles Fn par les cellules. En effet, Les cellules ont tendance à adhérer et à réorganiser les protéines adsorbées de la matrice extracellulaire (MEC) à la surface du matériau selon un motif en forme de fibrille.

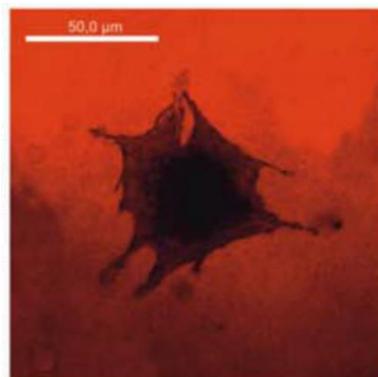


Figure 37 : Réorganisation cellulaire sur la fibronectine adsorbée [202].

L'intensité en fluorescence peut être mesurée et est accessible par un traitement d'image. Pour ce faire, il est nécessaire d'avoir une référence interne, c'est-à-dire un échantillon ayant une densité de protéine connue permettant d'attribuer une valeur d'intensité de fluorescence. Sans cet étalon, l'analyse est qualitative et comparative (comparaison d'intensités de fluorescence dans des conditions d'acquisition d'images identiques) mais non quantitative.

#### **I.4.2.2. Imagerie Infrarouge**

La spectroscopie infrarouge (IR) est une spectroscopie vibrationnelle. Elle recouvre une large gamme de techniques. Elle repose sur les interactions entre la matière et un rayonnement électromagnétique infrarouge sur une gamme de fréquence déterminée. Il s'agit d'une technique de caractérisation permettant de déterminer la nature des liaisons chimiques présentes dans une molécule.

Aujourd'hui la spectroscopie infrarouge n'est plus limitée à l'acquisition de spectres ponctuels d'absorption, elle permet également de générer des images 2D reconstruites sur une bande/mode spécifique permettant la mise en évidence d'hétérogénéités chimiques. L'imagerie IR est appliquée aujourd'hui à des systèmes biologiques complexes comme la caractérisation de lésions tumorales sur des coupes tissulaires [203], [204].

Parmi les techniques d'imagerie en infrarouge figurent l'imagerie par réflectance totale atténuée ATR (ATR pour *attenuated total reflectance*) et l'imagerie dite globale. L'imagerie ATR se sert du phénomène de réflexion entre deux milieux d'indice de réfraction différents. Le cristal ATR utilisé (diamant, germanium, *etc.*) doit posséder un indice de réfraction nettement supérieur à celui de l'échantillon. L'image infrarouge est obtenue par contact de l'échantillon avec le cristal qui est placé sur une platine motorisée XY. La résolution spatiale d'une image infrarouge en mode ATR avec un cristal de type germanium (indice de réfraction = 4) est inférieure à 2  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ . Cependant, il s'agit d'une technique d'imagerie par contact, la surface de l'échantillon (partie organique) engagée avec le cristal peut être détériorée ou modifiée par la force appliquée localement.

L'imagerie infrarouge globale peut quant à elle être réalisée en réflexion ou transmission. Elle utilise un système de platine motorisée de précision micrométrique contrôlée par le logiciel. La résolution spatiale garantie avec ce système d'imagerie est de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$ . Un exemple de ce type d'imagerie infrarouge est présenté en Figure 38. Sebiskveradze *et al.* ont caractérisé des coupes tissulaires de 6 à 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur déposées sur des fenêtres de fluorure de calcium ( $\text{CaF}_2$ ) [205]. La figure présente une image optique d'une coupe tissulaire, la zone scannée en imagerie IR est entourée en rouge (Figure 38-A). L'image infrarouge (Figure 38-B) de la coupe tissulaire est représentée avec une échelle en couleur qui traduit l'absorbance des pixels constituant l'image : en bleu les pixels de faible absorbance, en rose

ceux de forte absorbance. La croix rouge, sur cette image infrarouge, correspond à une zone où les bandes amide I et amide II des protéines ont été révélées (Figure 38-C). Une analyse par déparaffinage numérique (analyse multivariée par chimiométrie) est nécessaire pour une interprétation plus pertinente des données spectrales. En effet, les échantillons sont inclus dans de la paraffine afin de pouvoir être coupé. La paraffine, alcane à plus de 20 atomes de carbone, induit donc des bandes dans les mêmes zones spectrales que les protéines.

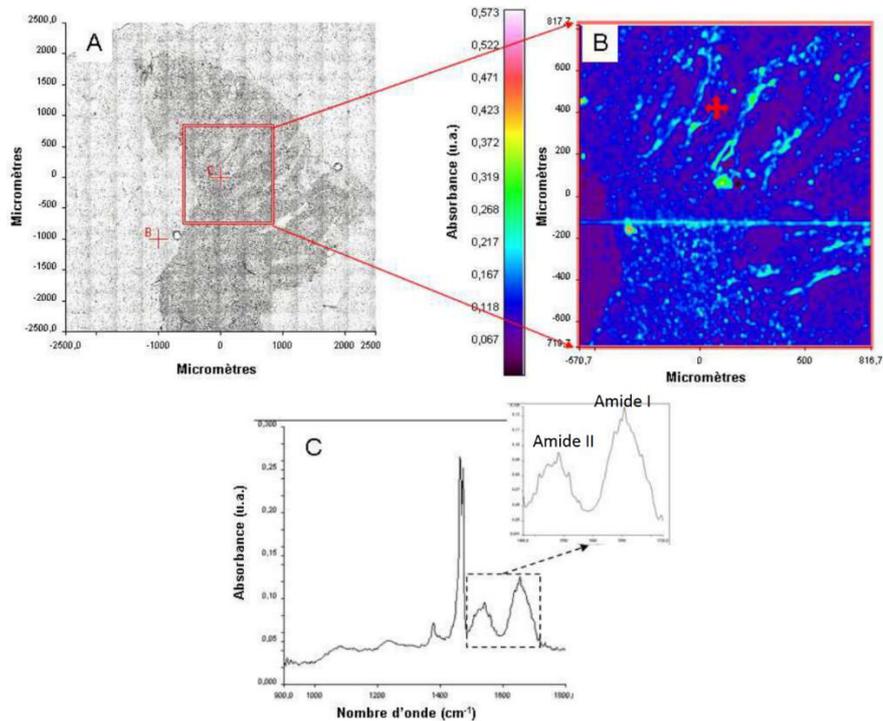


Figure 38 : Exemple d'image spectrale IR d'une coupe tissulaire paraffinée avec (A) une image optique avec la zone d'acquisition entourée en rouge, (B) une image IR avec l'échelle de couleur qui correspond à l'absorbance moyenne de la zone analysée (résolution spatiale de 6,25  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ , gamme spectrale : 750-4000  $\text{cm}^{-1}$ , résolution spectrale de 4  $\text{cm}^{-1}$  et 16 accumulations par spectre) et (C) spectre correspondant au point d'acquisition matérialisé par la (croix rouge). En encart, la région spectrale des bandes amide I et amide II [205].

### I.4.2.3. Imagerie Raman

Ce paragraphe va décrire la technique de l'imagerie Raman qui sera utilisée dans le présent travail car d'une part, nous ne disposons pas d'un étalon (*i.e.* une céramique dense en HA et en CHA fonctionnalisée avec une densité de VEGF connue), de ce fait l'approche d'imagerie en fluorescence, bien que très sensible, n'a pas pu être faite, et d'autre part, l'imagerie infrarouge n'a pas été utilisée car nous ne disposons pas à ce jour d'un imageur infrarouge au sein du laboratoire IRCER.

### I.4.2.3.1. Principe de l'effet Raman

La spectroscopie de diffusion Raman a été découverte en 1928 par le physicien indien Sir Chandrasekhara Venkata Raman et repose sur le phénomène de diffusion inélastique de la lumière. Elle permet d'étudier la réponse vibrationnelle d'un échantillon résultant de la lumière diffusée inélastiquement après excitation par un rayonnement laser monochromatique de longueur d'onde donnée comme pour la spectroscopie infrarouge, chaque mode vibrationnel est caractéristique d'un type de liaison présent dans l'échantillon.

Lorsqu'un milieu (solide, gaz, liquide) est éclairé par un faisceau lumineux monochromatique de longueur d'onde  $\nu_0$ , la majeure partie de la lumière incidente est diffusée sans modification de fréquence, les photons sont diffusés alors de façon élastique (diffusion Rayleigh - Figure 39). Mais un photon sur un million va avoir une énergie différente du photon incident (diffusion inélastique). Le photon incident peut être diffusé soit avec une fréquence inférieure à la longueur d'onde  $\nu_0$ , le phénomène est alors appelé diffusion Stokes, soit avec une fréquence supérieure à la longueur d'onde  $\nu_0$  et dans ce cas-là il s'agit d'une diffusion anti-Stokes.

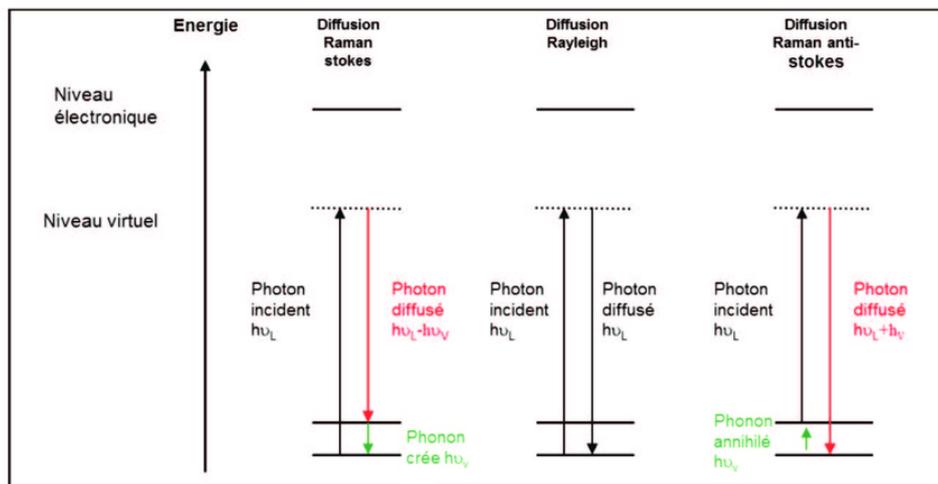


Figure 39 : Diagramme des niveaux d'énergie impliqués en spectroscopie Raman (diffusions, Rayleigh, Stokes et anti-Stokes) [206].

### I.4.2.3.2. Signature en diffusion Raman des protéines, des phosphates de calcium et du tissu osseux

- **Les protéines**

En littérature, l'imagerie Raman conventionnelle sur des protéines est peu référencée, d'où la nécessité de connaître la signature vibrationnelle des fonctions recherchées. Les protéines sont constituées d'acides aminés, ces derniers possédant des fonctions chimiques propres mais communes à toutes protéines. Les fonctions présentes dans les 21 acides aminés rencontrés chez les eucaryotes sont présentées en annexe 1.

Le spectre Raman d'une protéine peut être décomposé en trois parties :

- le domaine basse-fréquence de 10 à 300  $\text{cm}^{-1}$  ;
- le domaine de fréquence distinctif de la structure secondaire (majoritairement constituée d'hélices- $\alpha$  et de feuillets- $\beta$ ) de la protéine de 500 à 1800  $\text{cm}^{-1}$  ;
- le domaine des modes de vibration d'élongation des liaisons O-H, C-H... de 2000 à 3800  $\text{cm}^{-1}$ .

Généralement, le second domaine permet de suivre les changements de conformation d'une même protéine ou de distinguer deux molécules de même formule chimique.

Les différences observées peuvent être significatives comme par exemple dans le cas des sucres de sucrose et de tréhalose, deux disaccharides de formules brutes  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  utilisés comme bioprotecteurs [207]. La Figure 40 présente les spectres Raman du sucrose (S) et du tréhalose (T) sur un domaine de fréquences entre 500 et 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Les deux spectres sont assez similaires. Néanmoins les différences observées peuvent être attribuées aux variations entre leurs structures moléculaires.

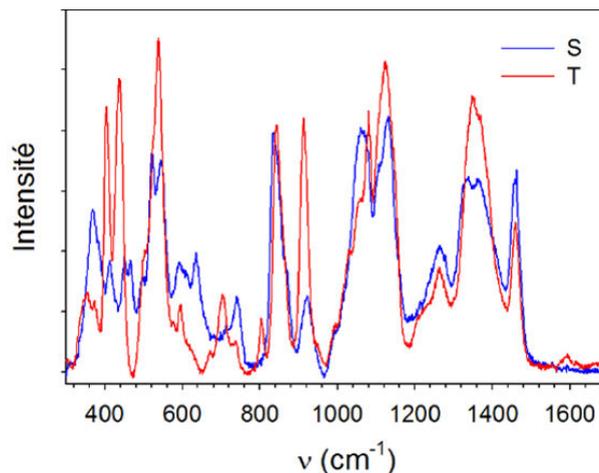


Figure 40 : Spectres Raman du tréhalose (T) et du sucrose (S) [207].

Dans le cas des protéines, les principaux mouvements de vibrations sont attribués aux fonctions amides (liaisons peptidiques). Leur variété ainsi que leur nombre (amides I, II et III) amène à des réponses vibrationnelles nombreuses et complexes à séparer (Tableau 1). La Figure 41 présente la fonction amide correspondant à la liaison peptidique des protéines.

La bande « amide I » est généralement la bande la plus intense située entre 1600 et 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Elle représente les vibrations d'élongation des liaisons C=O (70 % à 80 % du squelette de la protéine) couplée à une faible contribution des vibrations de déformation des liaisons C-N.

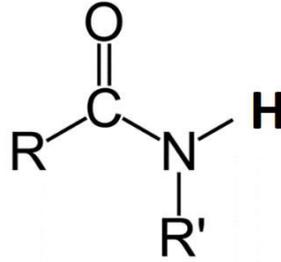


Figure 41 : Représentation de la fonction amide correspondant à la liaison peptidique des protéines.

La bande « amide II » se situe entre 1510 et 1560  $\text{cm}^{-1}$ . Elle est due aux mouvements de déformation de la liaison N-H et d'élongation de la liaison C-N, mais également à une faible contribution du mouvement de déformation de la liaison C-O. Il s'agit d'une bande très active en spectroscopie infrarouge et moins en spectroscopie Raman. Peu d'informations sur la structure de la protéine sont apportées par cette bande [208].

La bande « amide III » est généralement observée entre 900 et 1400  $\text{cm}^{-1}$ . Elle correspond à une combinaison des mouvements d'élongation de la liaison C-N et de déformation de la liaison N-H. Il s'agit de la bande principale impliquée dans la caractérisation de la structure secondaire de la protéine car sa position diffère entre feuillets  $\beta$  et hélice  $\alpha$ .

Nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ )	Nature des bandes
940	Squelette N-C $\alpha$ -C (hélice- $\alpha$ )
960-980-1240	Amide III (feuillelet- $\beta$ : $\nu(\text{C-N})$ et $\delta(\text{N-H})$ )
1340	Amide III (hélice- $\alpha$ : $\delta(\text{N-H})$ et $\nu(\text{C-N})$ )
1510-1560	Amide II : $\delta(\text{N-H})$
1650-1660	Amide I : $\nu(\text{C=O})$

Tableau 1 : Attribution des bandes vibrationnelles des amides (liaisons peptidiques) en spectroscopie Raman [207]-[209].

Si on s'intéresse aux acides aminés de façon plus spécifique, les acides aminés soufrés comme la cystéine (présence de liaisons SH et S-C) et la méthionine (présence de liaisons S-C), et les acides aminés aromatiques (présence de liaisons C=C conjuguées) présentent également des bandes spécifiques en spectroscopie Raman. Le Tableau 2 regroupe les positions des principales bandes Raman des acides aminés aromatiques d'après les travaux de Domènech-Casal *et al.* [209], Taleb *et al.* [210] et Kahraman *et al.* [211]. Cependant les auteurs n'ont pas précisé les modes de vibration associées aux différentes liaisons chimiques. L'attribution de la plupart des bandes a été faite à l'aide des tables de vibration en infrarouge [212].

Les ponts disulfures formés entre deux cystéines (Cys) et impliqués dans la structure tertiaire de la protéine, induisent une réponse à 500-550  $\text{cm}^{-1}$  correspondant à l'élongation de la liaison S-S. Pour les acides aminés à chaîne latérale aromatique (phénylalanine (Phe), tyrosine (Tyr), tryptophane (Trp)), leur cycle aromatique donne lieu à des bandes Raman observées à 1005  $\text{cm}^{-1}$  pour la vibration de la phénylalanine (vibration de respiration : mouvement d'expansion et contraction du noyau benzénique), autour de 1600  $\text{cm}^{-1}$  (Phe : 1605, 1584  $\text{cm}^{-1}$ , Tyr et Trp : 1584  $\text{cm}^{-1}$ , Trp : 1618  $\text{cm}^{-1}$ ). Le cycle aromatique de la tyrosine est généralement observé à 1255, 1210, 1176, 850, 830 et 643  $\text{cm}^{-1}$ .

Acide aminé	Nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ )
Cys	503 : $\nu(\text{S-S})$
Phe	620, 1000 : $\nu(\text{C-C})$ , 1030 : $\nu(\text{C-N})$ , 1605 : $\nu(\text{C=C})$ ,
Tyr	640, 830, 850, 1590 : $\nu(\text{C=C})$
Trp	650, 747, 1011, 1340, 1360, 1618 : $\nu(\text{C=C})$ , 1621 : $\nu(\text{C-C})$
Tyr, Phe	1170, 1200 : $\nu(\text{C-N})$
Trp, Phe	1584 : $\nu(\text{C=C})$
His	3110, 3160 : $\nu(\text{N-H})$

Tableau 2 : Attribution des bandes vibrationnelles en spectroscopie Raman des principaux acides aminés aromatiques, de la cystéine (Cys) et de la histidine (His) [209], [210], [211].

- **Les phosphates de calcium**

Dans le cadre de ces travaux, nous nous sommes intéressés aux matériaux à base de phosphates de calcium. Les signatures Raman des phosphates de calcium et plus particulièrement de l'hydroxyapatite stœchiométrique ( $\text{HA} : \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) et des hydroxyapatites carbonatées mixte ( $\text{C}_{\text{AB}}\text{HA} : \text{Ca}_{10-x} \square_x (\text{PO}_4)_{6-x} (\text{CO}_3)_x (\text{OH})_{2-x-2y} (\text{CO}_3)_y \square_{x-y}$ ) sont connues. La Figure 42 présente les spectres Raman de deux céramiques denses en HA (spectre A) et en CHA (spectre B) effectués pour le présent travail. Les différents modes de vibration Raman des groupements phosphates ( $\text{PO}_4$ ) caractéristiques de tout substrat phosphocalcique sont identifiés sur les spectres Raman et présentés en Figure 43. Le mode  $\nu_2\text{PO}_4$  (déformation angulaire symétrique) est observé à 449 et 432  $\text{cm}^{-1}$ , le mode  $\nu_4\text{PO}_4$  (déformation angulaire asymétrique) à 604, 590 et 592  $\text{cm}^{-1}$ , le mode  $\nu_1\text{PO}_4$  (élongation symétrique) à 961  $\text{cm}^{-1}$  et enfin le mode  $\nu_3\text{PO}_4$  (élongation asymétrique) à 1077, 1050 et 1037  $\text{cm}^{-1}$ . La bande observée à 3573  $\text{cm}^{-1}$  correspond au mode d'élongation symétrique ( $\nu_s$ ) du groupement hydroxyle (OH). Ces attributions des différents modes sont en accord avec la littérature [213]. La bande associée aux ions carbonates ( $\nu_1\text{CO}_3$ ) en site A (substitution des

ions OH<sup>-</sup> par les ions CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) est observée à 1107 cm<sup>-1</sup> [214]. La bande associée aux ions carbonates en site B (substitution des ions PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> par les ions CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) est sensée apparaître à 1070 cm<sup>-1</sup> [43], [214]. Il s'agit de la même position de la bande associée au mode de vibration ν<sub>3</sub> des groupements phosphates PO<sub>4</sub>.

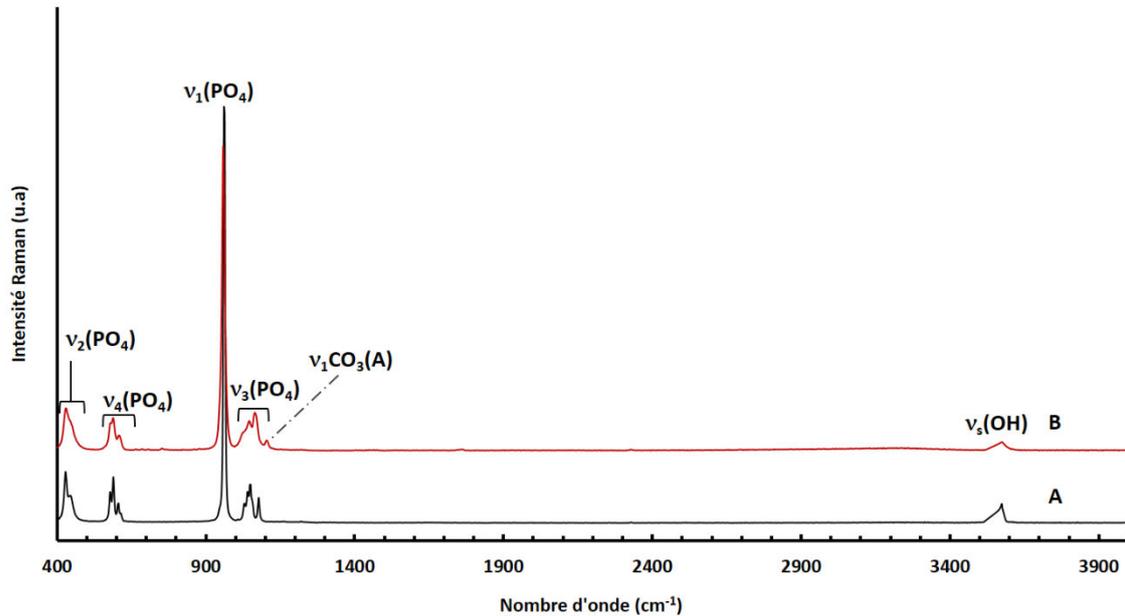


Figure 42 : Spectre Raman dans l'intervalle 400-4000 cm<sup>-1</sup> des céramiques en (A) HA et frittée à 1200 °C durant 30 min sous air et en (B) CHA (Ca<sub>9,5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>5,5</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>0,5</sub>(OH)<sub>1,0</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>0,25</sub>) et frittée à 960 °C durant 2 h sous CO<sub>2</sub>.

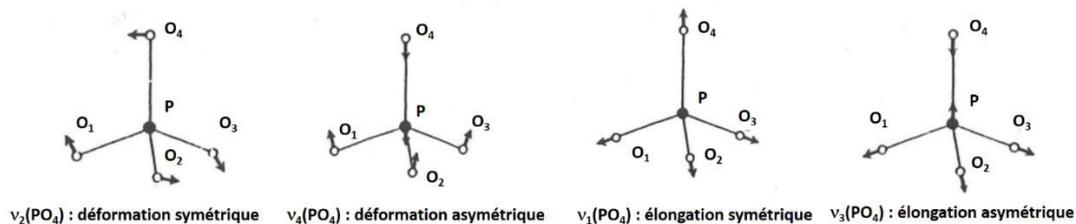


Figure 43 : Modes de vibration des groupements phosphate (PO<sub>4</sub>).

### • Le tissu osseux

Le tissu osseux est un matériau hybride minéral et organique. Il s'agit d'un matériau composite complexe avec une structure hiérarchique et sa résistance dépend de ses propriétés structurales. L'évaluation de la composition chimique des os est compliquée en raison de l'hétérogénéité des tissus. La spectroscopie vibrationnelle reste alors une bonne approche pour mettre en évidence cette hétérogénéité [215], [216]. La Figure 44 présente un exemple de spectre Raman d'un tissu osseux. L'évaluation de la composition d'un tissu osseux a permis de révéler la présence des groupements phosphates (PO<sub>4</sub>) : ν<sub>1</sub>PO<sub>4</sub> (961 cm<sup>-1</sup>), ν<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

( $438\text{ cm}^{-1}$ ) et  $\nu_4\text{PO}_4$  ( $589\text{ cm}^{-1}$ ), des carbonates en site B  $\nu_1\text{CO}_3$  à  $1075\text{ cm}^{-1}$  et la partie organique avec les bandes caractéristiques de l'amide III et I qui sont respectivement à  $1256$  et  $1677\text{ cm}^{-1}$ . La vibration de la bande associée à l'élongation de la liaison C-H ( $\nu(\text{CH})$ ) est observée à  $2937\text{ cm}^{-1}$ . Cette étude montre qu'il est possible de caractériser à la fois la partie organique et inorganique des matériaux hybrides par spectroscopie vibrationnelle.

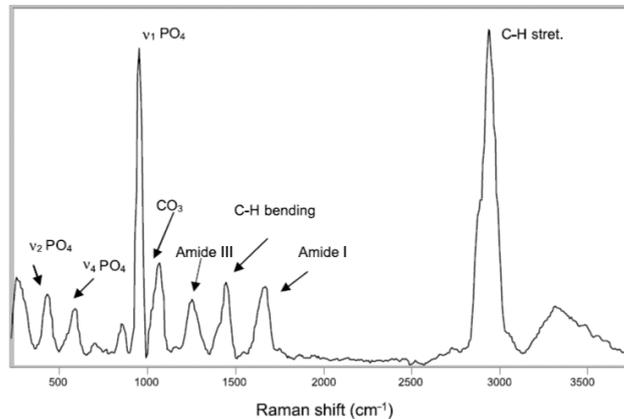


Figure 44 : Spectre Raman d'un tissu osseux [216].

### I.4.2.3.3. Imagerie Raman

L'imagerie Raman 2D permet d'accéder à différents types d'informations comme la détermination des orientations cristallographiques [217], les contraintes mécaniques [218], l'analyse des médicaments dans le domaine pharmaceutique [219], [220], [217] et la composition de l'os [221], [215], [222]. L'imagerie Raman est aujourd'hui un outil de choix pour la bio-imagerie grâce aux nouveaux systèmes très lumineux permettant l'utilisation de longueurs d'onde ayant un faible rendement Raman. Ceci permet d'éviter une détérioration des molécules biologiques par échauffement local [221–224] [222], [221], [223].

A notre connaissance, aucune étude par imagerie Raman conventionnelle de matériaux hybrides : phosphates de calcium/biomolécules n'a pas été réalisée auparavant. Cependant, on peut citer les travaux de Bonifacio *et al.* qui porte sur l'étude d'un cartilage articulaire (tissu conjonctif) par imagerie Raman. L'objectif de cette étude était d'évaluer la faisabilité de la mesure par imagerie Raman sur un échantillon de cartilage articulaire [222].

Les principales différences de composition biochimique et d'orientation des fibres de collagène entre les zones superficielles, moyennes et profondes du tissu sont facilement observables sur les coupes tissulaires de  $10\text{ }\mu\text{m}$  d'épaisseur. Le collagène, les protéines non collagéniques, les protéoglycanes et les acides nucléiques peuvent être distingués sur la base de leurs différentes signatures spectrales, et leur abondance relative dans les échantillons de tissus peut être estimée par imagerie Raman [222].

La Figure 45 représente la distribution de plusieurs composants biochimiques dans les trois régions examinées de l'échantillon de cartilage articulaire. Le traitement des images Raman réalisé avec des techniques multivariées de chimiométrie ne seront pas détaillées dans le présent travail. Les positions des cellules individuelles regroupées en groupes isogènes sont identifiables par imagerie Raman sur des zones où la distribution de l'intensité des bandes d'ADN sur l'image optique n'a pas apporté d'information morphologique. Les petites zones dans lesquelles l'ADN apparaît plus dense sont probablement dues aux noyaux des chondrocytes (cellules composants le cartilage). Dans la zone superficielle, la position des cellules est repérable par la forme aplatie comme le montre les zones rouges de la réponse. Le sulfate de chondroïtine (CS) a une concentration plus élevée dans la matrice entourant immédiatement les chondrocytes, tandis que le collagène est le plus dense dans la matrice extracellulaire (MEC) (couleur rouge-jaune). Les protéines non collagéniques sont associées à la présence des acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine (Phe), la tyrosine (Tyr) et le tryptophane (Trp), qui sont moins présents dans le collagène. Les protéines non collagéniques sont plus denses dans les cellules que sur les régions où le collagène est présent.

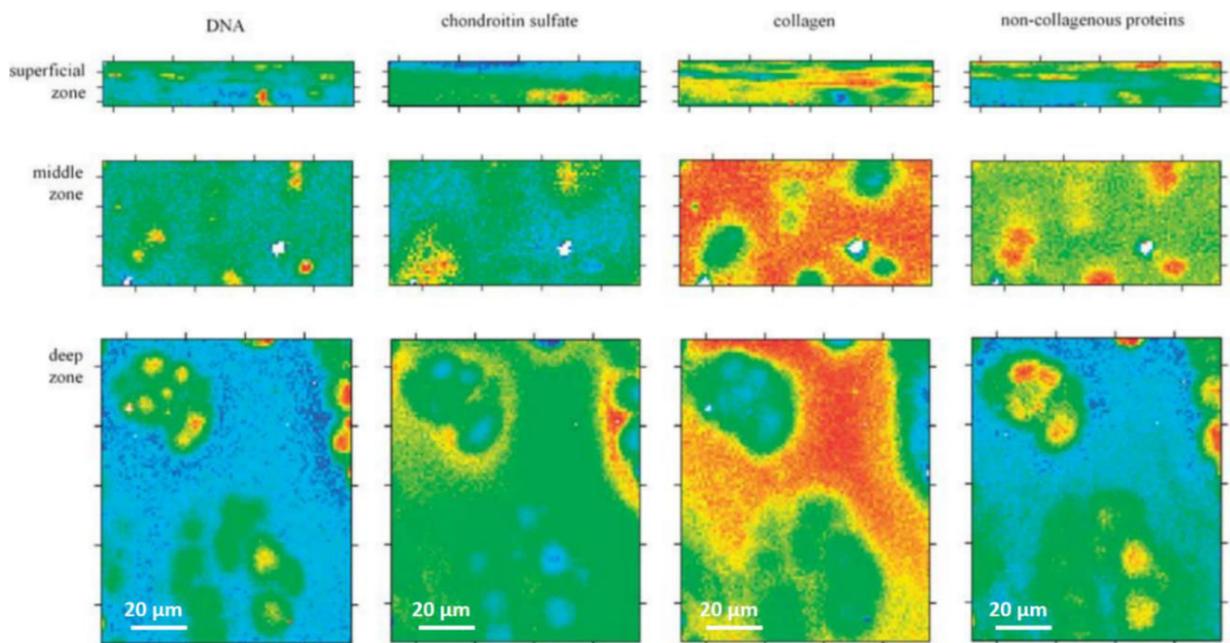


Figure 45 : Image d'un cartilage articulaire par Raman conventionnel. Les spectres ont été collectés avec un pas de 1  $\mu\text{m}$  et un temps d'acquisition de 10 s par spectre dans le domaine 600-1800  $\text{cm}^{-1}$ .

Les images sont reconstruites sur la somme des intensités caractéristiques de chaque constituant biochimique situées à 1578, 1488 et 782  $\text{cm}^{-1}$  pour l'ADN, 1380, 1342 et 1068  $\text{cm}^{-1}$  pour le sulfate de chondroïtine, 1271, 1246, 920, 857 et 816  $\text{cm}^{-1}$  pour le collagène et 1555, 1127 et 1004  $\text{cm}^{-1}$  pour les protéines non collagènes. La couleur bleu traduit une faible réponse Raman et le rouge une forte réponse Raman [222].

Pour conclure, au cours des dernières années, l'utilisation de la spectroscopie Raman et plus précisément de l'imagerie Raman 2D pour des applications médicales a considérablement augmenté. Son attrait vient de sa capacité à fournir une réponse vibrationnelle caractéristique du système moléculaire du matériau étudié. En biologie, l'intérêt de l'imagerie Raman réside dans la possibilité de travailler à des longueurs d'onde élevées et à des puissances à l'échantillon faibles qui permettent d'éviter ainsi une détérioration de la partie organique sous le faisceau du laser. Aucun contact physique n'est établi avec l'échantillon. L'imagerie Raman permet d'analyser la chimie d'une surface fonctionnalisée et d'imager la distribution spatiale de la partie organique présente en surface avec des bandes très étroites et des images chimiques de haute résolution spatiale autour de 1  $\mu\text{m}$  (résolution très satisfaisante pour l'étude des tissus à l'échelle des cellules individuelles).

Une autre technique d'imagerie Raman existe dans le but de forcer l'excitation d'une liaison chimique des molécules présentes dans un échantillon biologique. Cette technique utilise l'effet Raman stimulé comme origine de contraste et permet de générer des images en trois dimensions sans préparation ni marquage d'échantillons. Il s'agit du Raman CARS (*Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*). Bien que le Raman CARS soit très utilisé en imagerie cellulaire [225] [226], l'imagerie par Raman conventionnel permet d'obtenir des images bien résolues de molécules organiques avec une réponse vibrationnelle plus intense qu'en imagerie CARS. Cette technique ne sera pas utilisée dans ces travaux, nous n'en développerons donc pas les avantages et les inconvénients dans ce manuscrit.

## I.5. Conclusion

La réparation des gros défauts osseux reste un défi orthopédique clinique majeur. L'os est un tissu très vascularisé capable de s'auto-réparer à condition que le défaut à combler soit de petite taille.

Les matériaux à base de phosphate de calcium, notamment l'hydroxyapatite, sont largement employés comme substituts osseux, mais, ils présentent au mieux des propriétés d'ostéoconduction, lesquelles favorisent une repousse osseuse sur des petites zones à reconstruire et lorsqu'ils sont en contact direct avec l'os. Cependant ces propriétés demeurent insuffisantes lorsqu'il s'agit de régénérer de larges pertes de substances osseuses dans lesquelles le contact os-matériau ne se fait qu'à l'extrémité de la zone à reconstruire comme le montre la prothèse crânienne en céramique développée à Limoges et présentée en Figure 46 [227].

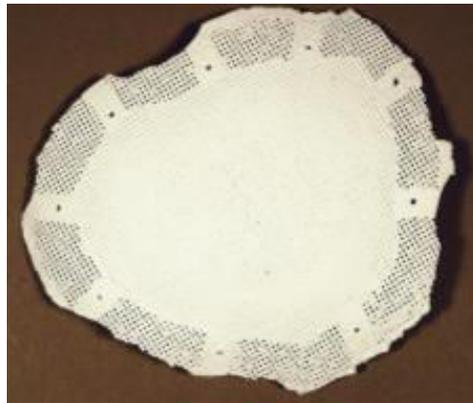


Figure 46 : Prothèse de crâne en céramique [227].

Il est donc devenu primordial de développer des substituts osseux en céramiques phosphocalciques ostéoinducteurs pour la réparation de grands défauts osseux ou de zones à fortes sollicitations mécaniques. Une fonctionnalisation par des biomolécules d'intérêt apparaît judicieuse afin de stimuler le comportement des cellules soit par des protéines comme la BMP afin d'agir sur les processus de minéralisation du substitut osseux, soit par des facteurs de croissance comme le VEGF qui est impliqué dans la vascularisation. Mais avant de fonctionnaliser un matériau, il paraît judicieux d'étudier l'impact de la composition chimique de ce dernier sur l'adhésion cellulaire, premier phénomène rencontré une fois le biomatériau implanté.

La première partie de ce manuscrit sera dédiée à une approche des interactions physiques protéines-substrats en utilisant la spectroscopie de force comme outil de caractérisation à l'échelle nanométrique. L'objectif sera de préciser et mieux comprendre l'apport de cette technique à la connaissance des phénomènes biologiques tels que l'adhésion cellulaire. Dans

cette optique, l'affinité de la fibronectine (protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire) sera évaluée sur des céramiques en HA, SiHA et CHA en étudiant l'influence de leurs topographies et de leurs compositions chimiques. Pour cela des images AFM force-volume seront réalisées dans des conditions semblables aux conditions physiologiques (milieu liquide, 37 °C).

Cette étude bibliographique a décrit deux stratégies différentes de fonctionnalisation par des biomolécules d'intérêt : l'adsorption et l'immobilisation covalente. L'immobilisation covalente doit permettre de contrôler la densité surfacique en biomolécules et éviter leur libération rapide et incontrôlée, contrairement à une adsorption. Mais, la plupart des protocoles d'immobilisation repose sur une fonctionnalisation multi-étapes qui implique généralement l'utilisation de molécules intermédiaires de fonctionnalisation comme des *cross linkers* et des *spacers*. L'utilisation d'un silane comme *cross linker* permet de fournir les fonctions adéquates pour établir une liaison avec le *spacer* qui joue le rôle d'intermédiaire entre le silane et la protéine d'intérêt ajoutée lors de la dernière étape de fonctionnalisation. La seconde partie de cette thèse va consister à utiliser l'imagerie Raman conventionnelle sur des céramiques en HA et en CHA pour mettre en évidence leur fonctionnalisation par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF, impliqué dans le phénomène d'angiogenèse. La fonctionnalisation des céramiques en HA et en CHA sera effectuée par silanisation de la surface par le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES), puis ajout d'un *spacer* intermédiaire, le polyéthylène glycol di-fonctionnel (SM(PEG)<sub>6</sub>), sur lequel la protéine VEGF sera immobilisée. Afin de connaître la répartition chimique du VEGF, nous allons nous intéresser en premier lieu à celle du *cross linker* et du *spacer*. Un suivi de fonctionnalisation étape par étape sera alors effectué par imagerie Raman avec identification des liaisons chimiques caractéristiques des molécules organiques ajoutées. Le défi à relever ici est de pouvoir imager des molécules organiques à la surface des céramiques phosphocalciques sans les dégrader et scanner la même zone après chaque étape de fonctionnalisation afin d'avoir un suivi chimique de l'immobilisation du VEGF.

## Chapitre II. Elaboration, caractérisation et fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques

Ce chapitre porte sur l'élaboration, la caractérisation et la fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques denses en hydroxyapatite (HA), en hydroxyapatite silicatée (SiHA) et en hydroxyapatite carbonatée (CHA). La première partie est consacrée à la synthèse de différentes poudres d'hydroxyapatite et la mise en forme des céramiques. La deuxième partie porte sur la description des techniques de caractérisation des poudres calcinées et de la surface des céramiques phosphocalciques élaborées. La fonctionnalisation des céramiques par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) sera présentée en fin de chapitre. Les mesures de forces d'adhésion par spectroscopie de force avec une pointe AFM fonctionnalisée par la fibronectine seront réalisées sur trois céramiques denses non polies et polies en HA, en SiHA et en CHA. La caractérisation par imagerie Raman concernera des céramiques denses et polies en HA et en CHA fonctionnalisées par le VEGF.

### II.1. Elaboration des céramiques phosphocalciques

#### II.1.1. Synthèse des poudres

Les synthèses des différentes poudres d'hydroxyapatite (HA, SiHA et CHA) sont réalisées par précipitation en voie aqueuse, au laboratoire IRCER selon des protocoles établis dans des travaux précédents [43], [45], [228]. Elles consistent à ajouter une solution contenant des ions phosphates, chargée ou non en ions silicates ou en ions carbonates, à une solution contenant des ions calcium sous une vitesse d'addition, une température et un pH contrôlés. Une photographie du réacteur de synthèse par précipitation en voie aqueuse est présentée en Figure 47.

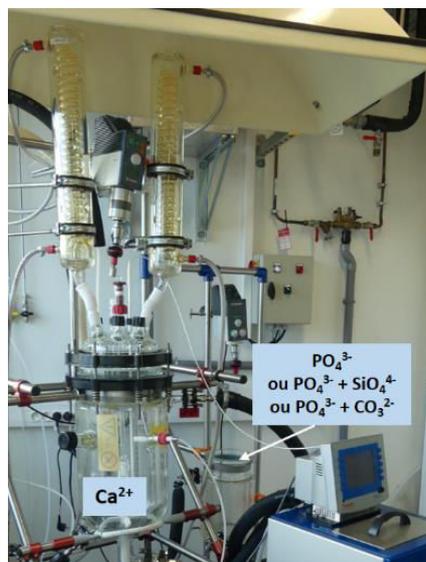


Figure 47 : Photographie du montage de synthèse par précipitation en voie aqueuse.

Les précurseurs utilisés lors de ces synthèses sont le nitrate de calcium tétrahydrate ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 99%, Sigma Aldrich) et l'hydrogénophosphate de diammonium ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 98,7%, Sigma Aldrich). Chaque précurseur est mis en solution en milieu aqueux. Dans le cas d'une hydroxyapatite silicatée, une solution de tétraacétate de silicium ( $\text{Si}(\text{OCOCH}_3)_4$ , Sigma Aldrich, 98%) préalablement homogénéisée au moyen d'un broyeur planétaire est ajoutée à la solution de phosphates afin d'avoir une substitution en groupements silicates telle que  $x = 0,4$  mol [45]. Pour la synthèse de l'hydroxyapatite carbonatée, le précurseur utilisé est l'hydrogencarbonate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 99%, Sigma Aldrich). L'objectif est d'obtenir une substitution telle que  $x = 0,5$  mol en groupements carbonates de type B, *i. e.* substitution des ions phosphates de la structure apatite [43].

Les concentrations, les volumes des solutions ainsi que les rapports molaires en réactifs utilisés pour les trois types de synthèses sont regroupés dans le Tableau 3. Les trois compositions chimiques visées sont :

- une hydroxyapatite stœchiométrique notée HA et de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  ;
- une hydroxyapatite silicatée notée SiHA et de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,6}(\text{SiO}_4)_{0,4}(\text{OH})_{1,6}$  ;
- une hydroxyapatite carbonatée type B notée CHA et de formule  $\text{Ca}_{9,5}(\text{PO}_4)_{5,5}(\text{CO}_3)_{0,5}(\text{OH})_{1,5}$ .

Notation	HA	SiHA	CHA
$C_{\text{Ca}}$ (mol/L)	0,64	0,64	0,53
$C_{\text{PO}_4}$ (mol/L)	0,64	0,60	0,53
$C_{\text{Si}}$ (mol/L)	-	0,04	-
$C_{\text{CO}_3}$ (mol/L)	-	-	0,07
Volume de la solution de Ca (L)	2	2	2
Volume de la solution de $\text{PO}_4$ (L)	1,2		
Volume de la solution de Si + $\text{PO}_4$ (L)	-	1,2	-
Volume de la solution de $\text{CO}_3$ + $\text{PO}_4$ (L)	-	-	1,2
Ca/P (réactifs)	1,667	1,786	1,667
Ca/(P+Si) (réactifs)	-	1,667	-
$\text{CO}_3$ /P (réactifs)	-	-	0,125

Tableau 3 : Récapitulatif des quantités de réactifs utilisées pour les synthèses des poudres phosphocalciques.

La solution de nitrate de calcium est introduite dans le réacteur principal, maintenue sous agitation constante à  $120 \text{ tr.min}^{-1}$  et chauffée à une température de  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ . La solution contenant les ions phosphates ou celle contenant les ions phosphates et silicates ou phosphates et carbonates est chauffée à  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  dans un réacteur secondaire puis ajoutée sous un débit contrôlé à la solution d'ions calcium ( $48 \text{ mL/min}$  pour HA et SiHA et  $22 \text{ mL/min}$  pour CHA). Le pH est maintenu à 9 par ajout automatique d'ammoniaque ( $\text{NH}_4\text{OH}$  35%, Fisher Scientific) à l'aide d'une pompe gamma/ L, ProMinent. La synthèse est réalisée sous balayage d'argon à  $0,5 \text{ L.min}^{-1}$  afin d'éviter une carbonatation incontrôlée du milieu réactionnel par le  $\text{CO}_2$  de l'air. Après un temps de maturation (sous agitation) de 15 min pour les synthèses d'HA et de SiHA et de 30 min pour CHA, le précipité est récupéré, séparé dans des pots Nalgene remplis d'environ  $0,5 \text{ L}$  d'eau distillée, puis centrifugé 5 min à  $1530 \text{ rpm}$ . Cette étape de lavage est répétée deux fois afin d'éliminer les résidus de synthèse. Le précipité est ensuite mis en étuve à  $100^\circ\text{C}$  pendant une nuit. Environ  $125 \text{ g}$  de poudre sont obtenus à chaque synthèse.

### **II.1.2. Mise en forme des céramiques**

Les céramiques utilisées lors de ces travaux sont des pastilles denses. Pour cela, les poudres d'HA, SiHA et CHA sont calcinées sous air respectivement à  $650 \text{ }^\circ\text{C}$  durant 30 min,  $700 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 2 h et  $400 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 2 h afin d'atteindre une surface spécifique d'environ  $30 \text{ m}^2/\text{g}$ . Ce traitement thermique permet d'obtenir des pièces à cru compactes et des matériaux denses après frittage.

Pour chaque composition, une masse de  $500 \text{ mg}$  de poudre calcinée est introduite dans une matrice de diamètre  $13 \text{ mm}$ . Le pressage est ensuite réalisé à une pression d'environ  $200 \text{ MPa}$  pour les poudres d'HA et SiHA et  $100 \text{ MPa}$  pour CHA, cela afin d'assurer la compaction des poudres à cru. Les pastilles HA et SiHA sont frittées sous air à  $1200 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 30 min avec des rampes de montée et descente en température de  $20 \text{ }^\circ\text{C/min}$ , tandis que les pastilles en CHA sont frittées à  $960 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 2h dans un four sous atmosphère  $\text{CO}_2$  afin d'éviter leur décarbonatation. La rampe de montée et de descente en température est alors de  $10^\circ\text{C/min}$ . Les protocoles de frittage des trois compositions HA, SiHA et CHA sont adaptés de précédents travaux réalisés au laboratoire [228], [45], [43].

En fonction des études effectuées, les céramiques sont utilisées soit directement après frittage (non polies), soit polies « façon miroir » avec du papier en carbure de silicium ( $\text{SiC}$ ) avec des tailles de grains de  $18$ ,  $10$  et  $5 \text{ }\mu\text{m}$ . Les céramiques polies sont ensuite nettoyées à l'éthanol pendant 15 min dans un bain à ultrasons et séchées une nuit en étuve à  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ . Le polissage permet d'obtenir une très faible rugosité et de s'affranchir de ce paramètre.

## II.2. Caractérisation des poudres et des céramiques

### II.2.1. Caractérisation des poudres

La pureté des poudres synthétisées est vérifiée sur des aliquots de poudre de CHA calcinée à 400°C sous air et de poudres de HA et SiHA calcinées à 1000 °C-15h selon la norme ISO 137779-3 [229].

#### II.2.1.1. Test à la phénolphtaléine

Afin de s'assurer de l'absence de chaux, les poudres calcinées et encore chaudes (400 °C) sont introduites dans une solution aqueuse de phénolphtaléine. Ces tests sont réalisés pour chaque lot de synthèse. Une coloration rose de la solution atteste de la présence de chaux. Si aucune coloration n'apparaît, la poudre ne contient pas de chaux résiduelle.

Les résultats des tests à la phénolphtaléine ne montrent aucune coloration des solutions contenant les différentes poudres, il n'y a donc pas de chaux résiduelle dans les poudres synthétisées.

#### II.2.1.2. Analyse par diffraction des rayons X

La caractérisation par diffraction des rayons X (DRX) des poudres a été réalisée sur un diffractomètre D8 Advance (Bruker) en utilisant la raie  $K\alpha_1$  du cuivre ( $\lambda_{K\alpha_1} = 1,5406 \text{ \AA}$ ). Les acquisitions sont effectuées en  $2\theta$  entre 27 et 40° avec un pas de 0,015° et un temps de comptage de 0,840 s/pas. L'identification des phases présentes est faite par le logiciel EVA à l'aide des références PDF (*Powder Diffraction Files*) fournies par la base des données ICDD (*International Center of Diffraction Data*) et présentée en Tableau 4.

Composés	Fiche PDF
HA – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9-0432
$\beta$ -TCP – $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	55-0898
$\alpha$ -TCP - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9-0348
Oxyde de calcium (chaux) - CaO	37-1497
Hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2$	04-733
Calcite – $\text{CaCO}_3$	471743

Tableau 4 : Références de fiches PDF des phases utilisées pour l'indexation des diffractogrammes.

La Figure 48 représente les diffractogrammes des poudres d'HA (Figure 48-A), de SiHA (Figure 48-B) calcinées à 1000 °C-15 h et de CHA (Figure 48-C) calcinée à 400 °C-2 h. Les

diagrammes de diffraction X des trois poudres présentent une seule phase de structure apatite, tous les pics de diffraction étant indexés avec la fiche ICDD-PDF n° 9-0432 de l'hydroxyapatite pure. Aucune phase cristalline secondaire de phosphate tricalcique  $\alpha$  et/ou  $\beta$ , de chaux ou de calcite n'est détectée quelle que soit la composition chimique. Cependant, un léger déplacement des bandes est observé sur le diagramme de SiHA (Figure 48-B) qui pourrait être dû à l'insertion du silicium dans l'hydroxyapatite.

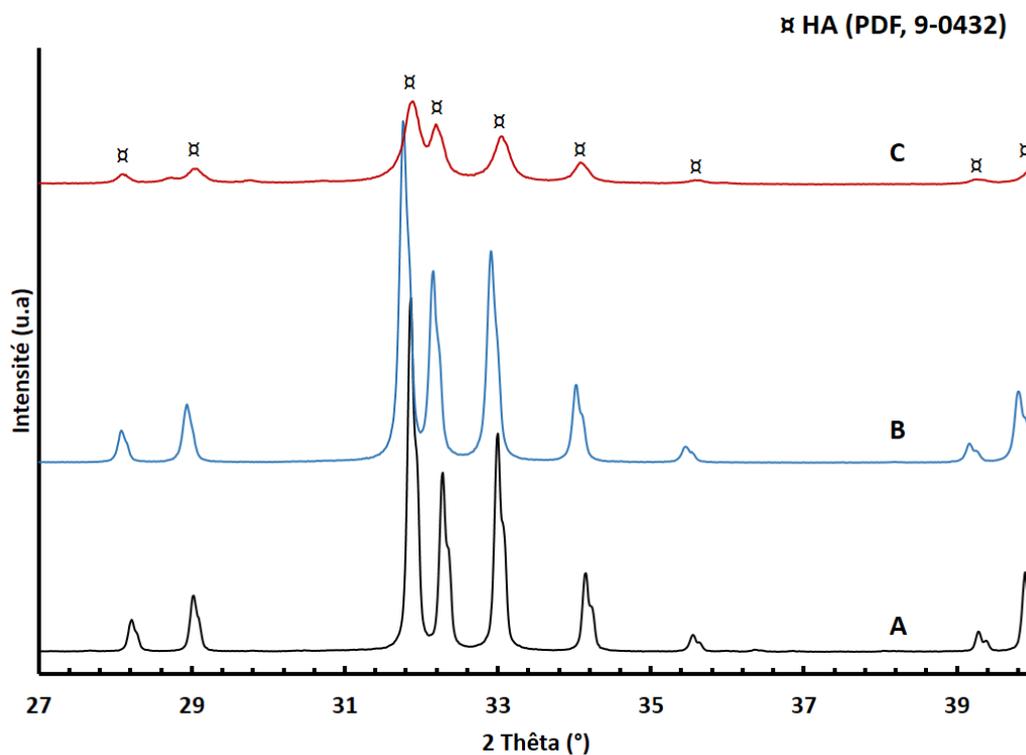


Figure 48 : Diffractogrammes des poudres A) d'HA, B) de SiHA calcinées à 1000 °C-15 h et C) de CHA calcinée à 400 °C-2 h.

### II.2.1.3. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Les spectres infrarouges à transformée de Fourier (FTIR) des poudres ont été collectés par un spectromètre Perkin Elmer entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution de 2  $\text{cm}^{-1}$ . Les mesures sont réalisées en absorbance au travers de pastilles KBr avec un balayage de 20 scans. Les échantillons analysés sont mis sous forme d'une pastille par pressage uniaxial d'un mélange homogène de poudre (1,5 mg de poudre + 150 mg de KBr). Une pastille de KBr pur est réalisée pour chaque série de mesure (blanc). Son spectre est ensuite soustrait automatiquement de celui des échantillons par le logiciel Spectrum.

Le Tableau 5 récapitule les bandes d'adsorption caractéristiques des groupements susceptibles d'être présents dans les différentes poudres synthétisées.

Une normalisation des spectres infrarouges est nécessaire afin de pouvoir les comparer entre eux. Pour cela chaque spectre est multiplié par un coefficient ramenant l'absorbance de la bande  $\nu_4(\text{PO}_4)$  à  $602 \text{ cm}^{-1}$  à 1 [72]. Les spectres recueillis sur les poudres calcinées d'HA, de SiHA et de CHA sont présentés en Figure 49. Les poudres d'HA (spectre A), de SiHA (spectre B) et de CHA (spectre C) présentent les modes de vibration des groupements de phosphates ( $\text{PO}_4$ ) typiques d'une structure apatite. Ils sont observés à  $477 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_2$  : déformation angulaire symétrique),  $574$  et  $601 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_4$  : déformation angulaire asymétrique),  $963 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_1$  : élongation symétrique) et  $1046$  et  $1088 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_3$  : élongation asymétrique). Les bandes à  $633$  et  $3573 \text{ cm}^{-1}$  correspondent respectivement aux modes de libration ( $\nu_L$ ) et d'élongation ( $\nu_s$ ) du groupement hydroxyle (OH). Ces bandes communes à tous les spectres sont plus intenses pour l'hydroxyapatite que pour les hydroxyapatites silicatées et carbonatées, cela est dû à la présence de lacunes en ions hydroxydes induites par les substitutions par les ions  $\text{SiO}_4^{4-}$  et  $\text{CO}_3^{2-}$  dans la structure apatite [58], [43].

Le spectre d'absorption de la poudre SiHA (spectre B) révèle la présence de bandes spécifiques aux groupements silicates ( $\text{SiO}_4^{4-}$ ). Les bandes de faible intensité observées à  $500$ ,  $520$ ,  $745$  et  $895 \text{ cm}^{-1}$  sont attribuées aux vibrations d'élongation des liaisons Si-O. Des épaulements détectés à  $937$  et  $948$  sont attribués respectivement à la vibration d'élongation des liaisons Si-O-Si, et à la vibration des liaisons Si-OH présentes à la surface de SiHA [57].

Pour la poudre CHA, le spectre d'absorption (spectre C) révèle la présence de bandes  $\nu_2$  et  $\nu_3$  caractéristiques des ions carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) en sites B et qui sont observées respectivement à  $880$  et  $1411 \text{ cm}^{-1}$ . L'épaulement de faible intensité associé aux bandes à  $1448$  et  $1485$  est attribué au mode  $\nu_3$  des ions carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) en sites A/B. Bien que le procédé de synthèse par précipitation utilisé mène généralement à l'obtention d'une CHA en site B, les apatites faiblement carbonatées sont susceptibles de contenir des ions carbonates en site A en très faible quantité [230]. Néanmoins, la poudre synthétisée sera assimilée à une poudre CHA de type B. Une petite bande d'absorption est observée à  $1383 \text{ cm}^{-1}$ , celle-ci est attribuée au mode d'élongation asymétrique  $\nu_3$  des groupements nitrates ( $\text{NO}_3$ ), résidus de synthèse qui ont subsisté à l'étape de lavage de la poudre. Cette bande n'apparaît pas sur les poudres HA et SiHA calcinées à haute température ( $1000 \text{ °C}$ ) car le traitement thermique à haute température a permis d'éliminer les nitrates résiduels.

Ces résultats confirment que les poudres de HA, SiHA et CHA sont pures et monophasées.

Mode de vibration	Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )
$\nu_1\text{PO}_4$	961 [73]
$\nu_2\text{PO}_4$	474 [73]
$\nu_3\text{PO}_4$	1030 et 1081 [73]
$\nu_4\text{PO}_4$	560 et 602 [73]
$\nu_s\text{OH}$	3562 [73]
$\nu_L\text{OH}$	631 [73]
$\nu(\text{H}_2\text{O})$ adsorbée	3700-3000 [73]
$\delta(\text{H}_2\text{O})$ adsorbée	1630 [73]
$\nu(\text{OH})$ de $(\text{CaOH})_2$	3640-3650 [73]
$\nu_2(\text{SiO}_4^{4-}), \nu_1(\text{SiO}_4^{4-}), \nu_3(\text{Si-OH}), \nu_3(\text{Si-O-Si}), \text{Si-OH}$	494, 522, 752, 890, 928, 945, [45], [57], [44]
$\nu_2\text{CO}_3$ (site A)	878 [214], [231]
$\nu_2\text{CO}_3$ (site B)	872 [73], [214], [231]
$\nu_3\text{CO}_3$ (site A)	1542, 1465 [214], [231]
$\nu_3\text{CO}_3$ (site B)	1462, 1412 [73], [214], [231]
$\nu_4\text{CO}_3$ (site A)	757, 670 [214], [231]
$\nu_4\text{CO}_3$ (site B)	718, 692 [73], [214], [231], [232]

Tableau 5 : Modes de vibration infrarouge susceptibles d'être détectés dans les poudres d'HA, de SiHA et de CHA [44, 45, 57, 73, 214, 231, 232].

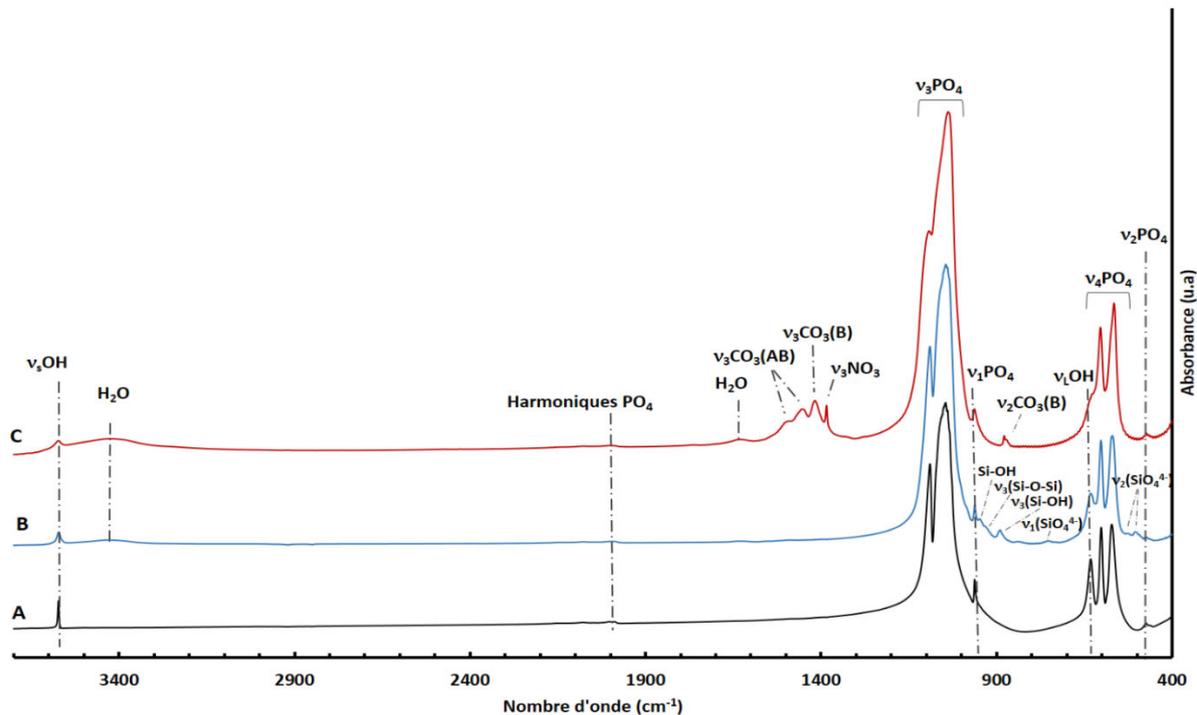


Figure 49 : Spectres FTIR dans l'intervalle 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  des poudres A) d'HA et B) de SiHA calcinées à 1000  $^{\circ}\text{C}$ -15 h et C) de CHA calcinée à 400  $^{\circ}\text{C}$ -2 h sous air.

#### II.2.1.4. Analyses chimiques élémentaires

La quantité de groupements carbonates dans la poudre de CHA a été estimée par analyse élémentaire du carbone à l'aide de l'appareil EMIA 320V (Horiba). Elle consiste à brûler sous atmosphère de dioxygène  $\text{O}_2$  un échantillon pulvérulent. Les gaz  $\text{CO}_2$  et  $\text{CO}$  émis sont ensuite dosés par absorption infrarouge. Pour chaque série de mesures, un étalonnage de l'appareil est réalisé avec 3 échantillons de référence (Fer) ayant les teneurs massiques suivantes en éléments carbone : 0,044 %, 2,85 %, 4,18 %. Les échantillons sont placés dans des creusets en mullite et recouverts d'un mélange de fondants à base de fer, de cuivre et d'étain. Le pourcentage massique en carbone est déterminé directement par l'appareil. La mesure est effectuée 3 fois et une moyenne est calculée.

Le pourcentage massique en carbonates est obtenu avec la formule chimique suivante :

$$\% \text{CO}_3 (\text{massique}) = \% \text{C}_{\text{massique}} \times \frac{M_{\text{CO}_3}}{M_{\text{C}}} \quad (\text{M : masse molaire en g/mol})$$

Le pourcentage massique en carbone obtenu sur la poudre de CHA calcinée à 400  $^{\circ}\text{C}$ -2 h sous air est de 0,64 %m et donc le pourcentage massique en groupements carbonates calculé est de 3,24 %m. Le résultat obtenu a permis de remonter à la formule ci-dessous en se basant sur la formule d'une hydroxyapatite carbonatée en site B :



La teneur en silicium de la poudre SiHA calcinée à 1000°C-15 h a été largement étudiée au sein de l'équipe Biocéramiques de l'IRCER. Elle a été mesurée par ICP/AES (*Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy*) après dissolution de 0,1g de poudre dans un mélange de 4 mL de HNO<sub>3</sub> et de 10 mL de HF. Les valeurs du taux de silicium mesurées sont assez proches : 0,384 mol [45], 0,42 mol [108], [4] et 0,45 mol [69]. La teneur retenue pour l'étude est de 0,4 mol, d'où la formule chimique suivante :



#### II.2.1.5. Mesure de surface spécifique

Les surfaces spécifiques des poudres de HA, SiHA et CHA ont été déterminées par la méthode BET (Brunauer-Emmett-Teller) d'adsorption d'azote 8 points avec l'appareillage Micromeritics ASAP2020. Les mesures ont été réalisées sur 1 g de poudre calcinée (650 °C-30 min pour HA, 700 °C-2 h pour SiHA et 400 °C-2 h pour CHA) ayant subi au préalable un dégazage de 15 h à 200 °C. La valeur de la surface spécifique est déterminée à partir de la mesure de l'isotherme d'adsorption du diazote N<sub>2</sub>.

Les mesures révèlent une surface spécifique (SSA) de 31,4 m<sup>2</sup>/g pour HA, 32,1 m<sup>2</sup>/g pour SiHA et 44,8 m<sup>2</sup>/g pour CHA. Cette dernière possède des grains plus petits dû à une calcination à plus basse température, ce qui explique sa surface spécifique plus élevée.

#### II.2.1.6. Mesure du potentiel zêta

Le potentiel zêta  $\zeta$  représente la charge électrique de surface qu'une particule en suspension acquiert du fait des ions qui l'entourent. Les mesures ont été effectuées avec un Zetasizer nano zs (Malvern Instrument UK) sur les poudres d'HA, de SiHA et de CHA calcinées dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le frittage des pastilles soit 1200 °C durant 30 min sous air pour HA et SiHA et 960 °C pendant 2 h sous CO<sub>2</sub> pour CHA. Des suspensions de poudre calcinée sont préparées avec de l'eau distillée, puis désagglomérées aux ultrasons avant introduction dans la cellule de mesure. L'analyse est réalisée à 25 °C et les valeurs finales sont la moyenne de quatre mesures pour chaque composition.

Les valeurs du potentiel zêta des poudres sont égales à -44±3 mV pour HA, -43±1 mV pour SiHA et -38±2 mV pour CHA. La substitution par les ions carbonates semble influencer la charge globale de surface qui est moins négative comparé à celles de l'hydroxyapatite et de l'hydroxyapatite silicatée.

### II.2.2. Caractérisation des céramiques

Les céramiques denses sont élaborées à partir des poudres d'HA calcinée à 650 °C-30 min, de SiHA calcinée à 700 °C-30 min et de CHA calcinée à 400 °C-2 h. Ces poudres présentent

des surfaces spécifiques de 31,4 m<sup>2</sup>/g pour HA, 32,1 m<sup>2</sup>/g pour SiHA et 44,8 m<sup>2</sup>/g pour CHA (voir paragraphe II.2.1.5) permettant d'obtenir un taux de compaction à cru capable d'assurer le frittage. Les pastilles en HA et en SiHA sont frittées à 1200 °C-30 min sous air et les pastilles en CHA à 960 °C-2h sous CO<sub>2</sub>.

### II.2.2.1. Mesure de densité

La densité apparente des céramiques frittées a été déterminée par la méthode d'Archimède. Cette dernière consiste à réaliser trois pesées pour chaque échantillon. Une pesée des céramiques sèches ( $m_s$ ) est effectuée avant un dégazage d'une heure. Puis, les céramiques sont immergées 30 min dans de l'eau désionisée afin de remplir la porosité ouverte d'eau. Les céramiques sont ensuite repesées immergées dans l'eau ( $m_i$ ). Enfin, les céramiques sont pesées humides avec les pores remplis d'eau ( $m_h$ ). Le taux de densification est alors calculé à partir des relations suivantes :

- Densité apparente :  $d_{\text{Archimède}} = d_{\text{eau}} \frac{m_s}{m_h - m_i}$
- Taux de densification (%):  $\tau = \frac{d_{\text{Archimède}}}{d_{\text{pycno}}} \times 100$

Les densités des céramiques en HA, SiHA et CHA mesurées par pycnométrie à hélium ( $d_{\text{pycno}}$ ) à l'aide d'un appareil Accupyc 1340 Micromeritics sont respectivement de 3,05, 2,97 et 2,90 g/cm<sup>3</sup>. Les céramiques en HA, en SiHA et en CHA présentent respectivement des taux de densification de 98 %, 95 % et 96 %.

### II.2.2.2. Imagerie par microscopie électronique à balayage

La microstructure des échantillons a été observée par microscopie électronique à balayage (MEB) avec un microscope FEG JOEL JSM-7400F. La préparation des échantillons consiste à effectuer une métallisation à l'or-platine d'une dizaine de nanomètres avant leur observation au MEB afin de limiter les effets de charge.

Les micrographies MEB de la surface non polie des céramiques en HA, en SiHA et en CHA sont présentées en Figure 50. La surface des céramiques révèle pour les trois compositions une microstructure dense. La surface de la céramique en CHA (cliché C) montre des grains plus petits avec la présence de quelques porosités résiduelles en comparaison de la surface des céramiques en HA (cliché A) et en SiHA (cliché B).

Le diamètre moyen ( $\phi_{moy}$ ) des grains a été déterminé à partir d'une moyenne d'aire calculée sur la base de 31 grains avec le logiciel ImageJ (NIH- United States, v1.52b) en utilisant la formule suivante :

$$\phi_{moy} = 2x \sqrt{\frac{aire}{\pi}}$$

Les grains des trois compositions ont un diamètre moyen de  $0,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$  pour HA,  $0,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$  pour SiHA et  $0,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$  pour CHA.

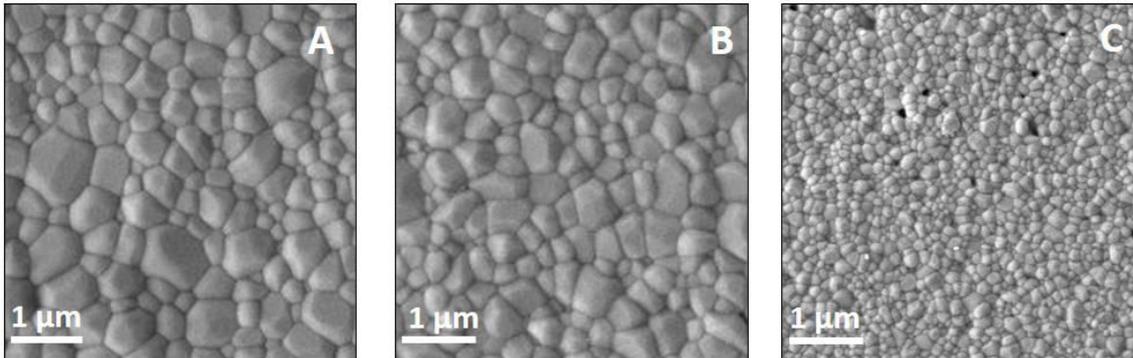


Figure 50 : Clichés MEB de la surface non polie des céramiques (A) en HA, (B) en SiHA frittées à  $1200 \text{ }^\circ\text{C}$ -30 min sous air et (C) en CHA frittée à  $960 \text{ }^\circ\text{C}$ -2 h sous  $\text{CO}_2$ .

Les caractérisations suivantes s'intéressent plus particulièrement à la surface des céramiques.

### II.2.2.3. Mesure de surface spécifique

La surface spécifique des céramiques en HA et en CHA a été obtenue par la méthode BET (Brunauer-Emmett-Teller) avec des isothermes d'adsorption de krypton. Comme attendu, les valeurs des surfaces spécifiques de ces céramiques denses sont très faibles, elles sont de  $0,0012 \text{ m}^2/\text{g}$  pour la composition HA et  $0,0459 \text{ m}^2/\text{g}$  pour celle de CHA.

### II.2.2.4. Analyse par diffraction des rayons X

Les diffractogrammes de la surface des céramiques en HA, en SiHA et en CHA sont présentés en Figure 51. Ils ont été acquis dans les mêmes conditions que pour les poudres. Ils n'ont révélé aucune phase cristallisée secondaire dans les céramiques. Tous les pics de diffraction sont attribués à la phase cristalline de l'apatite (fiche PDF : 9-0432).

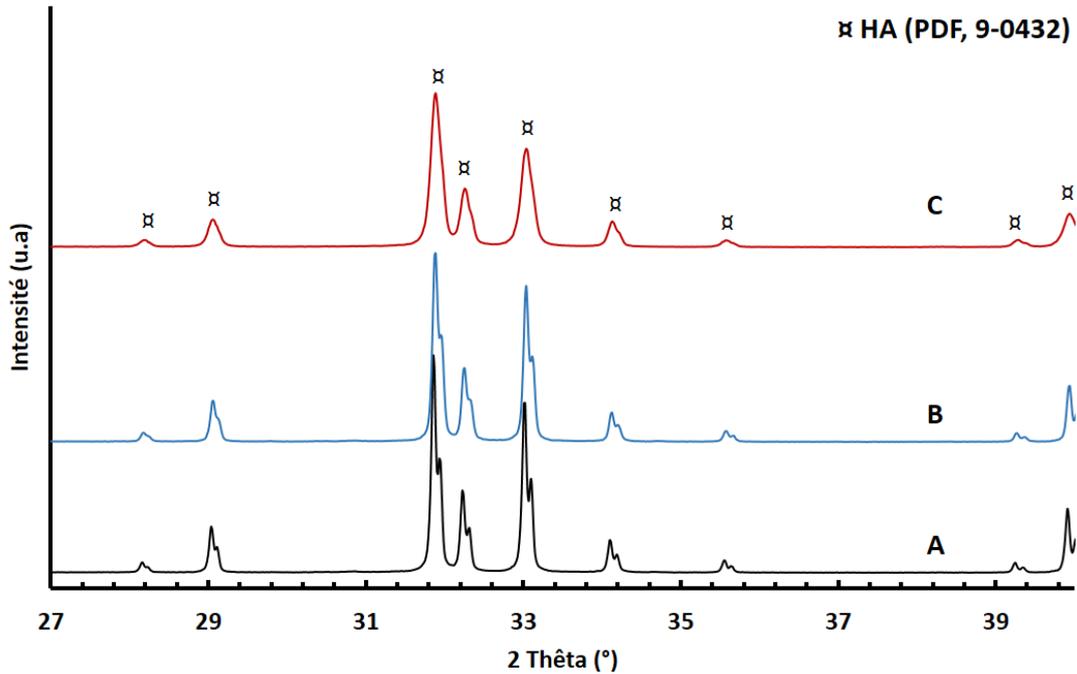


Figure 51 : Diffractogrammes de la surface des céramiques A) en HA et B) en SiHA frittées à 1200 °C-30 min sous air et C) en CHA frittée à 960 °C-2 h sous CO<sub>2</sub>.

### II.2.2.5. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Les spectres FTIR des différentes céramiques frittées (Figure 52) sont semblables à ceux des poudres calcinées. Ils ont été obtenus à partir de poudres grattées à la surface des céramiques et préparées suivant la même procédure que les poudres. Les bandes vibrationnelles communes aux trois compositions sont celles des groupements de phosphates et des groupements hydroxyles. Les bandes caractéristiques des groupements silicates et des groupements carbonates sont détectées respectivement à la surface de la céramique SiHA et CHA. Les trois spectres infrarouges indiquent la disparition des groupements nitrates NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (résidus de synthèse).

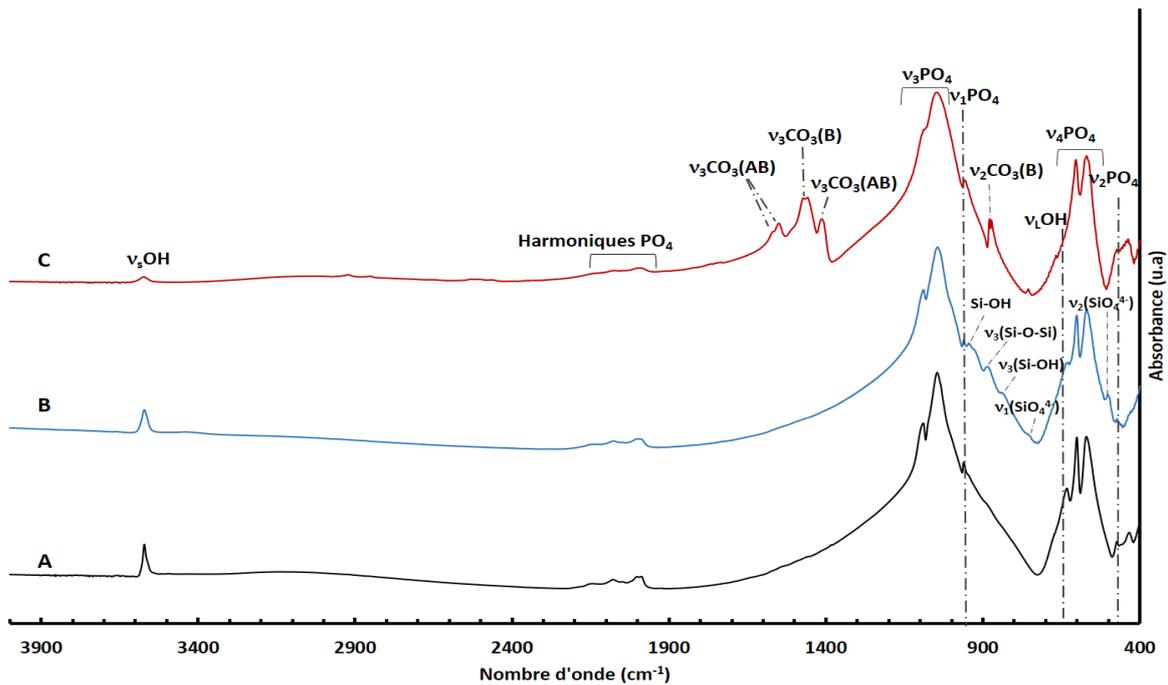


Figure 52 : Spectres FTIR dans l'intervalle 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  des poudres grattées à la surface des céramiques A) en HA et B) en SiHA frittées à 1200 °C-30 min sous air et C) en CHA frittée à 960 °C- 2 h sous  $\text{CO}_2$ .

### II.2.2.6. Analyse par spectroscopie Raman

L'appareillage utilisé est un spectromètre Raman confocal Renishaw inVia Reflex. Cet appareil dispose de deux longueurs d'onde : 532 nm et 785 nm avec différents réseaux holographiques offrant des configurations variées en termes de résolution et de gamme spectrale : 600 traits/mm, 1200 traits/mm, 1800 traits/mm et 2400 traits/mm. Les spectres Raman de la surface des céramiques sont acquis avec une longueur d'onde de 532 nm en mode confocal, avec un objectif x100 et un réseau de 1200 traits/mm. Il s'agit du même appareillage qui sera utilisé pour le suivi de l'évolution de la fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques par imagerie Raman (Chapitre III, paragraphe III.2.1.2.2).

Les spectres Raman acquis à la surface des céramiques denses en HA et en CHA sont présentés au chapitre bibliographique, paragraphe I.4.2.3.2.

La spectroscopie Raman permet d'étudier la structure locale des matériaux et l'imagerie permet d'obtenir une information sur la répartition spatiale des différents éléments présents sur la zone sondée dont le principe est illustré en Figure 53. L'imagerie Raman consiste à choisir une zone d'intérêt à la surface de l'échantillon visualisé grâce à une caméra vidéo. Le laser est ensuite focalisé sur le premier pixel de la zone à analyser et son spectre Raman est enregistré. Une platine motorisée permet de déplacer l'échantillon afin que le laser se refocalise sur le deuxième pixel avec l'acquisition d'un autre spectre Raman et ainsi de suite

jusqu'à la fin de la mesure [233]. Il existe deux modes d'imagerie, le mode « point par point » et le mode « ligne » qui seront détaillés dans le chapitre III (caractérisation de la chimie de surface par imagerie Raman). La Figure 53 illustre également le principe de la reconstruction d'une image Raman sur les bandes caractéristiques des différents éléments présents à la surface d'un échantillon. L'élément majoritaire présent en surface correspond à la zone bleue sur l'image Raman. Celle-ci est reconstruite sur l'intensité intégrée de la bande du spectre C. Les zones oranges et vertes ont été respectivement reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande présente sur les spectres A et B.

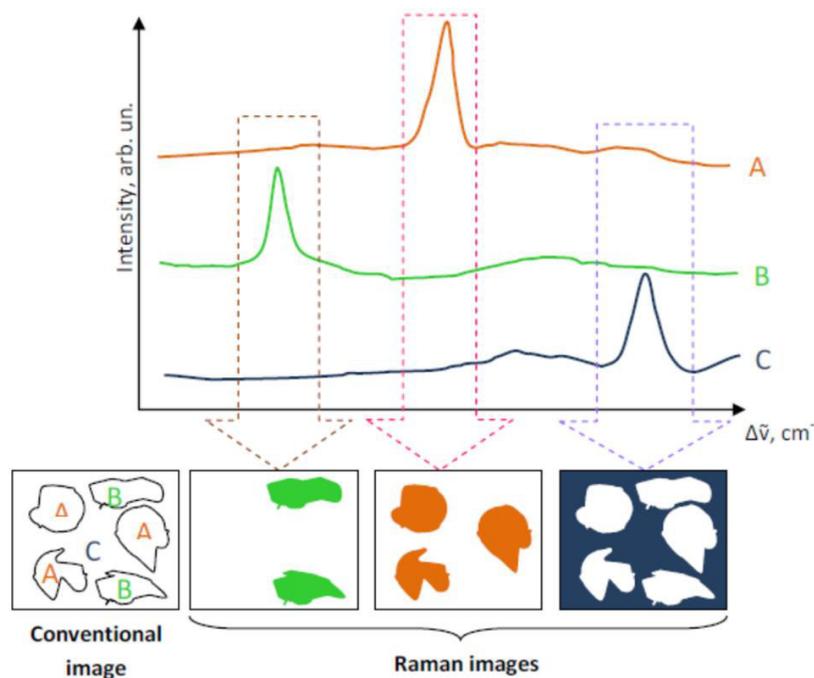
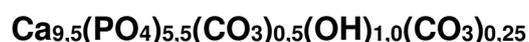


Figure 53 : Principe de l'imagerie Raman [233].

### II.2.2.7. Analyse carbone

Comme l'indique l'analyse par spectroscopie infrarouge, il y a une carbonatation des sites A de l'hydroxyapatite carbonatée (CHA). Cette carbonatation est induite lors du frittage ce qui conduit à une composition en ions carbonates mixte (sites A/B). Le pourcentage massique en carbone obtenu sur la céramique en CHA frittée à 960 °C-2 h sous CO<sub>2</sub> et broyée est de 0,94 %m. Le pourcentage massique en carbonates calculé est alors de 4,74 %m. Sur la base des analyses en spectroscopie infrarouge, le résultat obtenu a permis de remonter à la formule ci-dessous laquelle correspond à une céramique en CHA présentant une substitution mixte A/B :



### II.2.2.8. Spectroscopie de photoélectrons X

La spectroscopie de photoélectrons X (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*) permet d'obtenir la composition chimique de l'extrême surface d'un matériau. Les mesures ont été réalisées avec un spectromètre Axis Ultra DLD (Kratos Analytical Ltd) en utilisant la radiation monochromatique  $K\alpha$  de l'aluminium (1486,6 eV) avec une tension d'accélération de 15 kV et un courant de 12 mA. La surface d'analyse est de 300  $\mu\text{m}$  par 700  $\mu\text{m}$  avec une profondeur d'environ 5 nm. L'énergie de passage est de 160 eV pour les spectres larges (pas de 0,5 eV) et de 40 eV pour les spectres de haute résolution (pas de 0,1 eV). Les spectres obtenus sont repositionnés en utilisant le pic de  $2p_{3/2}$  du calcium (Ca  $2p_{(3/2)}$ ) à 347,0 eV. La correction du bruit de fond est réalisée par la méthode de Shirley. La nature des liaisons chimiques et les pourcentages atomiques des éléments sont obtenus après décomposition des spectres de haute résolution à l'aide du logiciel Casa XPS. Cette technique d'analyse est non destructive.

Les spectres larges XPS acquis à la surface des céramiques en HA, en SiHA et en CHA sont présentés sur la Figure 54. Les pics caractéristiques des éléments calcium (Ca 2p, Ca 2s, Ca 3s et Ca 3p), phosphore (P 2s et P 2p), oxygène (O 1s) et carbone (C 1s) sont communs aux trois compositions chimiques. Le pic caractéristique du silicium (Si 2s) apparaît pour SiHA. Une légère modification du pic du carbone (C 1s) est observée dans le cas de CHA. Les deux pics à 551 et 565 eV sont attribués aux plasmons de l'atome d'oxygène (photoélectrons de l'oxygène 1 s ayant perdu une partie de leur énergie).

Une décomposition (acquisition haute résolution) des pics caractéristiques des éléments Ca, P, O, C et Si est présentée en Figure 55. Les différentes contributions des éléments chimiques sont les suivantes :

- le pic Ca 2p présente deux contributions identiques pour les trois compositions chimiques. La première à 346,9 eV est attribuée aux photoélectrons Ca  $2p_{(3/2)}$  et la deuxième autour de 350,4 eV aux photoélectrons Ca  $2p_{(1/2)}$  [234] ;
- le pic P 2p présente également deux contributions identiques pour les trois céramiques. La première contribution autour de 132,6 eV est associée aux photoélectrons P  $2p_{(3/2)}$  [235] et la deuxième à 134,4 et 134 eV pour CHA et SiHA et à 133,8 eV pour HA aux photoélectrons P  $2p_{(1/2)}$  [236] ;
- le pic O 1s présente dans tous les cas, trois contributions. La première contribution à 530,7 eV correspond aux liaisons P-O et Si-O pour SiHA [61], [237]. La contribution autour de 531,8 eV pour HA et CHA et à 532,2 eV pour SiHA est attribuée à la liaison O-H. Enfin la contribution observée autour de 533 eV est due à l'eau adsorbée à la surface [238], [239] ;

- le carbone présent à la surface des céramiques HA et SiHA est du carbone résiduel (pollutions présentes dans la chambre d'analyse XPS). Le pic C 1s présente quatre contributions pour les trois compositions chimiques. La première à 284,7, 284,3 et 284,9 eV pour HA, CHA et SiHA est attribuée aux liaisons C-C et C-H [240], [241]. Celle à 286,2 eV pour HA, 285,4 eV pour CHA et 286,3 eV pour SiHA est attribuée aux liaisons C-O [240]. Les contributions observées sur HA, CHA et SiHA et qui sont respectivement à 288,3 eV, 287,9 eV, 288,0 eV concernent les liaisons C(=O)O [241], [242]. La seule différence entre les trois compositions est la contribution observée à 289,1 eV à la surface de la céramique en CHA laquelle est nettement plus importante que pour les compositions en HA (289,3 eV) et en SiHA (288,7 eV). Celle-ci est attribuée aux carbonates CO<sub>3</sub> incorporés dans la structure apatite [241], [243], [244] ;
- le pic Si 2p est observé uniquement à la surface de la céramique SiHA. La contribution à 101,1 eV est généralement attribuée aux liaisons O-Si-O [61], [240], [235].

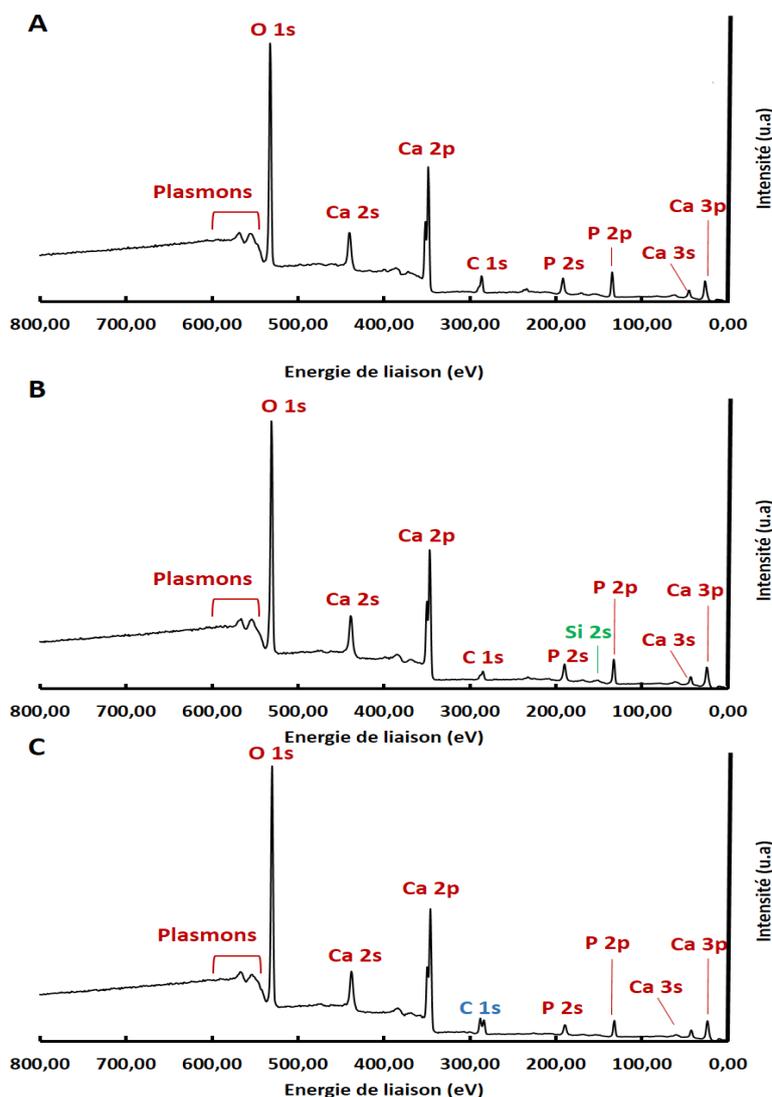


Figure 54 : Spectres XPS larges des surfaces des céramiques A) en HA, B) en SiHA et C) en CHA.

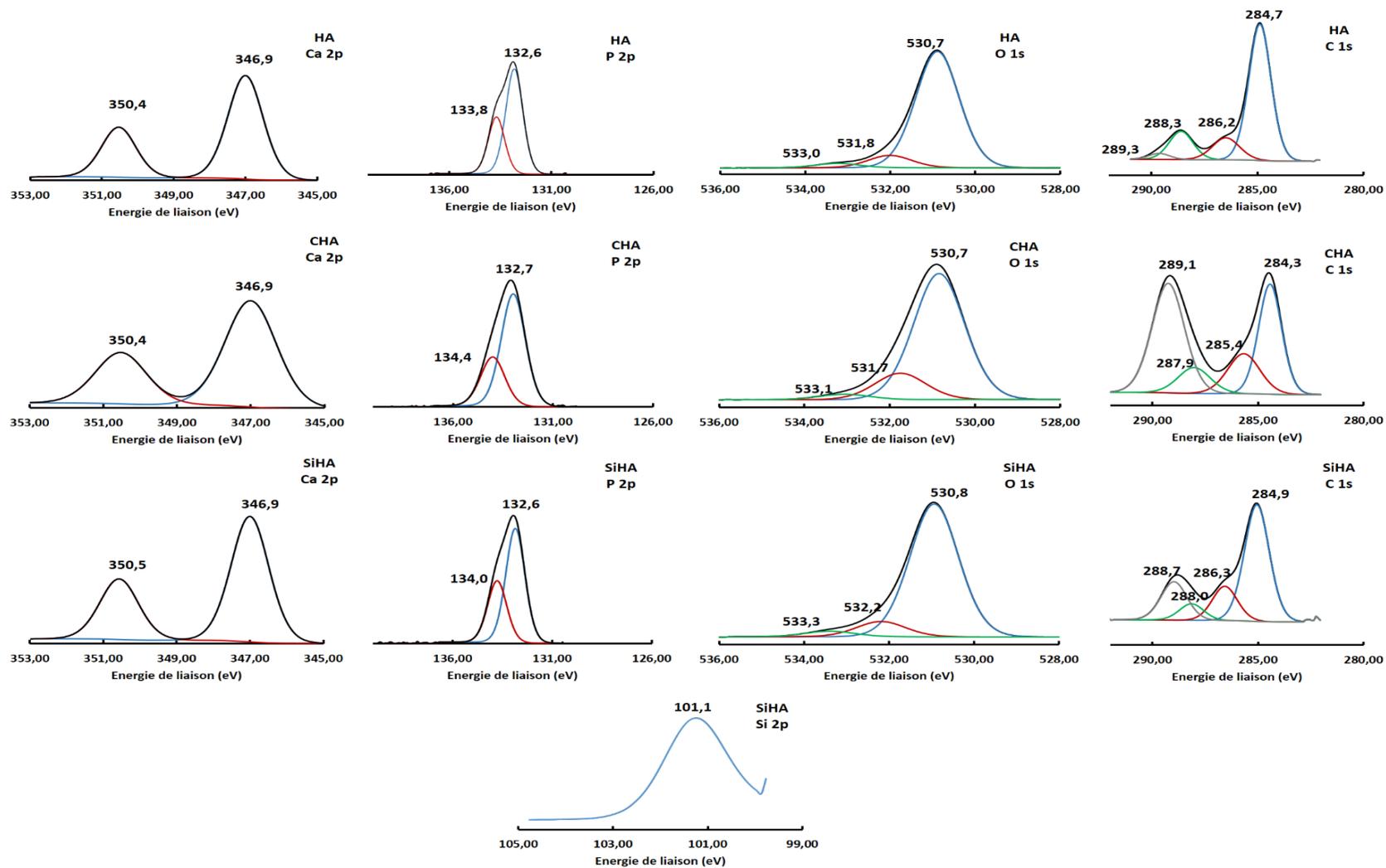


Figure 55 : Décomposition des pics XPS Ca 2p, P 2p, O 1s, C 1s et Si 2p (Echelle : abscisse = énergie de liaison en eV et ordonnée = intensité en (u.a)).

### II.2.2.9. Imagerie par microscopie à force atomique

L'état de surface des échantillons non polis et polis est observé avec un microscope à force atomique (*AFM pour Atomic force microscopy*) 5500 de chez AGILENT (nouvellement KEYSIGHT) en mode contact. Les mesures sont effectuées avec des pointes en nitrure de silicium ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) ayant une fréquence d'oscillation comprise entre 200 et 400 kHz et une constante de raideur de 13-77 N/m. La pointe fixée sur le scanner balaye la surface à étudier à une distance de l'ordre de quelques nanomètres en mode contact. La rugosité surfacique ( $S_a$ ) est déterminée à partir des images AFM de taille  $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$  à l'aide du logiciel en libre accès Gwyddion 2.42. Ce type de rugosité est l'extension du paramètre Ra (hauteur moyenne arithmétique d'une ligne ici de longueur  $5 \mu\text{m}$ ). Il s'agit d'une moyenne arithmétique, en valeur absolue entre la hauteur de chaque point et le plan moyen de la surface. La rugosité surfacique ( $S_a$ ) est calculée selon l'équation suivante :

$$S_a = \frac{1}{A} \iint_A |Z(x, y)| dx dy \text{ (en nm) avec } \begin{cases} A = \text{surface étudiée} \\ Z = \text{écart à la hauteur moyenne} \end{cases}$$

La topographie des trois céramiques denses et non polies en HA, en SiHA et en CHA est présentée en Figure 56. Les images AFM de surface sont présentées avec une échelle de hauteur en nm. Les céramiques en HA (image A) et en SiHA (image B) présentent un état de surface assez similaire avec une rugosité surfacique ( $S_a$ ) de 21 nm pour HA et 23 nm pour SiHA. La surface de la céramique CHA (image C) montre des grains plus petits que ceux de l'hydroxyapatite ou de l'hydroxyapatite silicatée avec une rugosité moins élevée (16 nm).

L'état de surface des céramiques denses et polies en HA, en SiHA et en CHA est présenté à la Figure 57. Les surfaces de la céramique en HA (image A) et celle en SiHA (image B) présentent la même rugosité surfacique ( $S_a = 4 \text{ nm}$ ). La surface de la céramique en CHA (image C) présente une rugosité surfacique ( $S_a$ ) de 2 nm qui est très légèrement inférieure à celle des céramiques en HA et en SiHA.

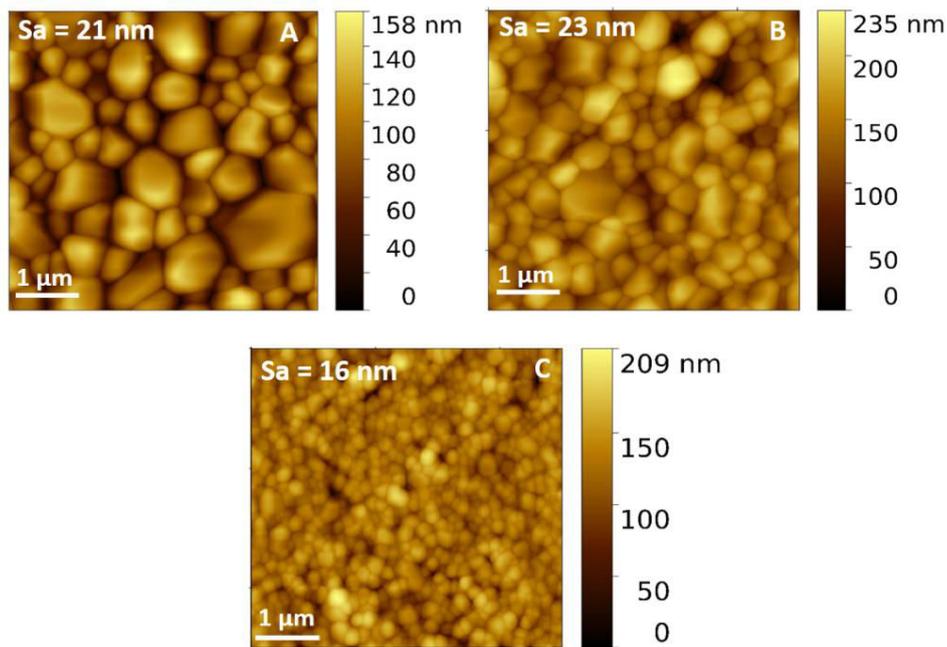


Figure 56 : Image AFM en mode contact de la surface des céramiques non polies (A) en HA, (B) en SiHA et (C) en CHA.

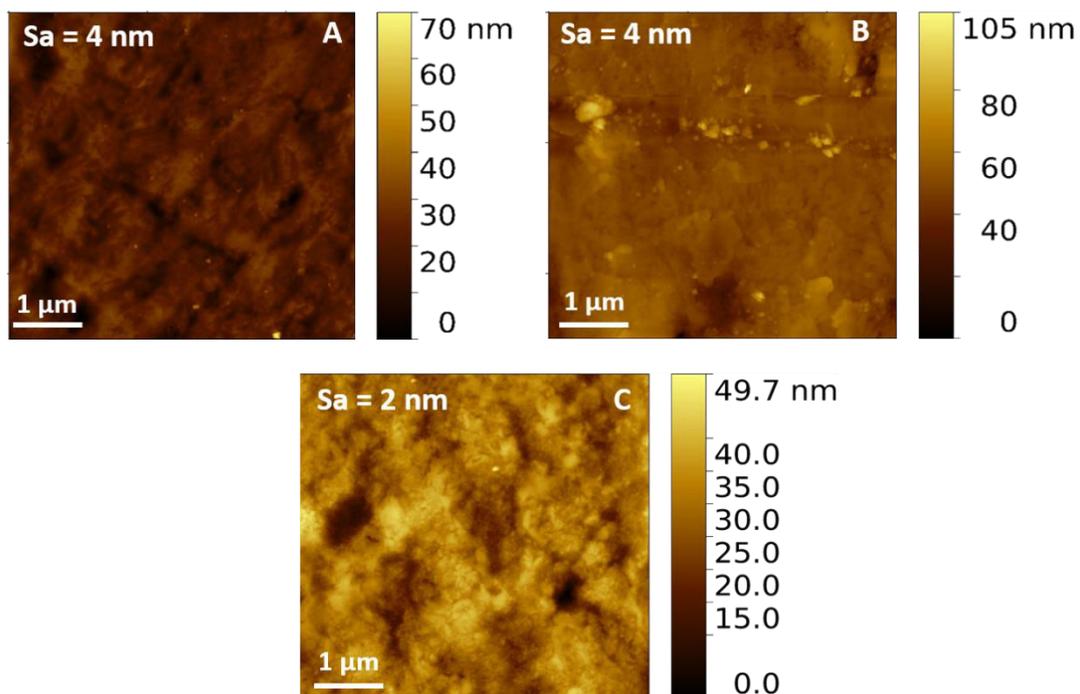


Figure 57 : Images AFM en mode contact de la surface des céramiques polies (A) en HA, (B) en SiHA et (C) en CHA.

### II.2.2.10. Détermination de l'énergie de surface

Le but de la détermination de l'angle de contact est de préciser la mouillabilité et de calculer l'énergie de surface  $\gamma_s$  des céramiques denses et polies en HA, en SiHA, en CHA. Les mesures sont réalisées avec un goniomètre Digidrop GBX relié à une caméra. La mouillabilité consiste à établir des forces interfaciales s'exerçant entre un liquide et une surface solide. Ces forces

sont de nature dispersive (interactions de London : champ induit) ou polaire (interactions de Debye : effet inducteur, interactions de Keesom : dipôle-dipôle) et des liaisons hydrogène. L'énergie de surface ( $\gamma_s$ ) est la somme des contributions dispersives ( $\gamma^d$ ) et des contributions polaires ( $\gamma^p$ ) :

$$\gamma_s = \gamma^d + \gamma^p$$

La Figure 58 représente les forces appliquées entre une goutte de liquide et une surface solide. L'équilibre des forces à l'extrémité de la goutte peut s'exprimer en fonction de l'énergie de surface solide ( $\gamma_s$ ), de l'énergie solide liquide par ( $\gamma_{sL}$ ) et de l'énergie du liquide ( $\gamma_L$ ) en utilisant la relation simplifiée de Young suivante :

$$\gamma_s - \gamma_{sL} = \gamma_L \cdot \cos \theta$$

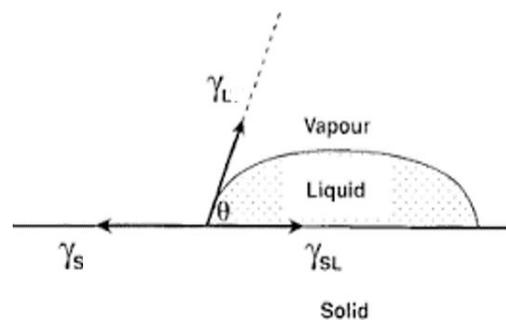


Figure 58 : Forces appliquées entre une goutte de liquide et une surface solide.

[http://phyexpdoc.script.univ-paris-diderot.fr/projets/\\_sites\\_01\\_02\\_2/goutte/Approchetheorique.html](http://phyexpdoc.script.univ-paris-diderot.fr/projets/_sites_01_02_2/goutte/Approchetheorique.html)/date de consultation : 03/09/2018

La relation d'Owens-Wendt ci-dessous permet de déterminer les composantes dispersives  $\gamma_s^d$  et polaires  $\gamma_s^p$  de la surface de la céramique à partir des angles de contact ( $\theta$ ) mesurés avec différents liquides dont les tensions superficielles  $\gamma_L^p, \gamma_L^d$  sont connues :

$$\frac{(1 + \cos \theta) \cdot \gamma_L}{2\sqrt{\gamma_L^d}} = \sqrt{\gamma_s^d} + \sqrt{\gamma_s^p} \times \frac{\sqrt{\gamma_L^p}}{\sqrt{\gamma_L^d}}$$

Le Tableau 6 regroupe les valeurs des tensions superficielles  $\gamma_L$  des trois solvants utilisés : l'eau distillée ( $H_2O$ ), le diiodométhane ( $CH_2I_2$ ) et l'éthylène glycol ( $HO-(CH_2)_2-OH$ ). D'un point de vue expérimental, le volume de goutte déposée pour l'eau et l'éthylène glycol est de 3,1  $\mu L$  alors que pour le diiodométhane, qui est plus visqueux, le volume de goutte est de 1,9  $\mu L$ .

Solvants	$\gamma_L$ (mN/m)	$\gamma_L^d$ (mN/m)	$\gamma_L^p$ (mN/m)	Polarité
Eau (H <sub>2</sub> O)	72,0	21,3	50,7	polaire
Diiodométhane (CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub> )	50,3	49,9	0,4	apolaire
Éthylène glycol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> )	48,4	29,3	19,1	polarité moyenne

Tableau 6 : Caractéristiques des différents solvants utilisés pour la mesure d'angle de contact.

L'angle de contact utilisé pour la détermination de l'énergie de surface solide ( $\gamma_s$ ) est l'angle de contact moyen  $\theta_m$  calculé à partir des angles de contact gauche ( $\theta_g$ ) et droite ( $\theta_d$ ). Le mode utilisé pour le calcul des angles de contact moyens est le mode polynomial. Une régression linéaire est alors effectuée à partir des données expérimentales pour extraire les composantes

dispersive ( $\gamma_s^d$ ), et polaire ( $\gamma_s^p$ ) en traçant la variation de  $\frac{(1+\cos\theta) \cdot \gamma_L}{2\sqrt{\gamma_L^d}}$  en fonction de  $\frac{\sqrt{\gamma_L^p}}{\sqrt{\gamma_L^d}}$  d'après

la relation d'Owens-Wendt. En effet, cette équation peut s'écrire sous la forme  $y = ax + b$  avec :

$$x = \frac{\sqrt{\gamma_L^p}}{\sqrt{\gamma_L^d}} \qquad y = \frac{(1+\cos\theta) \cdot \gamma_L}{2\sqrt{\gamma_L^d}}$$

$$a = \sqrt{\gamma_s^p} \qquad b = \sqrt{\gamma_s^d}$$

Les valeurs des angles de contact moyens ( $\theta_m$ ) sont regroupées dans le Tableau 7 et les données nécessaires calculées au tracé de la relation d'Owens-Wendt sont présentées dans le Tableau 8.

Les graphiques donnant la variation de  $y$  en fonction de  $x$  sont présentés en Figure 59. Les termes des différentes contributions dispersives ( $\gamma_s^d$ ), polaires ( $\gamma_s^p$ ) et l'énergie de surface ( $\gamma_s$ ) des échantillons sont donnés dans le Tableau 9.

Les trois céramiques présentent des surfaces hydrophiles, ce qui correspond à l'établissement de liaisons hydrogènes entre le solvant et la surface de la céramique. En effet, l'angle de contact moyen ( $\theta_m$ ) obtenu à la surface de la céramique en HA avec l'eau distillée est de  $56 \pm 4^\circ$  ce qui est nettement inférieur à  $90^\circ$  indiquant une surface hydrophile. Les surfaces des céramiques en CHA et en SiHA indiquent une mouillabilité légèrement plus importante que celle de l'HA avec des angles de contact moyens respectifs de  $50 \pm 2$  et  $51 \pm 2^\circ$ . Le fait que la mouillabilité de l'HA soit légèrement inférieure à celles des céramiques en SiHA et CHA se retrouve également au niveau des composantes polaires ( $\gamma_s^p$ , Tableau 9). La composante polaire pour la céramique en HA est très légèrement inférieure aux deux autres. Les

composantes dispersives étant identiques ( $\gamma_s^d$ , Tableau 9), cela conduit à des énergies de surface proches pour les trois céramiques : 48 mN/m pour HA, 50 mN/m pour SiHA et 49 mN/m pour CHA. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles trouvées en littérature à savoir de 42,9 mN/m pour HA et 45,5 mN/m pour SiHA [53].

Céramiques	Angle de contact moyen $\theta_m$ (°)		
	Eau distillée	Diiodométhane	Ethylène glycol
HA	56 ± 4	39 ± 1	39 ± 2
SiHA	50 ± 2	33 ± 3	40 ± 2
CHA	51 ± 2	38 ± 1	37 ± 2

Tableau 7 : Angles de contact moyens obtenus à la surface des différentes céramiques.

Solvants	Eau		Diiodométhane		Ethylène glycol	
	y	x	y	x	y	x
Composition	$\frac{(1 + \cos\theta_m) \times \gamma_l}{2\sqrt{\gamma_l^d}}$	$\frac{\sqrt{\gamma_l^p}}{\sqrt{\gamma_l^d}}$	$\frac{(1 + \cos\theta_m) \times \gamma_l}{2\sqrt{\gamma_l^d}}$	$\frac{\sqrt{\gamma_l^p}}{\sqrt{\gamma_l^d}}$	$\frac{(1 + \cos\theta_m) \times \gamma_l}{2\sqrt{\gamma_l^d}}$	$\frac{\sqrt{\gamma_l^p}}{\sqrt{\gamma_l^d}}$
HA	12,15		6,32		7,93	
SiHA	12,86	1,54	6,53	0,09	7,91	0,8
CHA	12,73		6,36		8,05	

Tableau 8 : Valeurs y et x obtenues à partir des mesures d'angle de contact pour les céramiques en HA, en SiHA et en CHA.

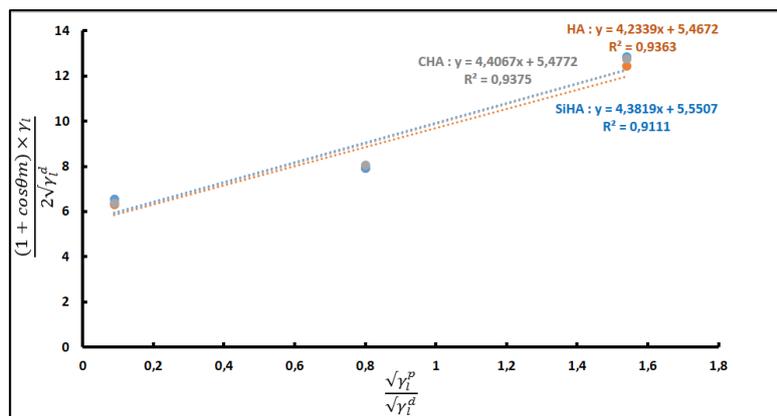


Figure 59 : Représentation graphique de la relation d'Owens-Wendt pour les céramiques en HA, en SiHA et en CHA.

composition	$a = \sqrt{\gamma_s^p}$	$\gamma_s^p$	$b = \sqrt{\gamma_s^d}$	$\gamma_s^d$	$\gamma_s = \gamma_s^p + \gamma_s^d$
HA	4,23	18	5,46	30	48
SiHA	4,38	19	5,55	31	50
CHA	4,40	19	5,47	30	49

Tableau 9 : Valeurs des interactions polaires et dispersives ainsi que les énergies de surface en mN/m des différentes céramiques en HA, en SiHA et en CHA.

### II.2.3. Conclusion

En conclusion, les poudres d'HA, de SiHA et de CHA sont monophasées et présentent une seule phase de structure apatite permettant ainsi l'élaboration de céramiques denses. Les températures de frittage 1200 °C-30 min sous air pour HA et SiHA et 960 °C-2 h sous CO<sub>2</sub> pour CHA ont permis d'obtenir des céramiques avec un taux de densification supérieur à 90 %. D'un point de vue microstructure, la substitution par le silicium ralentit la cinétique du frittage, d'où un taux de densification et une taille de grains légèrement inférieurs par rapport à HA. Les hydroxyapatites carbonatées densifient à plus basse température, ce qui aboutit à des tailles de grains sensiblement plus petites. Les céramiques denses sont également monophasées et les substitutions par le silicium et les carbonates ont bien eu lieu. Les céramiques ont donc les compositions chimiques suivantes :

- hydroxyapatite stœchiométrique, HA :  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
- hydroxyapatite silicatée, SiHA :  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,6}(\text{SiO}_4)_{0,4}(\text{OH})_{1,6}$
- hydroxyapatite carbonatée type A/B, CHA :  $\text{Ca}_{9,5}(\text{PO}_4)_{5,5}(\text{CO}_3)_{0,5}(\text{OH})_{1,0}(\text{CO}_3)_{0,25}$

Le Tableau 10 regroupe les principales caractéristiques des céramiques phosphocalciques en HA, en SiHA et en CHA.

		HA	SiHA	CHA
<b>Taux de densification (%)</b>		98	95	96
<b>Taille de grains (µm)</b>		0,7 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,1
<b>Surface spécifique (m<sup>2</sup>/g)</b>		0,0012	0,06	0,00459
<b>Rugosité surfacique Sa (nm)</b>	<b>Non poli</b>	21	23	16
	<b>Poli</b>	4	4	2
<b>Angle de contact moyen (eau) (°)</b>		56 ± 4	50 ± 2	51 ± 2
<b>Energie de surface (mN/m)</b>		48	50	49
<b>Potentiel Zêta (mV)</b>		-44 ± 3	-43 ± 1	-38 ± 2

Tableau 10 : Récapitulatif des caractéristiques des céramiques en HA, en SiHA et en CHA.

## II.3. Fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

La fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques par le VEGF nécessite une préfonctionnalisation par des agents intermédiaires tels qu'un *cross linker* et un *spacer* (chapitre bibliographique, paragraphe I.3.2.2.2). Un protocole réactionnel d'immobilisation de la protéine basé sur trois étapes a été mis en place : silanisation de la surface de la céramique, addition d'un *spacer* et addition du VEGF. La chimie de surface ainsi que la répartition surfacique des molécules organiques feront l'objet d'un suivi par imagerie Raman.

### II.3.1. Présentation générale du protocole expérimental

Le protocole multi-étapes utilisé uniquement pour la fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques en HA et en CHA par le VEGF consiste, dans un premier temps, à fonctionnaliser la surface des céramiques par un *cross linker* l'APTES (3-aminopropyltriéthoxysilane) qui dispose de groupes fonctionnels amines ( $-NH_2$ ) et d'une taille d'environ 1 nm. La deuxième étape est l'addition d'un polyéthylène glycol difonctionnel noté SM(PEG)<sub>6</sub> possédant une fonction NHS ester et une fonction maléimide, la taille de cette molécule est d'environ 3,25 nm. La fonction NHS ester réagit avec les groupes fonctionnels  $-NH_2$  de l'APTES afin d'établir des fonctions amide. La dernière étape est celle qui permettra la fixation du VEGF, ce dernier étant au préalable thiolé (ajout d'une liaison SH) afin de réagir avec la fonction maléimide du SM(PEG)<sub>6</sub>.

Un premier protocole expérimental a été établi au sein du laboratoire pour la fonctionnalisation de céramiques en hydroxyapatite silicatée (SiHA) par de la BMP-2 (pour *Bone morphogenetic protein*) [70]. La Figure 60 présente le mécanisme réactionnel général. L'étape (1) représente la silanisation de surface de la céramique en SiHA et a été réalisée en milieu anhydre (toluène). Les étapes 2) et 3) correspondent respectivement à l'addition du SM(PEG)<sub>6</sub> et de la BMP-2. Ces deux étapes ont été réalisées en milieu aqueux (PBS 10X<sup>12</sup>). L'imagerie Raman a mis en évidence des problèmes de précipitation de sels en surface des céramiques liés à l'utilisation du PBS 10X pour la fixation du SM(PEG)<sub>6</sub> et du VEGF, ce qui conduit à la modification du protocole expérimental. Ces points seront abordés en détail dans le Chapitre III, paragraphe III.2.1.2.2.1.

Le nouveau protocole expérimental adopté pour la fonctionnalisation des céramiques en HA et en CHA par le VEGF est présenté en Figure 61. La solution de PBS 10X a été remplacée par du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour les étapes 2 et 3.

---

<sup>12</sup> Tampon phosphate salin PBS 10X : 10 fois plus concentré que le PBS 1X. Il s'agit d'un mélange de plusieurs réactifs : 137 mmol NaCl, 2,7 mmol KCl, 10 mmol Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mmol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

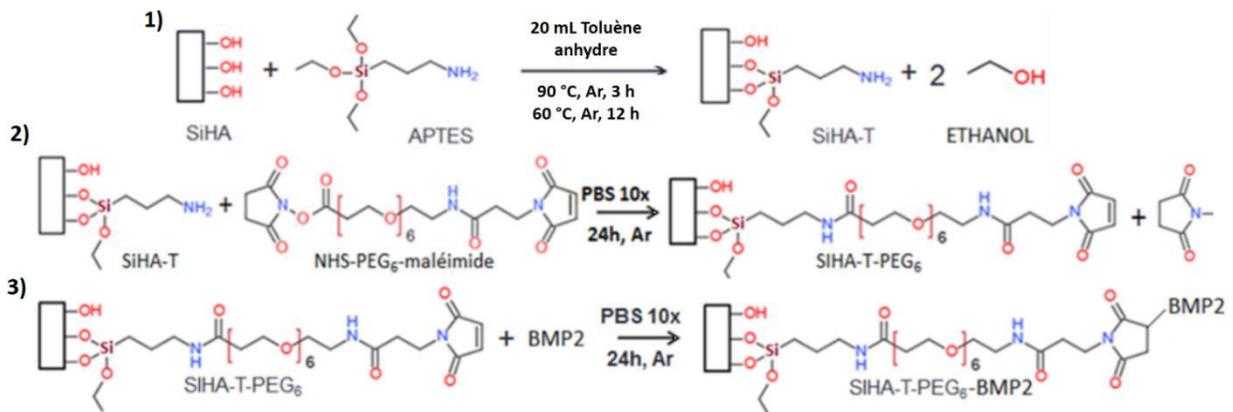
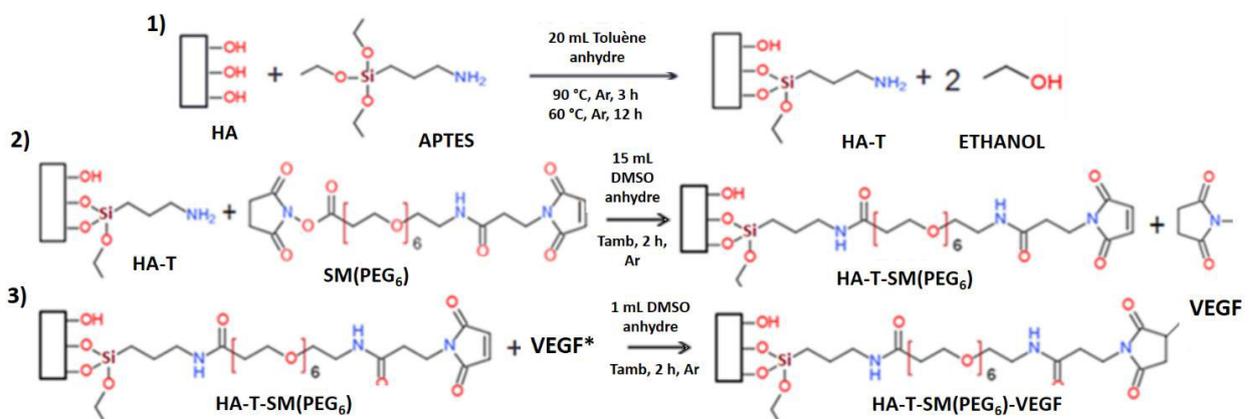


Figure 60 : Schéma réactionnel général de la fonctionnalisation de surface de céramique SiHA par la BMP-2 [70].



\* VEGF thiolé avec le réactif de Traut

Figure 61 : Schéma réactionnel général de la fonctionnalisation de surface des céramiques en HA et en CHA par le VEGF.

### II.3.2. 1<sup>ère</sup> étape : silanisation

La réaction de silanisation s'effectue dans un ballon 4 cols (Figure 62). Les céramiques sont au préalable séchées dans une étuve à 100 °C pendant 3h. Elles sont ensuite placées dans le ballon 4 cols sous flux d'argon. 20 mL de toluène anhydre ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ , liquide, 99,8 %, Alfa Aesar) sont ajoutés. Puis l'ensemble est dégazé (3 cycles : 5 min argon / 5 min vide) afin d'éliminer l'eau qui pourrait s'être incorporée lors du prélèvement du solvant. Le ballon est ensuite chauffé à 60 °C puis 1 mL du silane 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES- $\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$ , 99%, Sigma Aldrich) est introduit. Une agitation magnétique par le haut est alors lancée et la température du mélange est montée jusqu'à 90 °C. La réaction est maintenue dans ces conditions pendant 3 h. La température est ensuite baissée à 60°C avec un arrêt du flux d'argon. Le système est maintenu dans ces conditions pendant 12 h. Puis, les céramiques sont récupérées, rincées deux fois sous ultrasons dans du toluène anhydre et une troisième fois dans l'éthanol. Chaque lavage dure 5 min. Les céramiques sont séchées dans une étuve à 100 °C pendant 4 h puis remises sous vide à 40 °C pendant 3 h.



Figure 62 : Montage expérimental pour la réaction de silanisation

### II.3.3. 2<sup>ème</sup> étape : addition du SM(PEG)<sub>6</sub>

Lors de cette étape, une solution du polyéthylène glycol (NHS-PEG<sub>6</sub>-maleimide, *succinimidyl-[(N-maleimidopropionamido)-hexaethyleneglycol]* ester, 601,60 g/mol, 32,5 Å, Thermo Fisher Scientific) est préparée à une concentration de 3 mmol/L dans 10 mL de diméthylsulfoxyde anhydre (DMSO-C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, ≥ 99,9 %, Sigma Aldrich) sous argon. La pesée doit être rapide car le SM(PEG)<sub>6</sub> solide conservé à -20 °C se liquéfie à température ambiante.

La céramique silanisée est mise dans un ballon 4 cols dans 20 mL de DMSO anhydre sous argon et sous une agitation magnétique par le haut à température ambiante. Ensuite, 1 mL de la solution du SM(PEG)<sub>6</sub> est introduit dans le ballon puis 0,6 mL de triéthylamine ((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N, 99 %, pure, Acros Organics) qui sert de catalyseur de la réaction. L'ensemble est maintenu dans ces conditions pendant 2 h. Enfin la céramique est retirée et rincée de la même façon que pour l'étape de silanisation. La céramique est stockée dans un dessiccateur.

### II.3.4. 3<sup>ème</sup> étape : addition du VEGF

La fonctionnalisation par le VEGF (Recombinant human VEGF<sub>165</sub>, 10 µg, PeproTech) nécessite une thiolation au préalable de la protéine. Le VEGF ne contient pas de cystéine libre ayant un groupe sulfhydryle (-SH) disponible et pouvant réagir avec les fonctions maléimides du SM(PEG)<sub>6</sub>. En effet, toutes les cystéines présentes dans le VEGF sont impliquées dans les ponts disulfures. Le VEGF est donc thiolé par le réactif de Traut, le 2-Iminothiolane hydrochloride (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>NS, HCl, poudre, ≥98 %, Sigma Aldrich). Des groupements thiols sont ainsi ajoutés aux amines primaires du VEGF afin que la protéine puisse être liée au SM(PEG)<sub>6</sub>.

La thiolation est effectuée selon le protocole fourni par Thermo Fisher. Il s'agit de réaliser un mélange à 3 équivalents de réactif de Traut par rapport au VEGF pour que le réactif soit en

excès afin de favoriser la réaction de thiolation. Pour cela, une solution de réactif de Traut est préparée par dilution de 10 mg du réactif dans 5 mL de PBS 1X. Cette première solution est diluée 1000 fois afin d'obtenir une solution de concentration finale de 2 µg/mL. Un tube contenant 10 µg de VEGF lyophilisé est repris dans 400 µL de PBS 1X puis 55 µL de la solution du réactif de Traut sont ajoutés. Le mélange est alors incubé pendant 1h à température ambiante sous agitation sur un agitateur orbital. Le VEGF thiolé (VEGF-SH) est ensuite concentré par des centrifugations successives dans des tubes d'ultrafiltration Amicon Ultra 0,5-30K (15 min à 3620 rpm, puis 2 min à 3059 rpm), ce qui permet également d'éliminer le réactif de Traut en excès. L'ultrafiltration permet d'obtenir théoriquement 30 µL de solution VEGF-SH à 333 µL/mL qui sont dilués par la suite afin d'obtenir une solution de VEGF-SH concentrée à 10 µg/mL.

A la suite de l'étape d'addition du SM(PEG)<sub>6</sub>, la céramique est mise dans un petit pilulier sous argon. Un mélange de 1mL de DMSO auquel ont été ajoutés 0,1 mL de VEGF-SH à 10 µg/mL est alors introduit et l'ensemble est porté sous agitation sur un plateau agitateur orbital pendant 2h à température ambiante. Enfin, la céramique est retirée et rincée sous ultrasons dans du DMSO pendant 2 min et lyophilisée pendant une nuit.



## **Chapitre III. Apport à la compréhension de la fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques**

---

Ce chapitre porte sur la compréhension et la mise en évidence de la fonctionnalisation de céramiques phosphocalciques par des outils appropriés à la caractérisation des biomolécules : la spectroscopie de force et l'imagerie Raman.

La première partie des résultats concerne les interactions physiques entre la fibronectine (protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire) et des céramiques denses phosphocalciques en hydroxyapatite (HA), en hydroxyapatite silicatée (SiHA) et en hydroxyapatite carbonatée (CHA). La mise en place du montage expérimental en milieu liquide ainsi que l'acquisition et le traitement des images AFM force-volume seront détaillés. L'interprétation des images AFM force-volume obtenues sera discutée en s'appuyant sur l'influence de la composition chimique et de la topographie des céramiques.

La deuxième partie concerne le suivi de l'évolution de la fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques par imagerie Raman. Les différentes étapes de fonctionnalisation par la protéine du VEGF (protéine impliquée dans l'angiogenèse) des céramiques denses en hydroxyapatite (HA) et en hydroxyapatite carbonatée (CHA) seront mises en évidence par la réalisation d'images Raman. L'acquisition ainsi que l'interprétation des images Raman seront présentées accompagnées d'une estimation de la quantité des molécules organiques présentes en surface.

### **III.1. Compréhension des interactions physiques protéine d'adhésion-céramique**

Le but de cette étude est d'évaluer l'affinité de la fibronectine pour des céramiques phosphocalciques en hydroxyapatite (HA), en hydroxyapatite silicatée (SiHA) et en hydroxyapatite carbonatée (CHA). L'attachement et l'étalement des cellules ostéoblastes se font à travers les protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire telles que la fibronectine et dépend alors de l'adsorption de celle-ci sur des matériaux phosphocalciques [8], [245], [88]. En effet, plus l'affinité de la fibronectine pour le matériau sera élevée, plus les cellules vont adhérer.

La mesure des forces d'adhésion entre la fibronectine et les céramiques phosphocalciques a été initiée au laboratoire dans le cadre des travaux de Master de Marie Lasgorceix. Cependant, les mesures étaient ponctuelles ne mettant pas en évidence l'influence nette de la composition chimique et de la topographie des céramiques. Pour cela, des forces d'adhésion entre la fibronectine et les céramiques ont été mesurées en réalisant des images AFM force-volume en milieu liquide (eau) à 37 °C permettant d'avoir un rendu en deux dimensions des

interactions céramiques/protéines. La mise en place de ces mesures a été faite lors des travaux de post-doctorat de David Siniscalco dans l'équipe biocéramiques, puis poursuivie et améliorée lors des présents travaux.

Le but des images AFM force-volume est d'évaluer l'affinité de la fibronectine pour une surface phosphocalcique avec une étude statistique sur les forces d'adhésion. Ce travail en milieu liquide nécessite la mise en place d'un montage expérimental spécifique et un contrôle des paramètres d'acquisition.

De plus, nous avons choisi de travailler avec des pointes fonctionnalisées mises au contact des céramiques et non des pointes « nues » et des surfaces de céramiques présentant des protéines adsorbées.

### **III.1.1. Fonctionnalisation des pointes AFM par la fibronectine**

#### **III.1.1.1. Protocole expérimental**

Les mesures de spectroscopie de force nécessitent l'utilisation de pointes AFM spécifiques qui soient ni trop rigides (dégradation du matériau) ni trop souples (rebondissement contre le matériau). Pour l'ensemble de l'étude présentée ici, nous avons utilisé des pointes en nitrure de silicium PNP-TR de chez nanoworld (Pyrex-Nitride Probe, TRIangular) ayant une pointe pyramidale. Les pointes en nitrure de silicium ont une durée de vie plus longue que celles en silicium. Le nitrure de silicium est également plus hydrophobe que le silicium, ce qui minimise les forces de capillarité. La forme triangulaire du bras de levier (cantilever) offre une faible constante de raideur avec une fréquence de résonance élevée ce qui limite l'impact des vibrations extérieures. Cette géométrie est adaptée à la détection de forces faibles en mode contact. Ces pointes sont revêtues d'une fine couche d'or favorisant la réflexion du faisceau laser.

Le protocole utilisé pour la fonctionnalisation des pointes AFM en nitrure de silicium par la fibronectine (Fn) est classiquement utilisé dans la littérature. Il consiste à utiliser l'APTES et le glutaraldéhyde comme molécules intermédiaires de fonctionnalisation [194], [246], [155]. La Figure 63 illustre les étapes de fonctionnalisation mises en place au laboratoire par Marie Lasgorceix lors de son stage de Master.

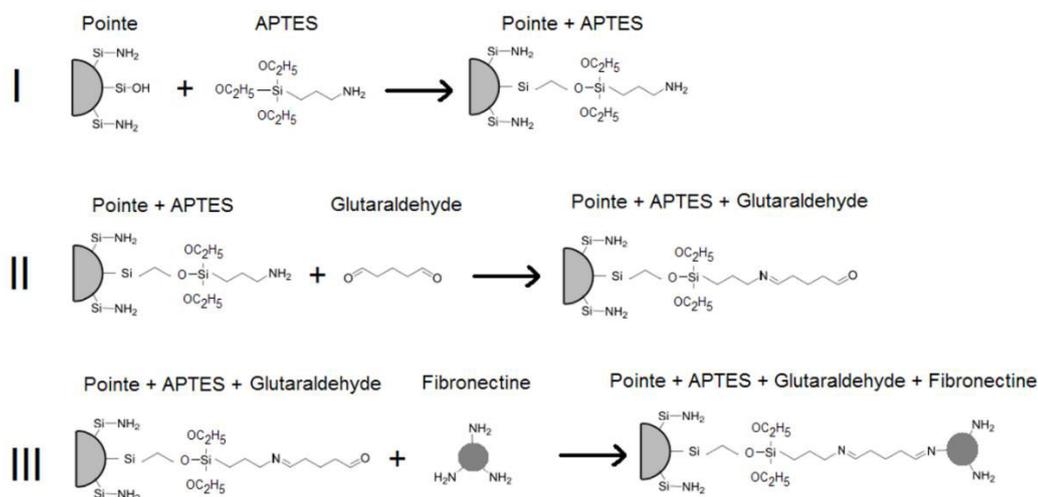


Figure 63 : Protocole de fonctionnalisation d'une pointe AFM par de la fibronectine. Le protocole a été modifié à partir de celui proposé par Rixman *et al.* [174].

Comme présenté dans le chapitre bibliographique (paragraphe I.3.2.2.2), il s'agit d'un protocole de fonctionnalisation en trois étapes. La première étape de silanisation (Figure 63-I) consiste à silaniser la surface du cantilever par le *cross linker* APTES. Il permettra par sa fonction amine terminale de se lier au *spacer* qui est le glutaraldéhyde (Figure 63-II). La dernière étape (Figure 63-III) est la fixation de la fibronectine sur le glutaraldéhyde *via* la formation d'une liaison imine.

Afin de nettoyer les cantilevers, un traitement UV-ozone (OZONE psd) est nécessaire avant de procéder à l'étape de silanisation. Celui-ci a été fixé à 15 min et permet de décomposer par photolyse les composés organiques en éléments volatils (eau, dioxyde de carbone...) grâce aux rayons ultraviolets. Quatre cantilevers sont ensuite placés dans un compartiment d'une boîte de culture contenant au préalable 4 mL d'une solution pure de 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES, C<sub>9</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>Si, 99%, Sigma Aldrich). Après 30 min d'immersion, les cantilevers sont prélevés, trempés quelques secondes dans l'éthanol technique 96 % non dénaturé, puis dans de l'eau distillée. Ils sont ensuite placés 30 min dans une solution de glutaraldéhyde dilué (dilution de 1 mL de glutaraldéhyde (10X, 1ML, 25%, Sigma Aldrich) décongelé dans 9 mL d'eau distillée). Les cantilevers sont ensuite rincés dans de l'eau distillée puis placés 10 min dans un compartiment contenant de l'eau distillée. Les cantilevers sont rincés une deuxième fois dans de l'eau distillée puis placés 10 min dans une solution de fibronectine. Cette dernière est préparée à partir d'une solution de fibronectine (2MG, liquide, 0,1%, 1mg/mL, Sigma Aldrich, référence : F0895) provenant de plasma humain. La concentration de la fibronectine utilisée lors de cette fonctionnalisation est de 10 µg/mL (250 µL de fibronectine dans 9,75 mL de solution tampon de phosphate salin PBS 1X).

Après fonctionnalisation par la fibronectine, les cantilevers sont rincés au PBS 1X puis placés dans un compartiment contenant du PBS 1X et conservés au réfrigérateur.

### III.1.1.2. Caractérisation des pointes fonctionnalisées

Afin de mettre en évidence la présence de la fibronectine à la surface des pointes, ces dernières ont été caractérisées par microscopie en fluorescence après un marquage par de l'AlexaFluor 594 et par microscopie électronique à balayage (MEB).

Le marquage de la fibronectine a été réalisé avec un kit classiquement utilisé en biologie cellulaire (Alexa Fluor 594, Microscale Protein Labeling Kit, référence : A30008). Pour cela, l'Alexa Fluor est dilué dans de l'eau distillée (1 $\mu$ L d'Alexa Fluor dans 99 $\mu$ L d'eau distillée), la solution est conservée dans le noir afin d'éviter toute excitation lumineuse. Pendant ce temps, un mélange de 990 $\mu$ L de PBS (1X) et de 10 $\mu$ L de bicarbonate de sodium est réalisé puis ajouté à 3,32  $\mu$ L de la solution d'Alexa Fluor. Les pointes sont alors immergées dans cette solution durant 30 min puis conservées dans du PBS avant d'être observées au microscope en fluorescence. Un rinçage au PBS (1X) a été effectué afin d'éliminer les impuretés résiduelles. La longueur d'onde d'excitation de l'Alexa Fluor est de 590nm et sa longueur d'onde d'émission est de 617nm. Un contrôle a été effectué en immergeant une pointe AFM non fonctionnalisée par la fibronectine dans la solution préparée avec de l'Alexa Fluor.

Les images obtenues par microscopie en fluorescence et par microscopie électronique à balayage sont présentées en Figure 64. Les images A et B correspondent à une pointe AFM non fonctionnalisée. L'image A ne révèle pas de fluorescence à la surface de la pointe ce qui signifie que le fluorochrome n'a pas accroché du fait de l'absence de fibronectine. L'image B présente un cliché MEB d'une pointe AFM non fonctionnalisée qui ne présente aucune irrégularité à la surface. Si l'on compare l'image A avec la C, on note une forte intensité de la fluorescence à la surface de la pointe fonctionnalisée par la fibronectine laquelle a persisté même après un rinçage au PBS. Cela traduit la fixation du fluorochrome à la fibronectine. La pointe AFM marquée par l'Alexa Fluor a été observée par MEB (image D). Elle révèle des aspérités à la surface de la pointe par rapport à celle non fonctionnalisée présentée en image B. Ces aspérités de surface correspondent alors à l'édifice Alexa Fluor/Fibronectine.

Les deux clichés MEB B et D des pointes AFM ont été analysées par le logiciel ImageJ (NIH-United States, v1.52b) afin de calculer le rayon de courbure des deux pointes AFM. Il s'agit du rayon du cercle osculateur (au cercle de courbure) défini au bout de la pointe. Le rayon de courbure mesuré sur la pointe AFM non fonctionnalisée (image B) est de 11,5 nm. Cette valeur est assez proche de celle indiquée par le fournisseur et qui est de 10 nm. Le rayon de courbure de la pointe fonctionnalisée par la fibronectine (image D) est de 45,5 nm. Ce dernier est plus élevé du fait de la présence de la fibronectine (et de l'Alexa Fluor) à la surface de la pointe.

Même si les images MEB des pointes AFM ne sont pas tout à fait de profil, ces valeurs semblent réalistes.

En conclusion, la fibronectine a bien été immobilisée à la surface des pointes AFM mais est également présente sur le cantilever. Le protocole de fonctionnalisation des pointes par la fibronectine a donc été validé.

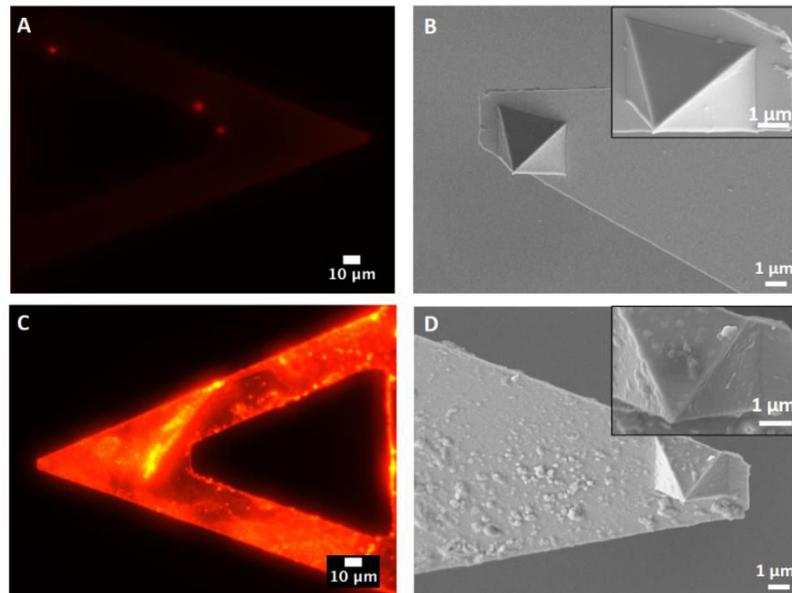


Figure 64 : Cantilevers et pointes AFM non fonctionnalisés par la fibronectine et après mise en contact avec la solution d'alexa fluor avec (A) image par microscopie en fluorescence et (B) image par microscopie électronique à balayage. Cantilevers et pointes AFM après fonctionnalisation par la fibronectine et marquage par l'Alexa Fluor avec (C) image par microscopie en fluorescence et (D) image par microscopie électronique à balayage.

### III.1.2. Mise en place du montage expérimental et définition des conditions d'acquisition

Les mesures de force d'adhésion ne peuvent pas être effectuées à l'air. D'une part, la fibronectine risquerait de perdre sa structure tridimensionnelle et de se replier sur elle-même (Chapitre I - paragraphe I.3.2.1). D'autre part, les forces mesurées correspondraient aux forces entre la pointe AFM et la fine couche d'eau présente à la surface du substrat due à l'humidité de l'air ambiant (Figure 65). Les travaux de Gan *et al.* [247] ont mis en évidence l'impact de la concentration d'une solution de lipoprotéine sur l'adhésion de la-dite protéine sur un substrat de mica. Les mesures effectuées dans du PBS ont révélé des forces de l'ordre de 0,2 nN, alors que les forces mesurées à l'air sont beaucoup plus élevées (20 à 50 nN). Cette forte augmentation est due à la présence d'un film d'eau à la surface du substrat d'où l'importance de travailler dans un milieu liquide plus représentatif des conditions biologiques qu'à l'air ambiant.

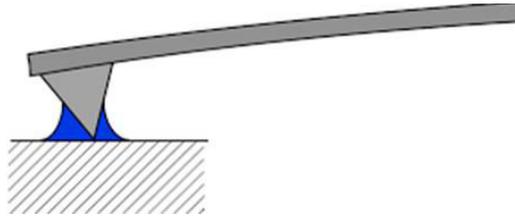


Figure 65 : Schéma illustrant la formation d'un ménisque d'eau entre une pointe AFM et la surface d'un substrat lors de mesures à l'air ambiant.

Il est donc nécessaire d'effectuer les mesures de force en milieu aqueux en utilisant une cellule de mesure appropriée et chauffée pour se rapprocher des conditions physiologiques.

### III.1.2.1. Cellule de mesure thermostatée en milieu liquide

Une cellule de mesure adaptée au milieu liquide en plexiglas a été fabriquée par Sébastien Faure, assistant ingénieur à l'atelier du laboratoire IRCER (Figure 66-A). Elle est conçue de manière à maintenir fixe des pastilles de céramiques phosphocalciques de diamètre 10 mm et s'adapte sur une platine à effet Peltier reliée à un contrôleur de température (*thermo controller*, Lake Shore-modèle 331) (Figure 66-B). La principale difficulté dans l'acquisition d'une image AFM force-volume est la stabilité du système. La céramique est donc fixée dans un anneau de serrage au moyen de 3 vis. Le système « anneau de serrage/céramique » est ensuite placé dans la cellule en plexiglas, puis l'ensemble est fixé par deux ressorts à la platine chauffante (voir image B-Figure 66). L'étanchéité de la cellule est assurée par un joint intégré et deux disques de téflon fins troués au milieu, afin d'établir le contact entre l'eau et la platine chauffante. La cellule doit être remplie d'eau de façon à couvrir la totalité de la surface de la céramique.

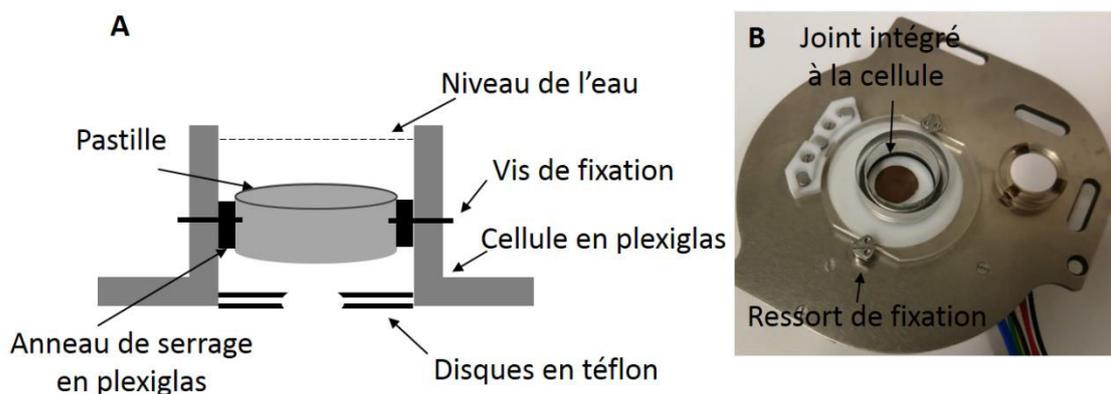


Figure 66 : A) Schéma de la cellule de mesure en coupe et B) photo de la platine à effet Peltier avec la cellule vide clipsée dessus.

L'évaporation d'eau au contact du laser est un paramètre difficile à contrôler compte-tenu des durées d'acquisition (souvent plus de 4 h). Il est donc impératif d'avoir une cellule étanche afin

d'éviter toute fuite d'eau par le bas et optimiser au maximum le niveau. Le niveau d'eau doit permettre d'immerger le cantilever en entier (ménisque d'eau qui dépasse la tête du scanner) (voir Figure 67). Si le niveau d'immersion est insuffisant, la partie du cantilever se trouvant à l'air risquerait de provoquer une instabilité de la déflexion mesurée et donc des perturbations sur l'acquisition des courbes de forces.

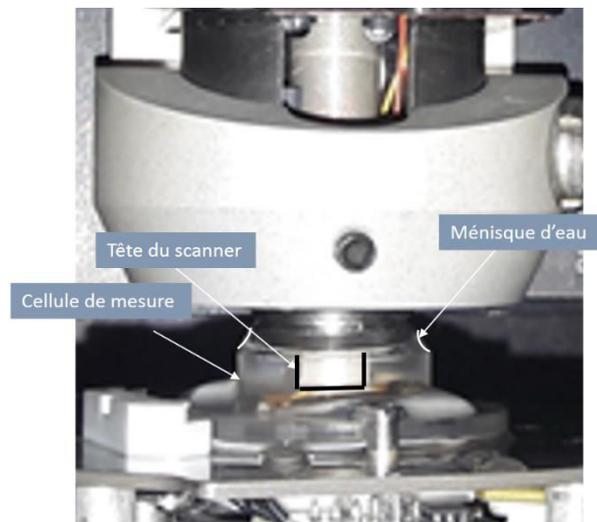


Figure 67 : Photographie montrant le niveau d'immersion du scanner dans la cellule de mesure.

### III.1.2.2. Pourquoi des images AFM force-volume

Le but des mesures des forces d'adhésion est d'évaluer l'influence de la topographie et de la composition chimique des différentes céramiques phosphocalciques. Présentant certaines limites, les mesures ponctuelles ne sont plus suffisantes, il faut donc des mesures de force représentatives de l'ensemble de la surface de la céramique afin de mieux se rendre compte de l'influence de la topographie.

#### - Mesures de force ponctuelles

L'influence grains / joints de grains sur les forces d'adhésion d'une protéine peut être abordée en réalisant dans un premier temps une image AFM de la surface puis dans un second temps en venant effectuer des indents sur des points (coordonnées) d'intérêt de cette surface. Ces mesures en deux étapes successives nécessitent un positionnement précis de chaque point de coordonnées (x, y) et donc de contrôler la dérive du scanner. Le Closed-loop est une fonction qui permet de compenser la dérive des mouvements non linéaires des transducteurs piézo-électriques (dérive en x et y), permettant au scanner de se repérer dans les directions x et y. Ainsi les forces d'adhésion déterminées sur les grains et les joints de grains peuvent être reliées aux images AFM de surface afin de remonter à l'influence de la topographie.

La Figure 68-A présente une image AFM de la surface d'une céramique dense en HA. Elle a été réalisée en mode contact sur une zone de  $5,5 \times 5,5 \mu\text{m}^2$ . Plusieurs indents ont été effectués

sur le grain marqué sur cette image (point a de coordonnées x, y). Les courbes obtenues sont présentées en Figure 69. Ces courbes de force sont décalées les unes par rapport aux autres alors qu'elles sont censées correspondre au même point de coordonnées x, y. Une seconde image AFM réalisée sur la même zone que celle précédemment scannée (Figure 68-A) montre un décalage du grain visé (Figure 68-B). Ce qui explique les différences observées sur les courbes de force de la Figure 69. En effet, ces dernières semblent correspondre à la zone entourée sur la Figure 68-B. Il a donc été constaté que la fonction du Closed-loop ne compensait pas correctement la dérive du scanner. Des mesures ponctuelles sur une image AFM de la surface de la céramique ne permettront pas d'étudier l'influence de la topographie. En conclusion, cette approche présente alors deux limites : réaliser une image AFM de surface avec une pointe fonctionnalisée et la fonction du Closed-loop qui ne compense pas la dérive du scanner.

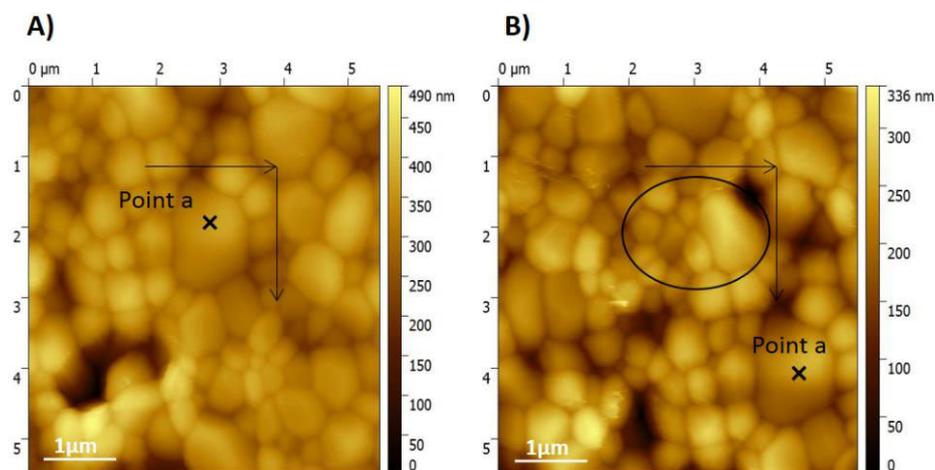


Figure 68 : Illustration de la dérive du Closed-loop sur une céramique dense en HA avec A) une image AFM de surface réalisée avant indentation et B) une image AFM de la même zone d'acquisition des courbes de force. Les images ont été faites en mode contact sur une zone de  $5,5 \times 5,5 \mu\text{m}^2$ .

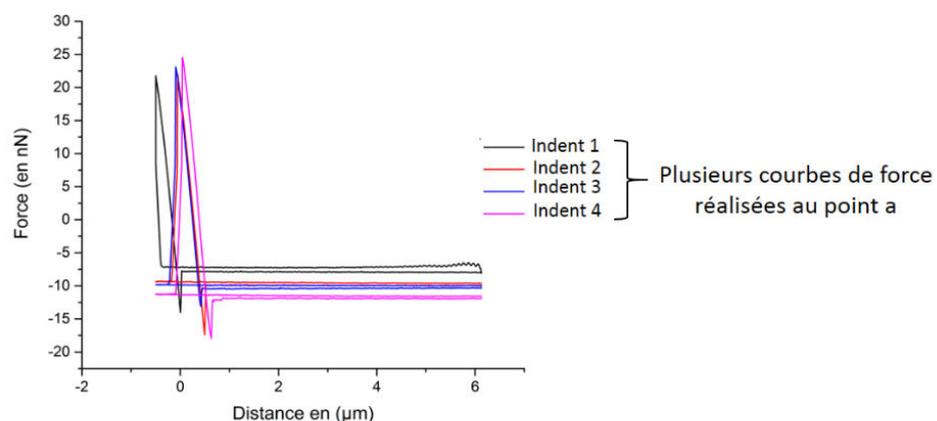


Figure 69 : Mesures de force réalisées sur un grain d'une céramique dense en HA (point a de la Figure 68-A) avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine dans de l'eau à  $37^\circ\text{C}$  avec la fonction Closed-loop activée.

### - Mesures de force et image force-volume

Une image AFM force-volume est reconstruite à partir des forces d'adhésion extraites des courbes de force acquises pour chaque point de coordonnées  $x$ ,  $y$  et  $z$ , le terme volume correspondant à un repositionnement en  $z$  et à la mesure de l'adhésion suivant cette coordonnée (retrait). Cette approche a été rendue possible avec l'évolution du logiciel PicoView qui pilote l'AFM 5500 Agilent. La version 1.14 présente le mode « volume » qui permet l'acquisition de courbes de force pour différents points de coordonnées ( $x$ ,  $y$ ) et  $z$  au cours d'un balayage de la surface scannée. L'avantage de ce mode réside dans la stabilité du système « scanner/cellule de mesure » qui ne nécessite pas d'intervention de l'utilisateur.

#### III.1.2.3. Choix des paramètres d'acquisition

L'acquisition des images AFM force-volume nécessite la définition de paramètres qui sont récapitulés dans le Tableau 11.

Comme expliqué dans le paragraphe III.1.2.1 les acquisitions ont été effectuées en milieu liquide afin de s'affranchir de l'humidité de l'air ambiant et se rapprocher au mieux des conditions physiologiques (température de 37 °C). Les premiers essais ont été réalisés dans une solution de PBS 1X afin d'avoir un milieu permettant aux protéines de rester hydratées et garder leur structure tridimensionnelle. Cependant, au contact avec le laser, la solution de PBS s'évapore légèrement ce qui induit une précipitation de cristaux de sel de chlorure de sodium (NaCl) sur la pointe empêchant les acquisitions. De ce fait, l'eau déminéralisée a été choisie comme milieu liquide simple pour ces mesures. Le changement de milieu ne devrait pas influencer de manière trop importante la structure tridimensionnelle de la fibronectine accrochée à la pointe AFM.

Effectuer une mesure de force d'adhésion avec une pointe AFM représente un compromis entre sa constante de raideur, l'ordre de grandeur des forces mesurées et la rigidité du matériau. Afin de quantifier l'adhésion de la fibronectine (forces de l'ordre de quelques nN) à la surface de la céramique, il est nécessaire d'utiliser des pointes AFM avec une constante de raideur adaptée au type de mesure réalisé. En effet des pointes AFM trop rigides ( $k = 13\text{--}77$  N/m) ne permettront pas d'atteindre les faibles forces d'adhésion mesurées et des pointes AFM trop souples ( $k = 0,08$  N/m) risqueraient d'osciller dans l'eau. Pour cela, nous avons choisi de travailler avec des pointes ayant une constante de raideur théorique de 0,32 N/m et revêtues d'une fine couche d'or pour une meilleure réflexion du laser. La valeur de la constante de raideur est susceptible d'être modifiée après fonctionnalisation de la pointe. Ce point sera détaillé dans le paragraphe suivant. De plus, les déflexions (*setpoint*) utilisées correspondront à des tensions inférieures ou égales à 1 V afin d'éviter la dégradation de la pointe.

Les paramètres relatifs à la taille de l'image et à la durée d'une mesure ont été définis en privilégiant deux aspects : le temps de mesure et le nombre de courbes. Le temps de contact par point de mesure a été fixé à 1 s et la vitesse de retrait et d'approche à 2  $\mu\text{m/s}$ . Différentes résolutions sont proposées pour l'acquisition des courbes force-volume et varient de 2 x 2 à 512 x 512 pixels, un pixel correspondant à une courbe de force. Une résolution de 128 x 128 pixels correspondant à l'enregistrement de 16 384 courbes, soit une courbe tous les 31 nm a été choisie pour une surface de 4x4  $\mu\text{m}^2$ . Il s'agit d'une résolution qui présente un bon compromis entre la définition et la taille de la surface scannée. En effet, cette dernière a été fixée à 16  $\mu\text{m}^2$  afin d'être représentative des grains et des joints de grains des céramiques comme le montrent les clichés MEB présentés dans le chapitre II, paragraphe II.2.2.2. Ce jeu de paramètres (temps de contact, résolution, taille du scan) conduit à un temps d'acquisition de 4 h30 par image, durée pendant laquelle l'eau s'évapore peu.

Milieu de mesure		Cantilever	Paramètres des courbes de force		Paramètres de l'image		
Nature	Température	Constante de raideur théorique k	Temps de contact	Vitesse d'approche et de retrait	Résolution volume (pixels)	Taille du scan	Durée de l'acquisition
eau	37 °C	0,32 N/m	1 s	2 $\mu\text{m/s}$	128x128	4x4 $\mu\text{m}^2$	4 h30

Tableau 11 : Paramètres choisis pour les acquisitions des données AFM force-volume.

### III.1.3. Acquisition des images AFM force-volume et traitement

#### III.1.3.1. Acquisition des images AFM force-volume

Le logiciel utilisé pour l'acquisition des données AFM force-volume est Picoview version 1.14 en mode spectroscopie. La Figure 70 regroupe les différentes étapes à effectuer pour l'acquisition des courbes force-volume.

L'étape 1 consiste à immerger la pointe fonctionnalisée dans de l'eau pendant 5 min afin d'enlever les cristaux de sels dus à la conservation dans la solution PBS. La pointe est ensuite placée sur le scanner. Le réglage du laser (étape 2) est identique à celui effectué pour réaliser des images AFM de surface.

Une calibration de la pointe AFM sur un substrat dur (mica) à l'air et en mode contact (étape 3) est nécessaire afin de déterminer la constante de raideur k de la pointe fonctionnalisée par la fibronectine et son coefficient de sensibilité  $\alpha$ . La constante de raideur k donnée par le fournisseur Nanoworld est de 0,32 N/m pour un cantilever de longueur de 100  $\mu\text{m}$ , laquelle est modifiée après fonctionnalisation. Lors de la calibration, l'approche est réalisée avec une déflexion (*setpoint*) de 0,5 V afin d'éviter d'endommager la pointe. A la fin de l'approche, le coefficient de sensibilité de la pointe AFM est déterminé à partir d'une courbe d'approche-

retrait acquise à la surface du mica. L'indentation dure 1 s avec 2000 points par courbe de force. Deux curseurs sont ensuite placés sur la courbe de retrait (Figure 71) afin de déterminer le coefficient directeur de la tangente de la courbe, ce dernier correspond au coefficient de sensibilité  $\alpha$  de la pointe. Il est généralement situé autour de 90 nm/V mais il peut légèrement varier d'une pointe à une autre en fonction de la fonctionnalisation. Le scanner est ensuite éloigné de la surface afin d'utiliser la fonction Thermal K pour la détermination de la constante de raideur de la pointe fonctionnalisée. La valeur de la constante de raideur pour l'ensemble des mesures est généralement située entre 0,03-0,04 N/m. La détermination du coefficient de sensibilité et de la constante de raideur de la pointe fonctionnalisée permettra de remonter à la force d'interaction en nN (loi de Hooke-chapitre I, paragraphe I.4.1.2) lors du traitement des courbes de forces conduisant à la reconstruction des images AFM force-volume présentées dans le paragraphe suivant.

Les étapes (4 à 6) concernent la mise en place de la mesure avant l'acquisition des courbes de forces.

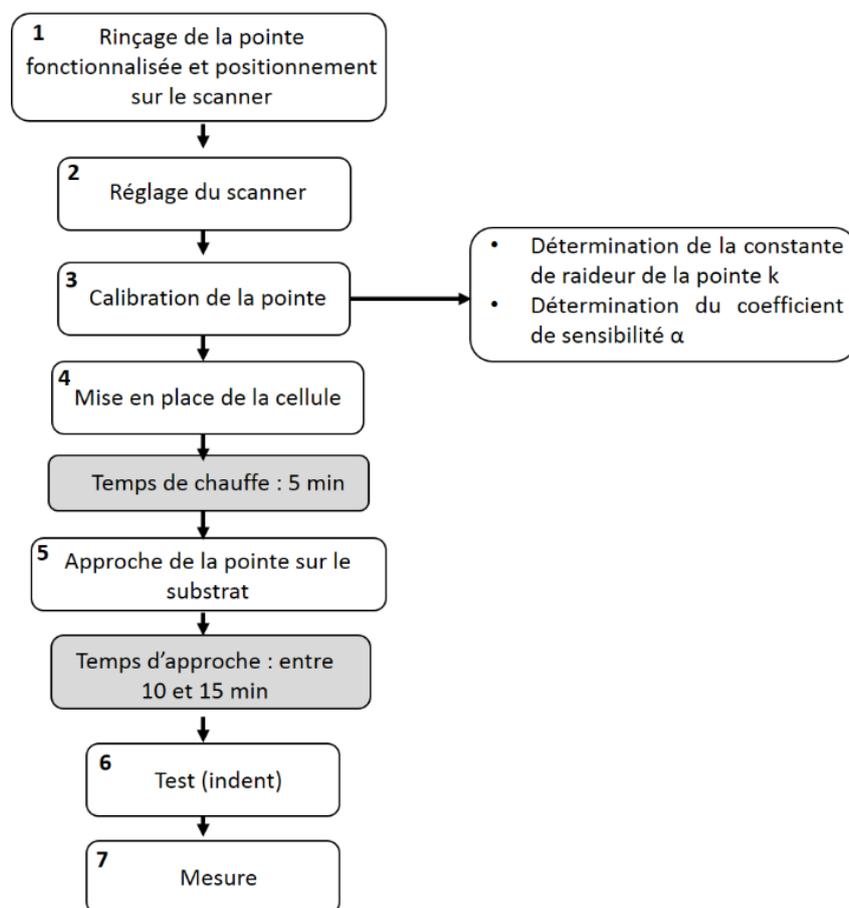


Figure 70 : Organigramme des différentes étapes d'acquisition des données AFM force-volume.

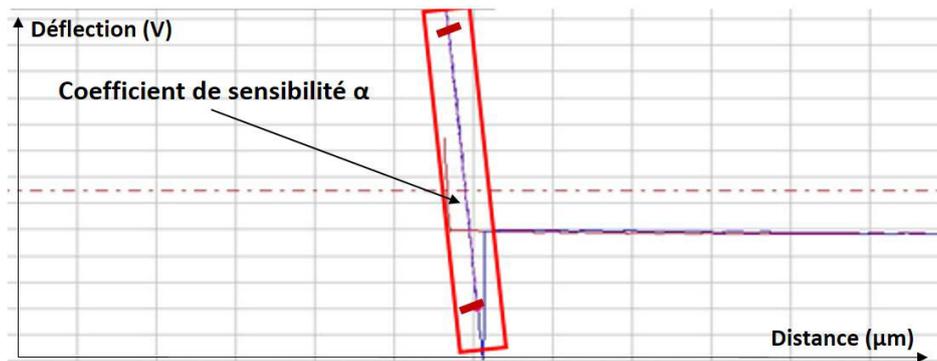


Figure 71 : Exemple d'une courbe de force réalisée sur mica. Les deux curseurs sont placés afin de déterminer le coefficient directeur de la tangente de la courbe lequel correspond au coefficient de sensibilité  $\alpha$ .

### III.1.3.2. Traitement des images AFM force-volume

Ce paragraphe présente le traitement des données AFM force-volume en se basant sur un exemple : une image AFM force-volume dont les données ont été acquises à l'air sur une céramique dense et non polie en HA avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine. Les acquisitions à l'air ne présentent pas d'intérêt majeur pour cette étude comme cela a été expliqué au paragraphe III.1.2 mais elles ont permis de paramétrer le logiciel Picolmage Advanced 7.3 de Digital Surf pour le traitement. Les différentes étapes suivies lors du traitement des données AFM force-volume sont présentées en Figure 72.

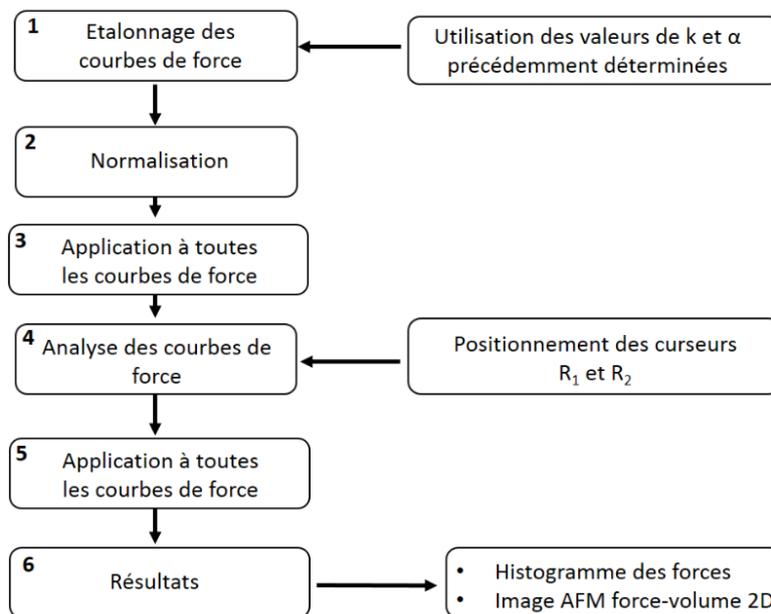


Figure 72 : Organigramme des différentes étapes de traitement des données AFM force-volume conduisant à l'établissement d'une image force-volume.

La première étape du traitement du jeu de données consiste à étalonner les courbes de forces en appliquant les constantes  $k$  et  $\alpha$  déterminées lors de l'étalonnage de la pointe. Cela permet

par la loi de Hooke (présentée dans le chapitre I-paragraphe I.4.1.2) d'obtenir des courbes de force en nN et non en Volt qui est la grandeur mesurée par l'équipement (axe des ordonnées). Les courbes de force sont ensuite normalisées (étape 2). Cette opération consiste à repositionner l'origine des axes des ordonnées et des abscisses comme le montre la Figure 73. Cette opération est ensuite appliquée à toutes les courbes de force (étape 3). Le but de l'analyse des courbes de force est de déterminer la force d'adhésion ( $F$ ) en plaçant deux curseurs  $R_1$  et  $R_2$  sur le pic d'adhésion de la courbe de retrait (étape 4 et Figure 74), la différence ( $Z_{R2}-Z_{R1}$ ) correspond à la force d'adhésion en nN. Cette opération est appliquée à toutes les courbes de force (étape 5).

A la fin de l'analyse des courbes de force, les résultats peuvent être présentés sous deux formes (étape 6) : un histogramme des forces d'adhésion en fréquence (Figure 75) et une image AFM force-volume (Figure 76). Sur l'histogramme, la hauteur d'une barre correspond à la fréquence de la classe qu'elle représente. L'axe des abscisses correspond aux forces déterminées à partir des courbes de force. Les valeurs sont négatives car la différence  $Z_{R2}-Z_{R1}$  est inférieure à 0. Ces valeurs doivent donc être considérées en valeurs absolues. La largeur des barres (*i.e.* d'une barre) a été fixée à 0,2 nN pour tous les histogrammes afin d'avoir une meilleure représentation de la répartition des forces d'adhésion.

L'image AFM force-volume (Figure 76) est générée avec la fonction « *Parameter map* ». Les dimensions  $x$  et  $y$  correspondent à la taille de la zone scannée ( $4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ ). Avec une résolution de  $128 \times 128$  pixels, un pixel sur l'image AFM force-volume correspond à une courbe de force. L'échelle des hauteurs qui accompagne l'image traduit les valeurs des forces d'adhésion obtenues, il s'agit de la troisième dimension en  $z$  d'où le nom force-volume.

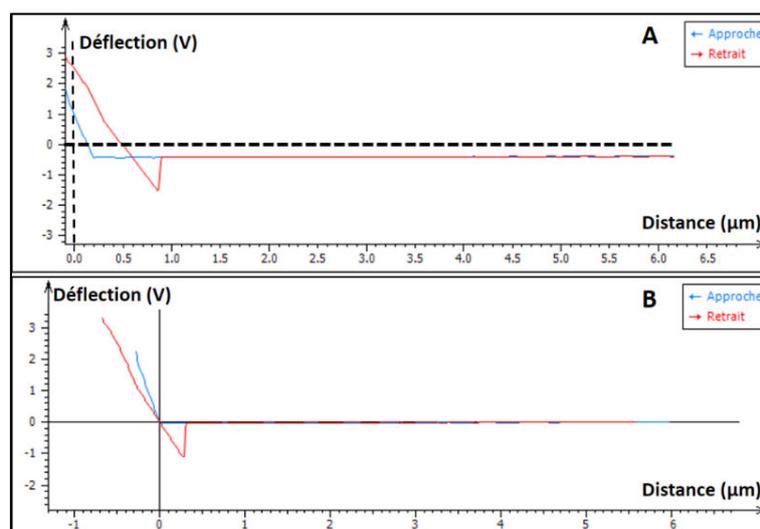


Figure 73 : Exemple d'une courbe de force (A) avant et (B) après normalisation.

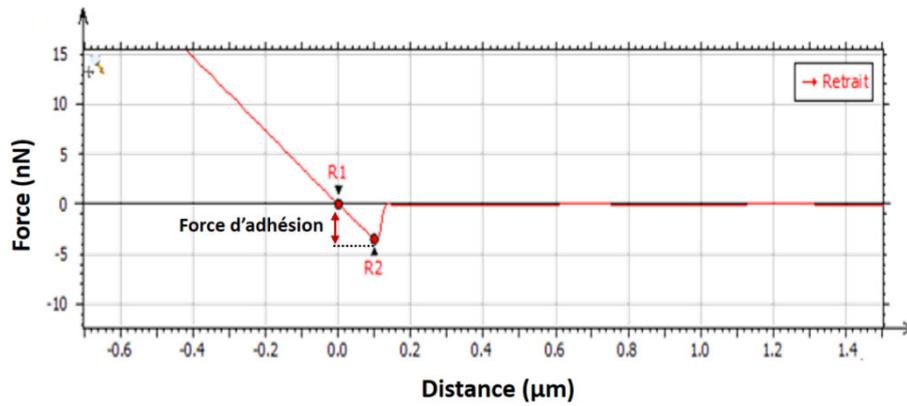


Figure 74 : Exemple d'analyse d'une courbe de force. Les curseurs R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> sont placés afin de déterminer la force d'adhésion.

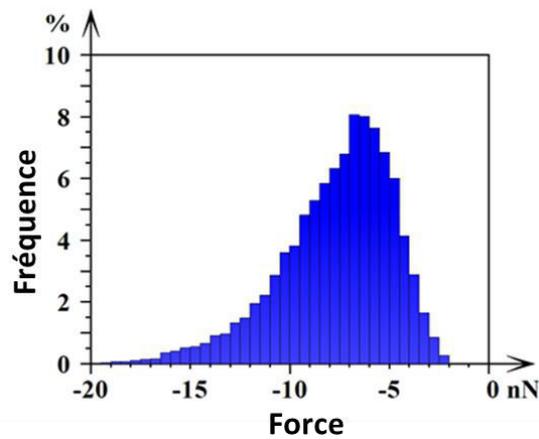


Figure 75 : Exemple d'un histogramme en fréquences des forces d'adhésion obtenu à partir d'un jeu de 16384 courbes. Echelle : abscisse = force en nN, ordonnée = fréquence en %.

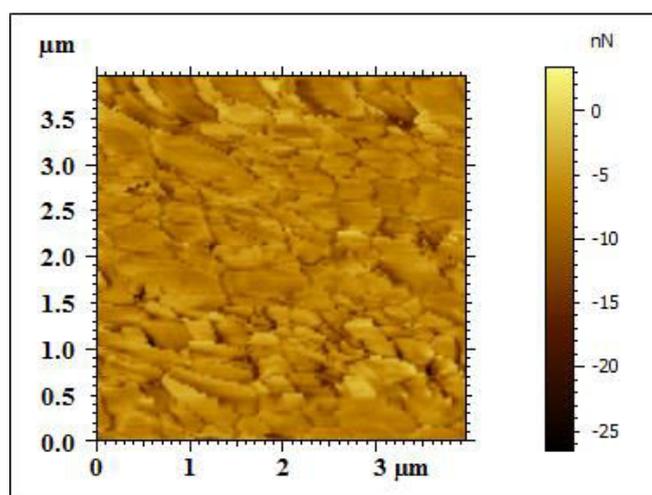


Figure 76 : Exemple d'une image AFM force-volume 2D obtenue à partir d'un jeu de 16384 courbes de force avec la fonction *Parameter map*. Echelle : x, y = taille de l'image 2D en μm, z = forces en nN.

Après l'acquisition d'une courbe de force, le scanner se repositionne en z avant d'entamer une nouvelle mesure de force. La Figure 77 présente un exemple de courbe de force non normalisée mettant en évidence deux informations enregistrées simultanément : la déflexion qui permet de remonter à la force et à la topographie. Le décalage observé sur la courbe de force par rapport à l'origine de l'axe des ordonnées correspond à un décalage en z qui traduit les variations de topographie. On appellera l'image reconstruite à partir de ces données image AFM de la « topographie récupérée ». Cette topographie est récupérée *via* le *plug-in* « point de contact » du logiciel d'acquisition PicoView qui prend en compte la valeur de la position en z du scanner.

Cette opération est réalisée dans le but de superposer l'image AFM de la « topographie récupérée » et l'image AFM force-volume avec le logiciel PicoImage. La reconstruction 3D permet de mieux visualiser l'influence de la topographie sur les forces d'adhésion protéine/céramique. L'image AFM de la « topographie récupérée » est traitée avec le logiciel PicoImage en corrigeant les défauts de surface (Figure 78-A) par un redressement ligne à ligne. Cet outil de traitement est souvent utilisé en microscopie à force atomique pour corriger le décalage entre la référence verticale et la ligne mesurée. Il consiste alors à redresser chaque ligne indépendamment et les replacer sur un même plan (Figure 78-B).

La fonction « surface multicouche » permet alors d'effectuer une superposition de l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée ». L'image AFM force-volume est définie comme couche texture (Figure 79-A) et l'image AFM de la topographie récupérée comme couche topographique (Figure 79-B). La représentation 2D n'apporte pas d'information mais la représentation 3D en perspective (Figure 80) permet de corrélérer topographie et force d'adhésion. L'échelle en couleur à droite représente les forces en nN accompagnées de leur histogramme de fréquence. Le contraste de couleur observé est associé à la variation des forces d'adhésion avec des forces plus élevées sur les joints de grain (couleur bleue sombre) et des forces faibles sur les grains (couleur jaune et verte claire). L'information topographie est donnée à gauche de l'image sur l'échelle des ordonnées.

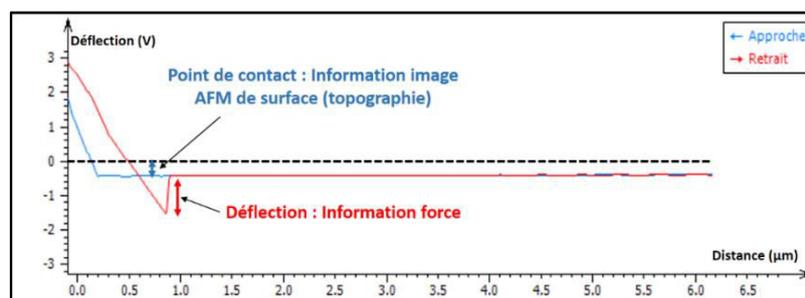


Figure 77 : Exemple d'une courbe de force non normalisée mettant en évidence deux informations : la force d'adhésion avec la mesure de la déflexion et la topographie récupérée avec le *plug-in* point de contact.

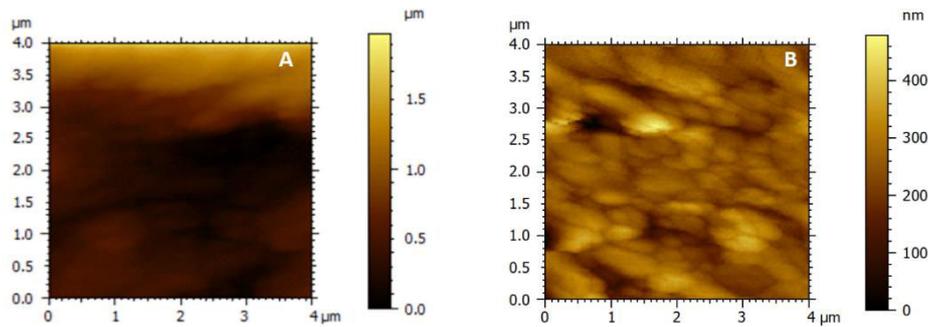


Figure 78 : Exemple du traitement d'une image AFM de la « topographie récupérée » avec A) avant redressement ligne à ligne et B) après redressement ligne à ligne.

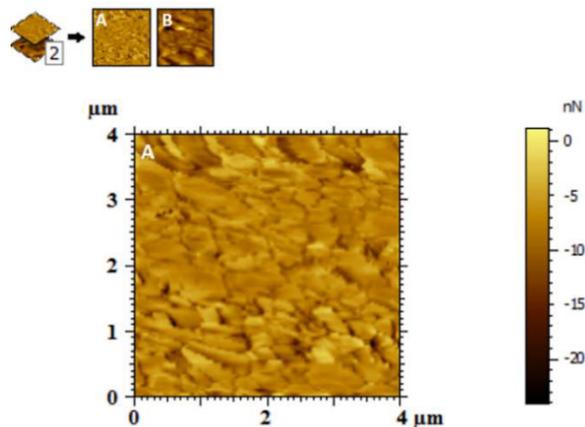


Figure 79 : Exemple d'une surface multicouche 2D générée par la superposition (A) de l'image AFM force-volume et (B) de l'image AFM de la « topographie récupérée ».

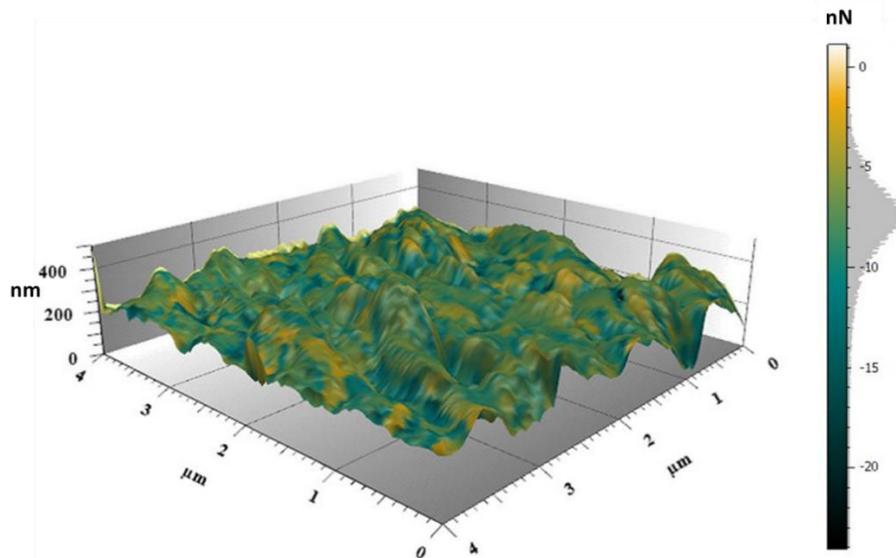


Figure 80 : Exemple d'une vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée ».

Echelle : x, y = taille de l'image en  $\mu\text{m}$  et z = amplitude de l'image AFM de la « topographie récupérée » en nm (à gauche). L'échelle en couleur à droite représente les forces d'adhésion en nN accompagnées de leur histogramme en fréquence.

### III.1.3.3. Contrôle des données

La Figure 81 représente des images AFM force-volume réalisées avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine sur une céramique dense en HA (image A) et un substrat en mica (image C). L'image B correspond à une image AFM force-volume réalisée avec une pointe non fonctionnalisée sur une céramique dense en HA. Ces acquisitions de données ont été effectuées à l'air.

L'image A définit des zones qui semblent correspondre à des grains et des joints de grains à la surface de la céramique avec des forces d'adhésion mesurées comprises entre 0 et 25 nN.

Afin de confirmer qu'on mesure bien des forces d'adhésion de la fibronectine, nous avons effectué deux contrôles. Le premier concerne des mesures de forces réalisées sur une surface lisse (mica), l'image C résultante indique des forces homogènes (autour 1,2 nN) sur la totalité de la surface scannée. Le second contrôle avait pour but de voir le comportement de l'adhésion avec une pointe non fonctionnalisée. L'image B affiche une surface inhomogène par rapport à celle observée sur l'image A avec des forces comprises entre 0 et 16,3 nN. Ces dernières correspondraient aux forces mesurées entre la pointe non fonctionnalisée et la fine couche d'eau présente à la surface de la céramique (mesures à l'air). Si les forces mesurées sont du même ordre de grandeur, l'image B ne définit pas de zone pouvant correspondre à des grains et des joints de grains.

Ces deux contrôles ont permis de mettre en évidence le comportement de l'adhésion sur une surface lisse et de montrer que les forces mesurées avec une pointe fonctionnalisée sont différentes en terme de répartition spatiale de celles mesurées avec une pointe non fonctionnalisée. En effet, des zones bien distinctes ressemblant à des grains et des joints de grains se profilent. Ce point sera plus amplement expliqué par la suite en discutant l'aspect topographique observé sur l'image (A-Figure 81).

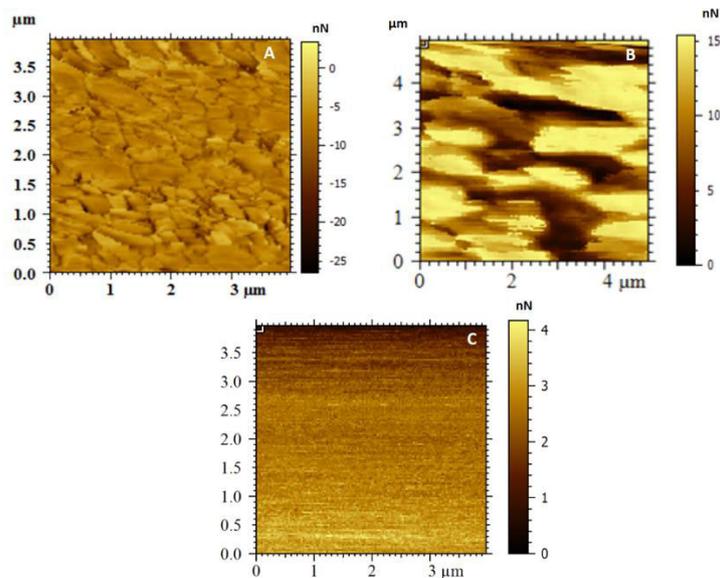


Figure 81 : Images AFM force-volume réalisées avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine sur (A) une céramique dense en HA et (C) un substrat en mica et (B) image AFM force-volume réalisée avec une pointe non fonctionnalisée sur une céramique dense en HA. Les mesures ont été effectuées à l'air et le traitement des données avec le logiciel PicoImage.

### III.1.4. Résultats

Les images AFM force-volume acquises sur des céramiques denses en hydroxyapatite (HA), en hydroxyapatite silicatée (SiHA) et en hydroxyapatite carbonatée (CHA) sont présentées ci-après. Les forces d'adhésion de la fibronectine ont été mesurées sur des céramiques denses et non polies afin d'évaluer l'impact de la topographie et sur des céramiques denses et polies afin d'évaluer l'influence de la composition chimique en s'affranchissant des effets topographiques. Les images AFM force-volume des six céramiques denses (polies et non polies) en HA, SiHA et CHA ont été réalisées dans l'eau et à 37°C. Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel PicoImage en s'appuyant sur la méthode expliquée au paragraphe III.1.3.2.

#### III.1.4.1. Hydroxyapatite

Ce paragraphe présente l'ensemble des images AFM force-volume réalisées sur la céramique dense non polie et polie en HA avec une pointe AFM fonctionnalisée par de la fibronectine. Ces résultats sont représentatifs de l'ensemble des images AFM force-volume obtenues avec ces céramiques.

##### III.1.4.1.1. Image AFM force-volume sur céramique non polie en HA

La Figure 82 présente les résultats obtenus avec une céramique dense non polie en HA. L'histogramme en fréquence modélisé par des gaussiennes (Figure 82-A) présente une

distribution large des forces d'adhésion de la fibronectine sur la surface des substrats. Les forces sont hétérogènes et varient de 1,5 à 7,5 nN avec une fréquence maximale de 6,5 %. La force d'adhésion moyenne obtenue est de 4,4 nN. On distingue deux populations de forces. La première population indique la présence de peu de forces détectées entre 1,5 et 5 nN alors que la deuxième population, elle présente un nombre important de forces qui se situent entre 3,5 et 7,5 nN. L'image AFM force-volume (Figure 82-B) donne la répartition de ces mêmes valeurs de forces à la surface de la céramique. Le contraste de couleur varie de la couleur jaune à la couleur marron pour une échelle de forces évoluant de 1 à 8 nN. Ces valeurs de force semblent définir des zones qui ressemblent à des grains et des joints de grains en surface. On retrouve le même aspect topographique sur l'image AFM de la « topographie récupérée » (Figure 82-C), ces grains et joints de grains sont assez visibles avec une échelle de hauteur qui indique une amplitude maximale de 200 nm. L'échelle en couleurs des forces en nN de la vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée » (Figure 82-D) met en évidence un contraste de couleur qui traduit une augmentation de la force d'adhésion en allant de la couleur jaune à la couleur bleue. Les forces d'adhésion sont plus élevées sur les joints de grains et varient entre 4 et 7 nN, alors que sur les grains les forces d'adhésion sont plus faibles et se situent entre 1 à 4 nN.

L'ensemble des résultats obtenus conclut dans un premier temps à des forces d'adhésion plus élevées sur les joints de grains par rapport à celles obtenues sur les grains.

L'image AFM de la « topographie récupérée » obtenue à partir du *plug-in* « point de contact » renseigne théoriquement sur la topographie de la zone scannée en spectroscopie de force, il faut donc s'assurer qu'il s'agit bien des grains et des joints de grains de la surface de la céramique. Pour valider ce point, la Figure 83 présente trois images d'une céramique dense en HA : l'image AFM de la topographie récupérée (Figure 83-A), une image AFM de surface réalisée à l'air (Figure 83-B) et un cliché de microscopie électronique à balayage (Figure 83-C). Le diamètre moyen des grains a été calculé à partir de ces trois images avec le logiciel ImageJ (NIH- United States, v1.52b) sur la base de 31 grains. Les résultats sont présentés dans le Tableau 12. Les diamètres moyens des grains calculés à partir des trois images sont du même ordre de grandeur. Pour les images AFM de la « topographie récupérée » et de la surface de la céramique, les diamètres moyens des grains sont identiques et sont respectivement de  $0,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$  et  $0,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$ . Cependant, les aspects des deux images sont différents, l'image AFM de la « topographie récupérée » présente des grains allongés, cette déformation est peut-être due à une dérive du système, au fait que l'échantillon bouge lors de l'acquisition des images AFM force-volume en milieu aqueux, ou encore à un traitement d'image insuffisant.

Des profils de rugosité extraits des images AFM de la « topographie récupérée » (Figure 83-A) et de la surface de la céramique (Figure 83-B) sont présentés en Figure 84. Les deux profils présentent des vallées et des sommets qui traduisent la présence de joints de grains. Les hauteurs maximales Rz des profils A et B sont respectivement de 0,09  $\mu\text{m}$  et 0,13  $\mu\text{m}$ . De plus, les rugosités surfaciques de l'image AFM de la « topographie récupérée » et de l'image AFM de surface mentionnées sur la Figure 83 sont quasiment identiques et sont respectivement de 20 nm et 21 nm. Cette légère différence peut être due à la forme modifiée des grains et à l'influence du milieu eau mais surtout à la zone scannée qui n'est pas identique dans les deux cas.

En conclusion, le calcul des diamètres moyens des grains ainsi que les profils de rugosité extraits des images AFM accompagnées de leurs rugosités surfaciques respectives confirment que l'image AFM de la « topographie récupérée » correspond bien à l'image AFM de la surface de la céramique dense en HA enregistrée en même temps que l'image AFM force-volume. Les forces d'adhésion élevées obtenues sur les joints de grains témoignent alors d'une grande affinité de la fibronectine pour ces zones par rapport à celles obtenues sur les grains qui étaient moins élevées.

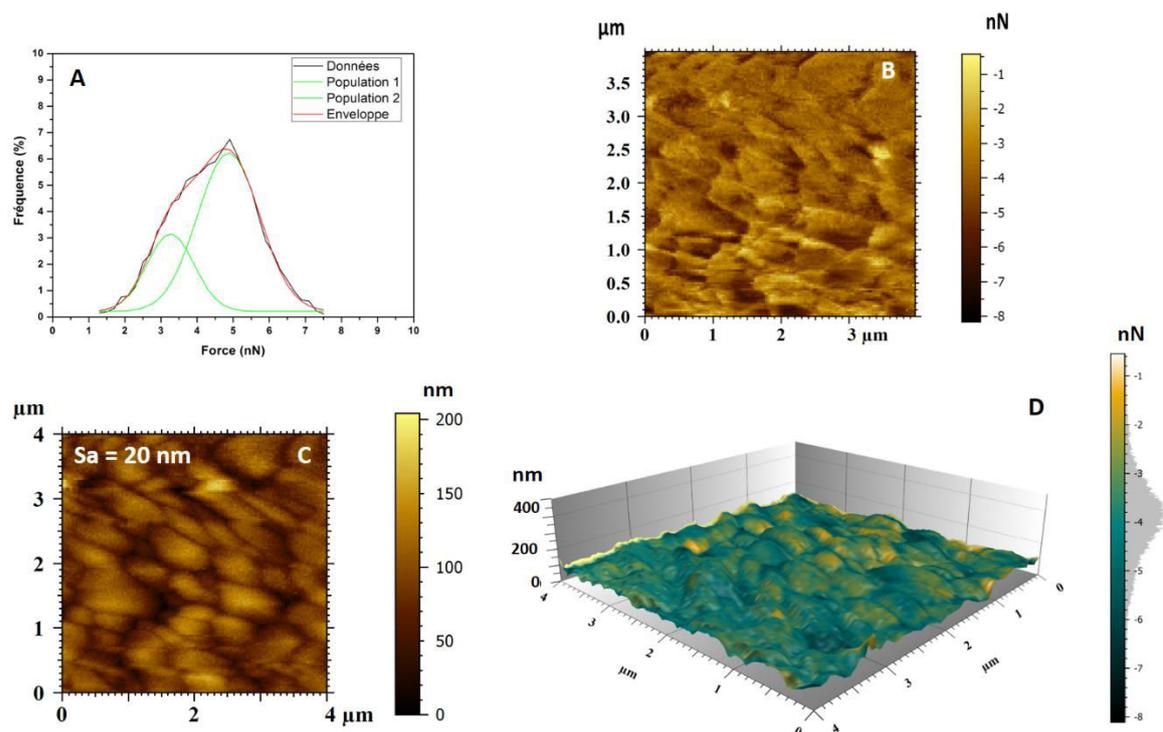


Figure 82 : Image AFM force-volume d'une céramique dense non polie en hydroxyapatite (HA) obtenue avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine (Fn), les mesures ont été réalisées en milieu aqueux (eau) et à 37°C avec A) histogramme en fréquence des forces mesurées modélisé par des gaussiennes, B) image AFM force-volume, C) image AFM de la « topographie récupérée » et D) vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée ».

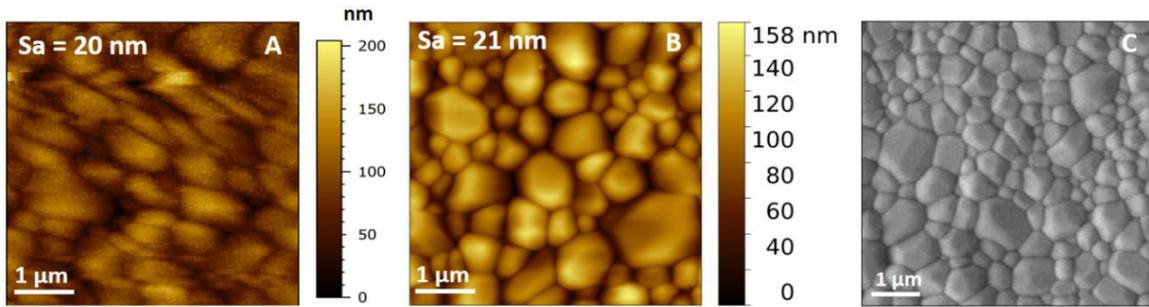


Figure 83 : Topographie d'une céramique dense et non polie en HA avec A) image AFM de la « topographie récupérée », B) image AFM de surface réalisée à l'air et en mode contact et C) cliché MEB.

Diamètre moyen ( $\mu\text{m}$ )			
	Image A	Image B	Image C
HA	$0,5 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,3$

Tableau 12 : Diamètre moyen des grains de l'hydroxyapatite (HA) calculé à partir de A) l'image AFM de la « topographie récupérée », B) l'image AFM de surface réalisée à l'air et en mode contact et C) du cliché MEB.

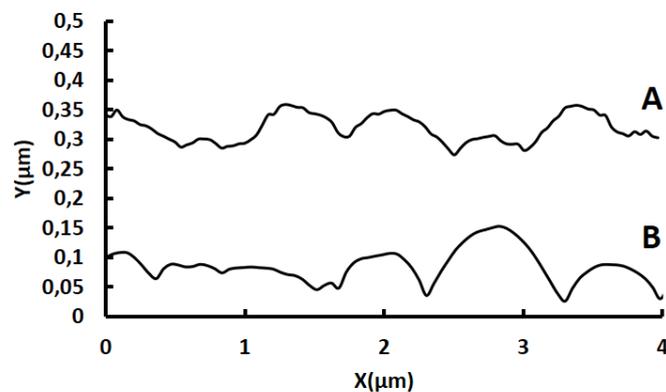


Figure 84 : Profils de rugosité extraits des images AFM A) de la « topographie récupérée » et B) de la surface de la céramique dense et non polie en hydroxyapatite.

### III.1.4.1.2. Image AFM force-volume sur céramique polie en HA

Les résultats de spectroscopie de force obtenus avec une céramique dense et polie en hydroxyapatite sont présentés sur la Figure 85.

Les forces d'adhésion sont représentées sous forme d'histogramme en fréquence (Figure 85-A). Il indique une distribution asymétrique des forces sur la céramique dense et polie en HA qui varient entre 0 et 1 nN avec une fréquence maximale de 11 %. La majorité des forces

d'adhésion se situent entre 0 et 0,5 nN. Peu de forces d'adhésion sont détectées au-delà de 0,5 nN. La force d'adhésion moyenne est de 0,3 nN. L'image AFM force-volume (Figure 85-B) met en évidence la répartition des forces mesurées sur la surface de la céramique. L'échelle en couleurs des forces d'adhésion en nN indique des forces faibles et homogènes allant de 0 à 1 nN (couleur jaune) sur la totalité de la surface lisse. L'échelle de hauteur sur l'image AFM de la « topographie récupérée » (Figure 85-C) indique une amplitude totale maximale de surface de 150 nm. La rugosité surfacique ( $S_a$ ) de la céramique dense et polie en HA est de 12 nm. Le contraste de couleur observé sur la vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée » (Figure 85-D) confirme la répartition homogène des faibles forces mesurées sur l'ensemble de la surface avec une échelle en couleur en nN qui indique des forces majoritairement situées entre 0 et 0,5 nN.

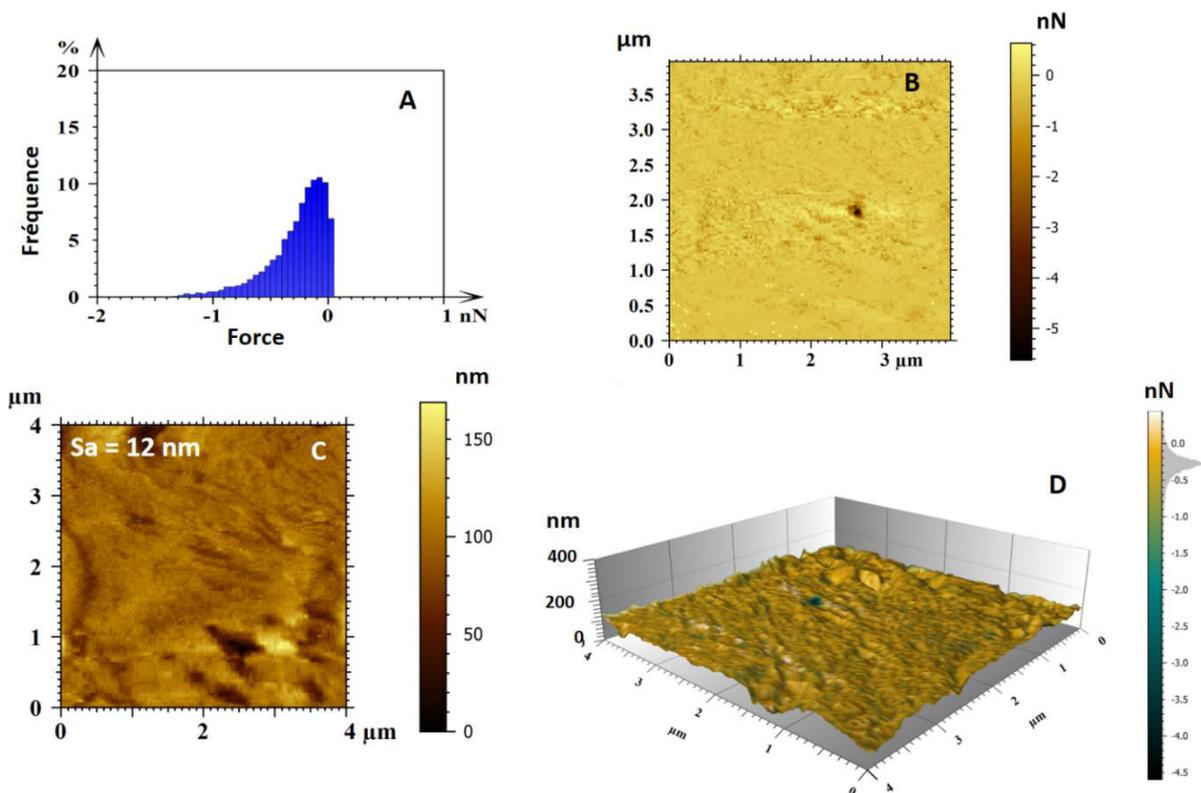


Figure 85 : Image AFM force-volume d'une céramique dense polie en hydroxyapatite (HA) obtenue avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine (Fn), les mesures ont été réalisées en milieu aqueux (eau) et à 37°C avec A) histogramme en fréquence des forces mesurées, B) image AFM force-volume, C) image AFM de la « topographie récupérée » et D) vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée ».

Dans la même approche sur la confirmation de l'information « topographie », deux profils de rugosité extraits des images AFM de la « topographie récupérée » et de la surface d'une céramique dense et polie en HA réalisée à l'air sont présentés Figure 86. Les deux profils

présentent des hauteurs maximales  $R_z$  différentes qui sont de 44 nm pour le profil (A) et 20 nm pour le profil (B). La rugosité surfacique obtenue à partir de l'image AFM de la « topographie récupérée » (12 nm) est plus élevée que celle obtenue sur l'image AFM de surface qui est de 4 nm (chapitre II, paragraphe II.2.2.9). Les surfaces scannées à l'air et dans l'eau sont choisies de manière aléatoire d'où les légères différences de rugosité observées entre les deux milieux. Compte-tenu des faibles rugosités, le moindre creux au sommet peut influencer de façon significative les valeurs de  $S_a$ .

En conclusion, l'affinité de la fibronectine semble moins importante pour une céramique dense et polie en HA, les forces d'adhésion sont faibles et réparties de façon uniforme sur l'ensemble de la surface.

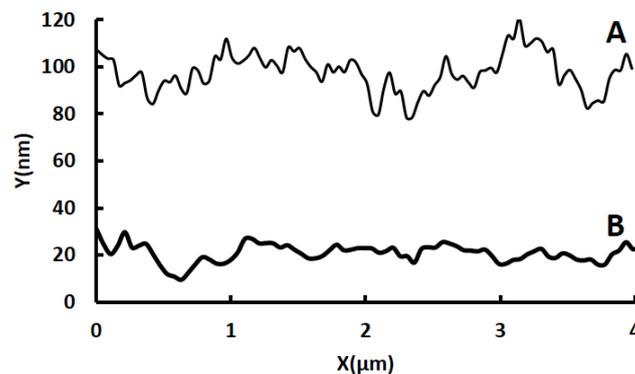


Figure 86 : Profils de rugosité extraits des images AFM A) de la « topographie récupérée » et B) de la surface de la céramique dense polie en hydroxyapatite.

### III.1.4.2. Hydroxyapatite silicatée

Les résultats obtenus pour des céramiques denses en hydroxyapatite silicatée sont présentés dans ce paragraphe. Ils sont représentatifs de l'ensemble des images AFM force-volume obtenues avec ces céramiques.

#### III.1.4.2.1. Image AFM force-volume sur céramique non polie en SiHA

L'histogramme en fréquence des forces mesurées modélisé par des gaussiennes (Figure 87-A) présente une distribution étroite des forces d'adhésion à la surface de la céramique. Les forces d'adhésion varient de 0,1 à 3,3 nN avec une fréquence maximale de 11,5 %. La force d'adhésion moyenne est de 1,3 nN. Deux populations de forces se distinguent, la première concerne des forces d'adhésion allant de 0,1 à 1,5 nN et la deuxième indique des forces plus élevées situées entre 0,5 et 3,3 nN. Les mêmes forces d'adhésion sont indiquées sur l'image AFM force-volume (Figure 87-B). Celle-ci affiche un contraste de couleur allant des couleurs claires (couleur jaune) aux couleurs sombres (couleur marron) traduisant des forces

d'adhésion sur une gamme allant de 0,4 à 4 nN. Les valeurs de force semblent définir des grains et des joints de grains en surface. Cette topographie est également observée sur l'image AFM de la « topographie récupérée » (Figure 87-C) avec une échelle de hauteur qui indique une amplitude totale maximale de surface de 220 nm. L'échelle en couleurs des forces en nN sur la Figure 87-D, indique des forces plus élevées sur les joints de grains allant de 1,8 à 3 nN (couleur bleue) et des forces moins élevées sur les grains qui se situent entre 0,5 et 1,8 nN (couleur jaune).

Comme dans le cas de l'hydroxyapatite dense non polie, ces résultats semblent indiquer des forces d'adhésion plus élevées sur les joints de grains et moins importantes sur les grains. Afin de confirmer ces résultats, nous avons vérifié l'information de la « topographie récupérée » pour valider ces grains et joints de grains observés en surface. Les diamètres moyens des grains de la Figure 88 sont regroupés dans le Tableau 13. Les trois images A, B et C présentent respectivement un diamètre moyen des grains de  $0,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$  pour les images AFM de la « topographie récupérée » (Figure 88-A) et de la surface de la céramique réalisée à l'air (Figure 88-B) et de  $0,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$  pour le cliché MEB (Figure 88-C). La taille des grains calculée est appuyée par les deux profils de rugosité extraits des images AFM de la « topographie récupérée » (Figure 88-A) et de la surface de la céramique (Figure 88-B) présentés en Figure 89. Les deux profils indiquent la présence de vallées et de sommets et des hauteurs maximales Rz de  $0,12 \mu\text{m}$  sur le profil A (eau) et  $0,16 \mu\text{m}$  sur le profil B (air). Les rugosités surfaciques de l'image AFM de la « topographie récupérée » et de l'image AFM de surface présentées sur la Figure 88 sont très proches et sont respectivement de 24 nm et 23 nm. Ces résultats confirment bien que l'image AFM de la « topographie récupérée » correspond à une image AFM de la surface de la céramique en SiHA, ainsi l'affinité de la fibronectine est donc plus importante sur les joints de grains.

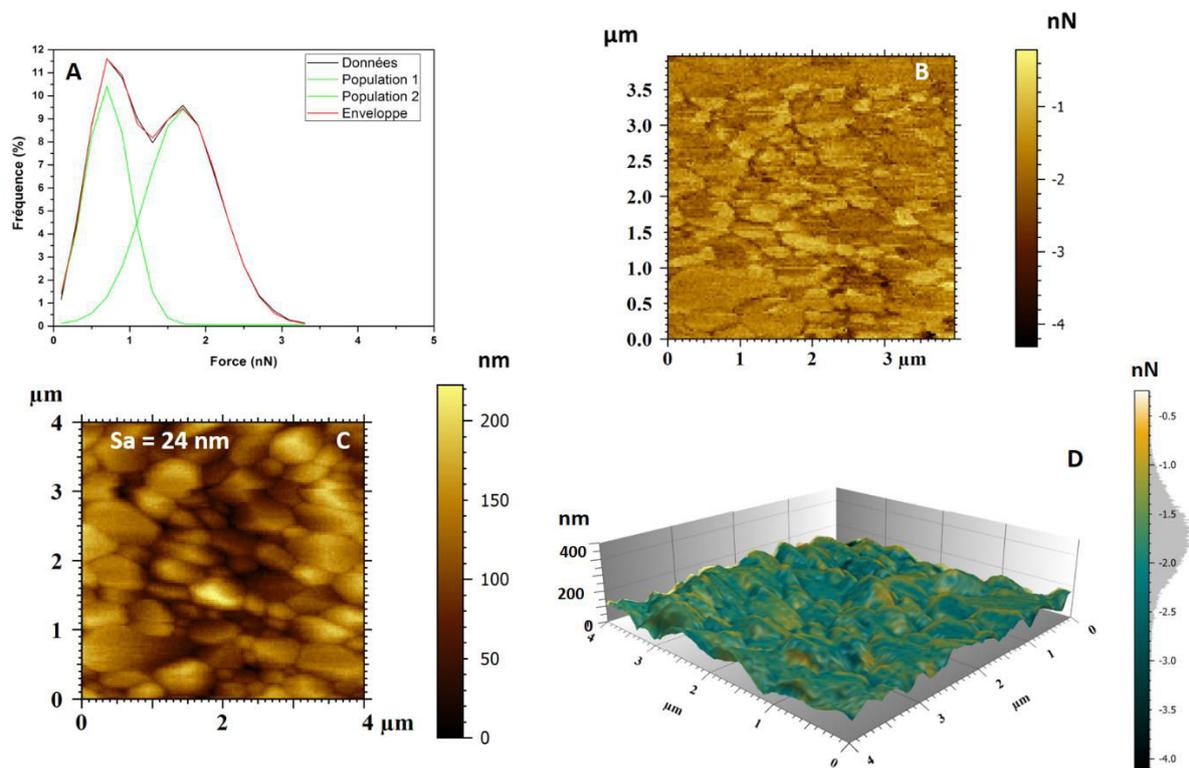


Figure 87 : Image AFM force-volume d'une céramique dense non polie en hydroxyapatite silicatée (SiHA) obtenue avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine (Fn), les mesures ont été réalisées en milieu aqueux (eau) et à 37°C avec A) histogramme en fréquence des forces mesurées modélisé par des gaussiennes, B) image AFM force-volume, C) image AFM de la « topographie récupérée » et D) vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée ».

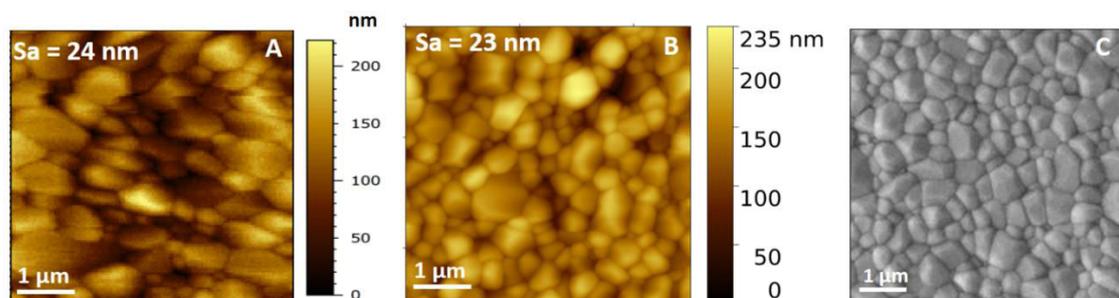


Figure 88 : Topographie d'une céramique dense et non polie en SiHA avec A) image AFM de la « topographie récupérée », B) image AFM de surface réalisée à l'air et en mode contact et C) cliché MEB.

Diamètre moyen ( $\mu\text{m}$ )			
	Image A	Image B	Image C
SiHA	$0,4 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,2$

Tableau 13 : Diamètre moyen des grains de l'hydroxyapatite silicatée (SiHA) calculé à partir de A) l'image AFM de la « topographie récupérée », B) l'image AFM de surface réalisée à l'air et en mode contact et C) du cliché MEB.

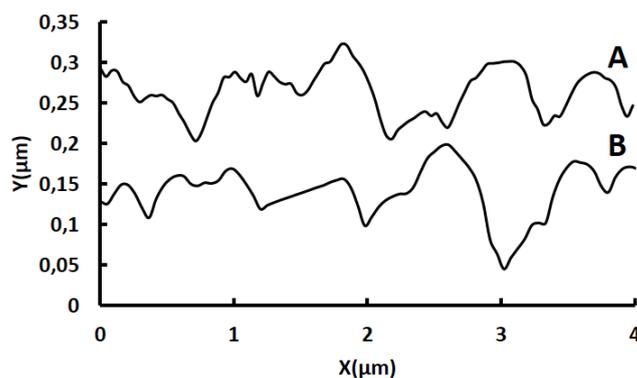


Figure 89 : Profils de rugosité extraits des images AFM A) de la « topographie récupérée » et B) de la surface de la céramique dense non polie en hydroxyapatite silicatée.

### III.1.4.2.2. Image AFM force-volume sur céramique polie en SiHA

Les résultats obtenus avec l'image AFM force-volume sur une céramique dense et polie en SiHA sont présentés en Figure 90. L'histogramme en fréquence (Figure 90-A) présente une distribution asymétrique des forces d'adhésion variant entre 0 et 1 nN avec une fréquence maximale de 10 %. Peu de forces sont enregistrées entre 0,5 et 1 nN. La force d'adhésion moyenne est de 0,3 nN. Les mêmes valeurs de forces sont présentées sur l'image AFM force-volume (Figure 90-B). Celle-ci révèle une distribution uniforme de ces forces d'adhésion de faible amplitude. L'image AFM de la « topographie récupérée » (Figure 90-C) indique une amplitude totale maximale de surface de 150 nm. La vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée » (Figure 90-D) met également en évidence une répartition homogène des forces d'adhésion allant de 0 à 0,5 nN.

La Figure 91 présente deux profils de rugosité extraits des images AFM de la « topographie récupérée » (profil A) et de la surface de la céramique réalisée à l'air (chapitre II, paragraphe II.2.2.9) (profil B). Les deux profils A et B présentent respectivement des hauteurs maximales  $R_z$  de 22 nm et 23 nm. Les deux profils A et B sont extraits de deux images AFM présentant des rugosités surfaciques respectives de 7 nm et de 4 nm (chapitre II, paragraphe II.2.2.9). Ces différences sont principalement attribuées à la zone scannée qui n'est pas identique dans les deux cas et à la présence aléatoire de quelques pores.

De manière générale, les forces d'adhésion sont très faibles avec une répartition homogène en surface.

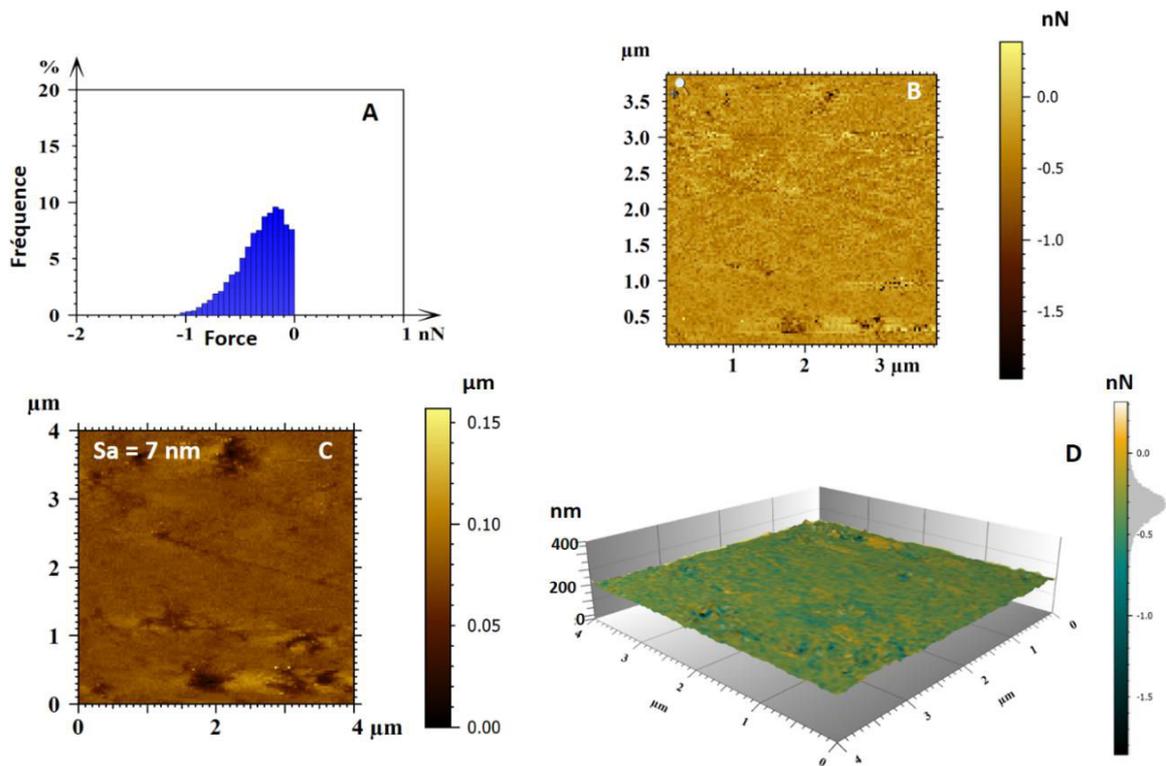


Figure 90 : Image AFM force-volume d'une céramique dense polie en hydroxyapatite silicatée (SiHA) obtenue avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine (Fn), les mesures ont été réalisées en milieu aqueux (eau) et à 37°C avec A) histogramme en fréquence des forces mesurées, B) image AFM force-volume, C) image AFM de la « topographie récupérée » et D) vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée ».

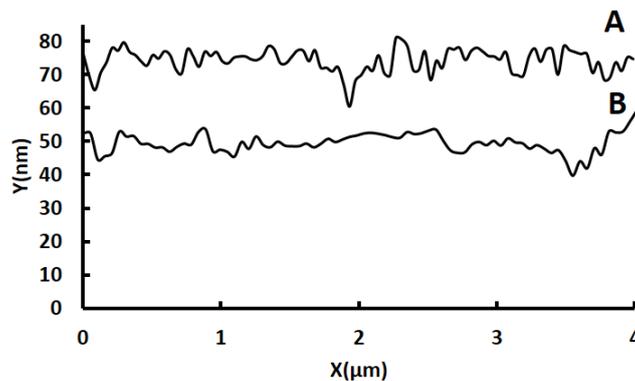


Figure 91 : Profils de rugosité extraits des images AFM A) de la « topographie récupérée » et B) de la surface de la céramique dense polie en hydroxyapatite silicatée.

### III.1.4.3. Hydroxyapatite carbonatée

Ce paragraphe présente les images AFM force-volume réalisées sur la céramique dense non polie et polie en CHA avec une pointe AFM fonctionnalisée par de la fibronectine. Les résultats

sont représentatifs de l'ensemble des images AFM force-volume obtenues avec ces céramiques.

#### III.1.4.3.1. Image AFM force-volume sur céramique non polie en CHA

L'histogramme en fréquence modélisé par des gaussiennes (Figure 92-A) présente une distribution étroite des forces d'adhésion sur la surface des substrats. Les forces d'adhésion varient entre 0,2 et 3 nN avec une fréquence maximale de 8 %. La force d'adhésion moyenne obtenue est de 1,3 nN. La première population représente une majorité de forces qui se situent entre 0,2 et 2,5 nN. Une deuxième population moins importante indique des forces entre 2,5 et 3 nN. On retrouve les mêmes forces sur l'image force-volume (Figure 92-B) qui présente des forces d'adhésion se situant majoritairement entre 0,5 et 2,5 nN sur l'échelle en couleur. L'aspect de la surface sur l'image AFM force-volume n'est pas bien défini. L'image AFM de la « topographie récupérée » (Figure 92-C) présente une amplitude maximale de surface de 160 nm. Cependant, l'image définit des grains qui semblent avoir une taille plus importante que celle observée habituellement pour une hydroxyapatite carbonatée. Ce point sera vérifié par la suite par le calcul des diamètres moyens des grains. Le contraste de couleur observé sur la vue 3D et traduit par l'échelle en couleur en nN (Figure 92-D) révèle des forces allant de 0,2 à 1,1 nN sur les sommets et des forces plus élevées qui se situent entre 1,1 nN et 2 nN sur les vallées.

Des diamètres moyens des grains de l'hydroxyapatite carbonatée ont été calculés sur les images présentées en Figure 93 et sont regroupés dans le Tableau 14. La taille des grains calculés à partir du cliché MEB et de l'image AFM de surface réalisée à l'air est de  $0,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$  alors que le diamètre calculé à partir de l'image AFM de la « topographie récupérée » est de  $0,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$ . Afin de confirmer cette différence de taille des grains, deux profils de rugosités extraits des images AFM de la « topographie récupérée » (Figure 93-A) et de la surface d'une céramique en CHA réalisée à l'air (Figure 93-B) sont présentés en Figure 94. Les deux profils A et B présentent respectivement des hauteurs maximales  $R_z$  de  $0,08 \mu\text{m}$  et  $0,11 \mu\text{m}$ . Les rugosités surfaciques de l'image AFM de la « topographie récupérée » et de l'image AFM de la surface d'une céramique en CHA (air) mentionnées en Figure 93 sont respectivement de 17 nm et 16 nm. Les valeurs des hauteurs maximales  $R_z$  et des rugosités surfaciques ( $S_a$ ) entre les deux milieux sont assez proches et confirment qu'il s'agit de la même information topographique mais la forme des grains n'est pas similaire dans les deux cas.

L'image AFM force-volume présentée en Figure 92 est la seule image issue d'un traitement complet des données. En effet, lors de ces mesures de forces, le système n'était pas stable pendant la durée de l'acquisition et induisait régulièrement un décrochage de la pointe (arrêt de l'acquisition). Seule cette image AFM force-volume a pu être obtenue en totalité en traitant

l'ensemble de jeu de données acquis en 4h30. Cependant, malgré l'arrêt fréquent de l'acquisition, les forces d'adhésion de la zone scannée ont pu être traitées et étaient toujours du même ordre de grandeur que celles affichées sur l'histogramme en fréquence (Figure 92-A).

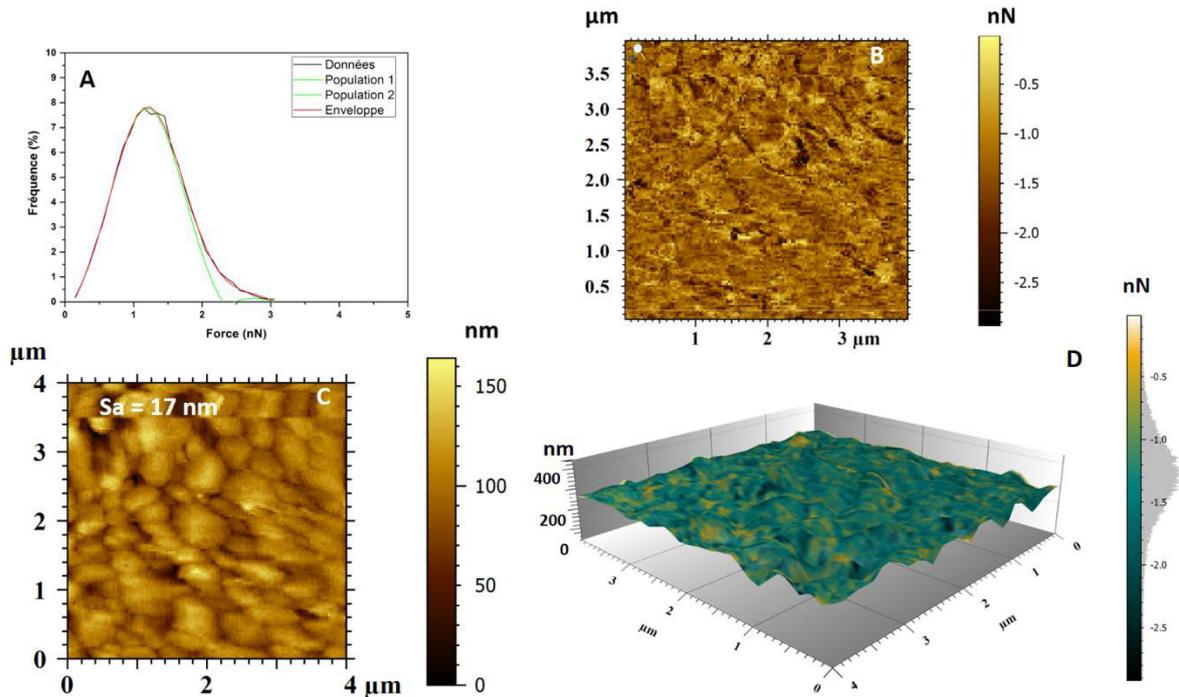


Figure 92 : Image AFM force-volume d'une céramique dense non polie en hydroxyapatite carbonatée (CHA) obtenue avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine (Fn), les mesures ont été réalisées en milieu aqueux (eau) et à 37°C avec A) histogramme en fréquence des forces mesurées modélisé par des gaussiennes, B) image AFM force-volume, C) image AFM de la « topographie récupérée » et D) vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée ».

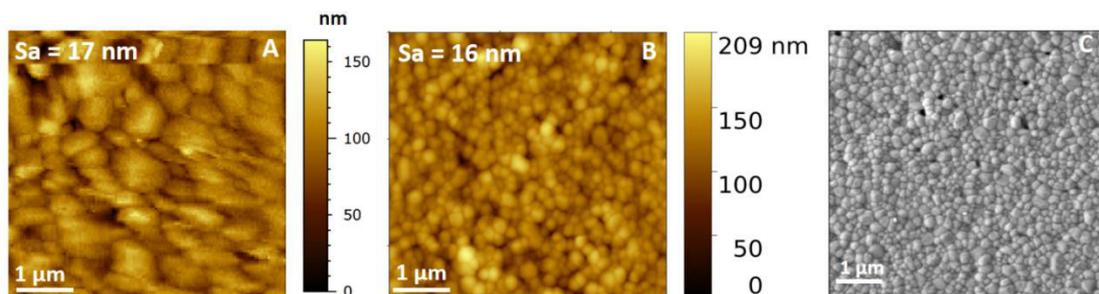


Figure 93 : Topographie d'une céramique dense et non polie en CHA avec A) image AFM de la « topographie récupérée », B) image AFM de surface réalisée à l'air et en mode contact et C) cliché MEB.

Diamètre moyen ( $\mu\text{m}$ )			
	Image A	Image B	Image C
CHA	$0,4 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$

Tableau 14 : Diamètre moyen des grains de l'hydroxyapatite carbonatée (CHA) calculé à partir de A) l'image AFM de la « topographie récupérée », B) l'image AFM de surface réalisée à l'air et en mode contact et C) du cliché MEB.

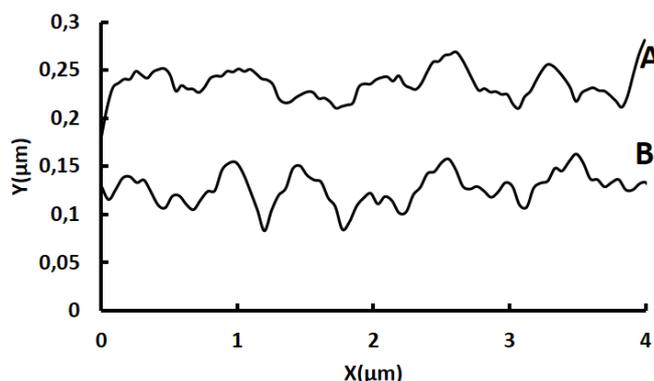


Figure 94 : Profils de rugosité extraits des images AFM A) de la « topographie récupérée » et B) de la surface de la céramique dense non polie en hydroxyapatite carbonatée.

### III.1.4.3.2. Image AFM force-volume sur céramique polie en CHA

L'ensemble des résultats obtenus avec l'image AFM force-volume sur une céramique dense et polie en CHA est présenté en Figure 95 .

L'histogramme en fréquence (Figure 95-A) présente une distribution asymétrique des forces d'adhésion sur la céramique avec des forces qui varient entre 0 et 0,5 nN et une fréquence maximale de 30 %. La force d'adhésion moyenne est de 0,1 nN. Ces forces sont également relevées sur l'image AFM force-volume (Figure 95-B) qui révèle une répartition homogène des faibles forces sur l'ensemble de la surface polie. L'amplitude totale maximale de surface affichée sur l'image AFM de la « topographie récupérée » (Figure 95-C) est autour de 36 nm. L'échelle en couleurs des forces sur la vue 3D (Figure 95-C) met également en évidence des forces d'adhésion faibles sur la totalité de la surface scannée qui varient majoritairement entre 0,05 et 0,25 nN.

La Figure 96 présente deux profils de rugosité extraits de l'image AFM de la « topographie récupérée » (profil A) et de l'image AFM de surface d'une céramique dense et polie en CHA réalisée à l'air (chapitre II- paragraphe II.2.2.9) (profil B). Les valeurs des hauteurs maximales  $R_z$  des deux profils A et B sont respectivement autour de 10 et 6 nm. Les rugosités surfaciques associées aux profils A et B sont respectivement de 8 et 2 nm. Cette légère différence de

rugosité est certainement due au fait que les deux zones scannées dans l'eau et à l'air ne sont pas identiques.

L'ensemble de ces résultats confirme la présence de très faibles forces d'adhésion d'une manière assez homogène sur la totalité de la surface polie en CHA.

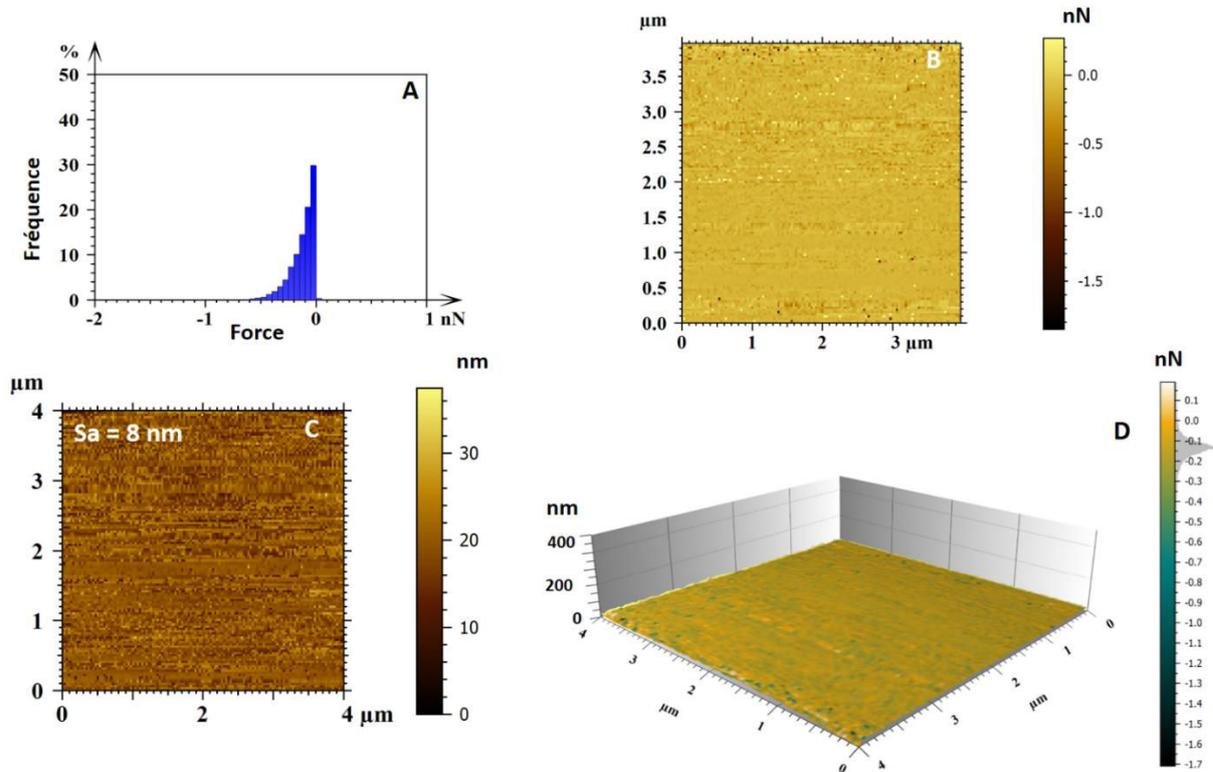


Figure 95 : Image AFM force-volume d'une céramique dense polie en hydroxyapatite carbonatée (CHA) obtenue avec une pointe fonctionnalisée par de la fibronectine (Fn), les mesures ont été réalisées en milieu aqueux (eau) et à 37°C avec A) histogramme en fréquence des forces mesurées, B) image AFM force-volume, C) image AFM de la « topographie récupérée » et D) vue 3D de la surface multicouche combinant l'image AFM force-volume et l'image AFM de la « topographie récupérée ».

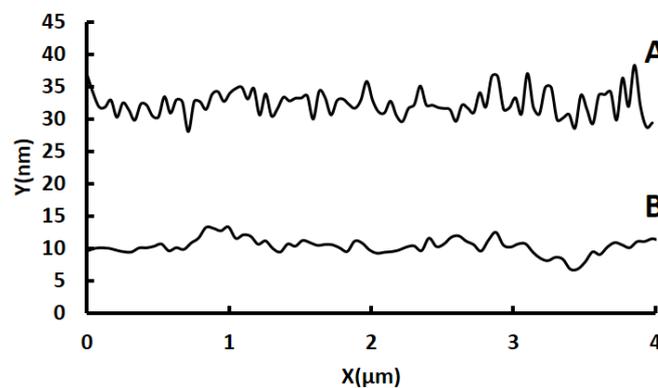


Figure 96 : Profils de rugosité extraits des images AFM A) de la « topographie récupérée » et B) de la surface de la céramique dense polie en hydroxyapatite carbonatée.

### III.1.5. Discussion

L'affinité de la fibronectine pour des céramiques denses en HA, SiHA et CHA a été étudiée en spectroscopie de force. Les mesures des forces d'adhésion de la fibronectine ont été effectuées d'une part sur des céramiques denses et polies pour évaluer l'influence de la composition chimique et, d'autre part sur des céramiques denses et non polies pour évaluer l'influence de la topographie. Les forces d'adhésion obtenues ont permis de construire des images AFM force-volume.

La Figure 97 récapitule les histogrammes en fréquence des forces d'adhésion mesurées sur l'ensemble des céramiques. Le Tableau 15 regroupe les différentes propriétés physico-chimiques des céramiques phosphocalciques en HA, SiHA et CHA.

Les histogrammes en fréquence des forces d'adhésion mesurées sur les surfaces polies des céramiques en HA, en SiHA et en CHA présentent des distributions asymétriques et similaires avec des forces très faibles et du même ordre de grandeur. La force d'adhésion moyenne est de 0,3 nN pour HA et SiHA et de 0,1 nN pour CHA. Les profils de rugosité extraits des images AFM de la surface des céramiques polies en milieu liquide n'ont montré aucune évolution significative de l'état de la surface comparé à ceux extraits des images AFM de surface réalisées à l'air. La substitution des groupements phosphates par les silicates (1,13 %m de silicium) dans le cas d'une céramique en SiHA et par les carbonates (4,74 %m de carbonates) dans le cas d'une CHA n'a pas d'influence notable sur les forces d'adhésion. Malgré le peu d'adhésion obtenu sur les surfaces polies, l'aspect similaire des histogrammes et des forces mesurées du même ordre de grandeur laissent penser à une absence d'influence chimique sur les forces d'adhésion.

Des travaux ont été réalisés par Velzenberger *et al.* sur les forces d'adhésion de la fibronectine sur la surface lisse d'une boîte de polystyrène recouverte de polymère anti adhésif (PolyHEMA,  $S_a = 4,8$  nm) et une boîte de polystyrène traitée pour la culture cellulaire ( $S_a = 2,5$  nm) [132]. La force d'adhésion obtenue était de  $0,091 \pm 0,018$  nN sur le PolyHEMA et de  $0,143 \pm 0,057$  nN pour le polystyrène traité pour la culture cellulaire.

La majorité des forces obtenues ici sur des substrats polis se situent entre 0,1 et 0,2 nN. Ces valeurs sont en accord avec la littérature, ce qui confirme que les forces d'adhésion sur des surfaces lisses sont généralement assez faibles. La fibronectine semble peu adhérer bien que les céramiques à base d'hydroxyapatite soient connues pour leur grande capacité à adsorber la fibronectine [8], [245]. De plus la mouillabilité des différentes surfaces (Tableau 15) indique une surface hydrophile avec des charges négatives pour les trois céramiques ce qui est sensée favoriser l'affinité pour la fibronectine [138].

Les images AFM force-volume sur les céramiques polies ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles sur les céramiques non polies afin d'avoir des résultats comparables entre les deux surfaces. Le temps de contact a été fixé à une seconde pour une durée d'acquisition raisonnable de 4 h30. Ces paramètres n'ont pas permis de révéler l'influence de la composition chimique sur les forces d'adhésion. Afin de pouvoir différencier les trois compositions chimiques, une modification des paramètres d'acquisition peut s'avérer judicieuse. En effet une augmentation du temps de contact jusqu'à 5 s pourrait affecter l'allure des courbes de force et montrer une adhésion plus importante [191]. Cela peut être accompagné d'une taille du scan plus petite que  $4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$  afin d'avoir un temps d'acquisition raisonnable. Des travaux similaires, mais réalisés avec des paramètres d'acquisition différents, conduits par Marie Lasgorceix lors de son stage de master sur des forces d'adhésion de la fibronectine (mesures ponctuelles en milieu PBS) ont montré des forces d'adhésion de l'ordre de 4 nN en moyenne sur des céramiques denses et polies en HA et SiHA. Le temps de contact était d'une minute ce qui a permis d'obtenir des forces d'adhésion plus importantes comparées à celles obtenues dans ce présent travail.

Les histogrammes en fréquence des forces d'adhésion sur les céramiques non polies (Figure 97) conduisent à une force d'adhésion moyenne de 4,4 nN pour HA avec une distribution large des forces acquises en surface, alors que pour les céramiques en SiHA et CHA, les forces d'adhésion moyennes sont de 1,3 nN avec une distribution étroite des forces d'adhésion.

Les rugosités surfaciques ( $S_a$ ) des céramiques denses et non polies en HA, SiHA et CHA sont respectivement de 21, 23 et 16 nm. La taille moyenne des grains est de  $0,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$  pour HA,  $0,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$  pour SiHA et  $0,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$  pour CHA. Les céramiques en HA et en SiHA ont des rugosités surfaciques ( $S_a$ ) et des tailles moyennes de grains du même ordre de grandeur. L'hydroxyapatite carbonatée se distingue par une rugosité moindre et des grains plus petits. En se basant uniquement sur ces deux points, la chimie n'ayant pas *a priori* d'influence, les forces d'adhésion sur les céramiques en HA et SiHA devraient être assez proches. Or, ce sont les forces sur les céramiques en CHA et SiHA qui sont du même ordre de grandeur. Ainsi, ces différents résultats ne sont pas attribuables uniquement à la topographie mais peut-être à l'influence de la substitution par le silicium et par les carbonates qui n'a pas été mise en évidence sur les céramiques polies. En effet, la face polie n'a pas été exposée à la température lors du frittage, la chimie entre surfaces polies et non polies n'est donc probablement pas la même.

Les potentiels zêta des poudres de HA, SiHA et CHA calcinées aux températures de frittage sont respectivement  $-44 \pm 3$ ,  $-43 \pm 1$  et  $-38 \pm 2$  mV. Tout comme pour les caractéristiques physiques de la céramique en CHA, le potentiel zêta de la poudre CHA diffère des autres et est supérieur à celui des poudres HA et SiHA. La fibronectine ne possède pas de charge

globale fixe, sa charge va dépendre de son module exposé (chapitre I.3.1.2) qui va porter soit une charge négative soit une charge positive et qui va interagir par la suite avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SiO}_4^{4-}$  ou  $\text{CO}_3^{2-}$  présents à la surface de la céramique. Les interactions entre la fibronectine et la surface des céramiques dépendent de la contribution de plusieurs facteurs mis en jeu pour lesquels des questions demeurent. La chimie aux joints de grains n'est pas exactement la même que sur les grains ce qui laisse penser à une influence conjointe de la topographie et de la chimie en particulier aux joints de grains.

La distribution large des forces d'adhésion observée à la surface de la céramique en HA est peut-être due à une interaction entre plusieurs molécules sur la pointe AFM et la topographie. Gelmi *et al.* ont montré que la mesure de forces hétérogènes corrèle généralement avec une augmentation du nombre ( $n$ ) de molécules en interaction [246]. Des forces élevées de l'ordre de quelques nN indiquerait donc une interaction entre plusieurs molécules présentes sur la pointe AFM et la surface de l'échantillon. En revanche, des forces de l'ordre de 0,2 nN impliqueraient une interaction avec une molécule unique. La fibronectine se trouve sur l'ensemble de la pointe (voir Figure 64, paragraphe III.1.1.2) et le rayon de courbure de la pointe fonctionnalisée (Fn + Alexa Fluor) est de 45,5 nm. Les interactions entre la pointe fonctionnalisée et un joint de grain ne semblent pas être limitées à une molécule unique mais s'étendraient aux autres molécules présentes sur l'ensemble de la pointe d'où les forces d'adhésion élevées observées sur la céramique dense et non polie en HA (Figure 98). Cependant, sachant que les céramiques en HA et en SiHA ont quasiment la même topographie, les forces sur les deux céramiques devraient être assez proches. Si les forces d'adhésion sont plus importantes aux joints de grains, la chimie reste un facteur influençant en particulier aux joints de grains.

Les difficultés rencontrées lors des acquisitions des images AFM force-volume sur une céramique dense et non polie en CHA (arrêts des acquisitions, aucune définition sur l'image AFM force-volume et forme et taille des grains incohérentes avec l'image AFM de la topographie) peuvent être améliorées. Compte tenu de la taille moyenne des grains ( $0,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ), scanner une zone plus petite que  $4 \times 4 \mu\text{m}^2$  et augmenter le temps de contact pourraient apporter de nouvelles informations.

L'ensemble de ces résultats conclut sur le fait que la microstructure ne semble pas être le paramètre majeur influençant l'affinité de la fibronectine. La substitution des groupements phosphates par des silicates ou des carbonates doit certainement avoir un impact même si l'influence de celle-ci n'a pas été mise en évidence par les mesures sur surfaces polies.

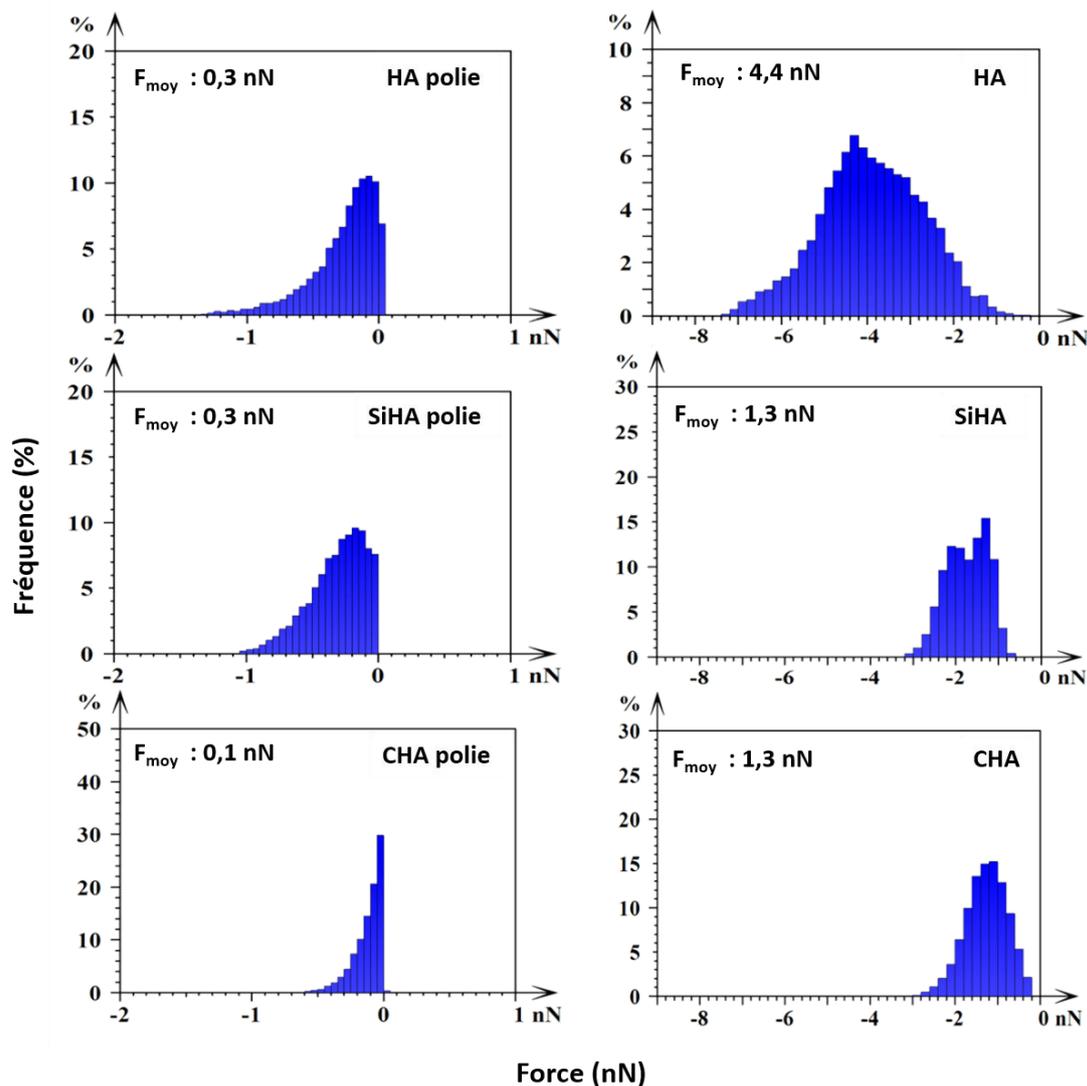


Figure 97 : Histogrammes en fréquence des forces d'adhésion mesurées sur les céramiques denses polies et non polies en HA, SiHA et CHA.

	HA	SiHA	CHA
<b>Rugosité Sa (nm)</b>	21	23	16
<b>Taille des grains (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	$0,7 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,1$
<b>Mouillabilité (<math>^\circ</math>)</b>	$56 \pm 4$	$50 \pm 2$	$51 \pm 2$
<b>Potentiel zêta (mV)</b>	$-44 \pm 3$	$-43 \pm 1$	$-38 \pm 2$
<b>Energie de surface (mN/m)</b>	48	50	49

Tableau 15 : Propriétés physico-chimiques des céramiques phosphocalciques HA, SiHA et CHA établies au chapitre II. Les rugosités sont obtenues à partir des images AFM de surface réalisées à l'air, la taille moyenne des grains est calculée à partir des clichés MEB, les mesures d'angle de contact sont effectuées sur des céramiques polies et les potentiels zêta sur des poudres calcinées aux températures de frittage.

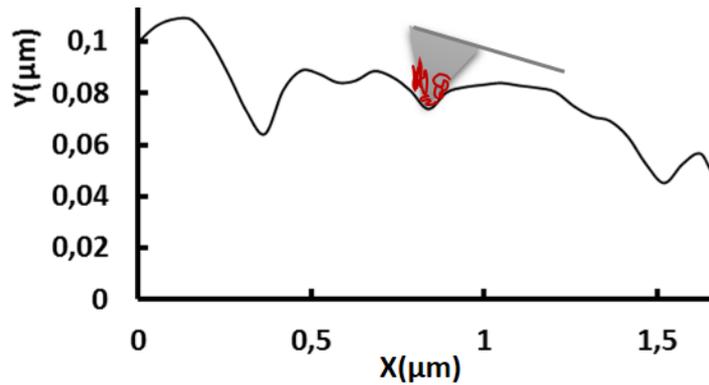
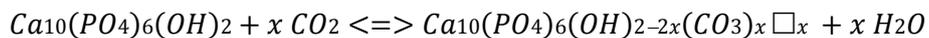


Figure 98 : Schéma illustrant une interaction entre une pointe AFM fonctionnalisée par la fibronectine et une vallée (joint de grain) sur un profil de rugosité.

### III.1.6. Conclusion

Pour améliorer notre compréhension des interactions physiques protéines-céramiques et plus précisément entre une protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire et un biomatériau phosphocalcique, la spectroscopie de force a été utilisée pour évaluer les interactions de la fibronectine sur des céramiques denses en hydroxyapatite, en hydroxyapatite silicatée et en hydroxyapatite carbonatée. Les images AFM force-volume sur les céramiques denses et polies en HA, en SiHA et en CHA n'ont pas révélé d'influence significative de la composition chimique. L'ensemble des résultats obtenus sur les céramiques denses et non polies ont mis en évidence une influence de la microstructure modulée par la composition chimique.

Afin de préciser ce point, effectuer des mesures à microstructure constante mais en faisant varier la chimie pourrait être pertinent. Cette perspective peut être envisageable dans le cas des hydroxyapatites carbonatées afin d'évaluer l'influence des carbonates sur l'affinité de la fibronectine. Il faudrait réaliser une image AFM force-volume sur une céramique dense et non polie en HA puis la fritter sous atmosphère  $CO_2$ . Cela permettrait d'avoir une carbonatation in situ (voir réaction ci-dessous [43]) tout en gardant la microstructure constante et identique à celle de la céramique dense en HA. La carbonatation de la surface permettrait alors de révéler l'influence de la composition chimique tout en s'affranchissant de l'effet topographie.



En général, l'affinité de la fibronectine demeure plus importante sur des surfaces présentant une certaine rugosité (grains et joints de grains) par rapport à des surfaces lisses. Les forces d'adhésion sur les joints de grains sont plus importantes que celles sur les grains. Les interactions seraient établies entre la fibronectine présente sur l'ensemble de la pointe AFM et la surface de la céramique. L'hydroxyapatite stœchiométrique (HA) indique alors une forte affinité pour la fibronectine qui pourrait se traduire par une meilleure adhésion cellulaire.

## III.2. Suivi de l'évolution de la fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques

Cette étude a pour but de suivre l'évolution de la fonctionnalisation de céramiques inorganiques par des molécules organiques. Le but ultime est d'immobiliser le facteur de croissance VEGF (protéine de l'angiogenèse) sur des céramiques denses en hydroxyapatite (HA) et en hydroxyapatite carbonatée (CHA). La Figure 99 résume l'édifice de fonctionnalisation utilisé et détaillé dans le paragraphe II.3 du chapitre II. Chaque étape de fonctionnalisation a été caractérisée par imagerie Raman et spectroscopie de photoélectrons X. Les topographies de chaque étape de fonctionnalisation ont également été contrôlées par microscopie à force atomique.

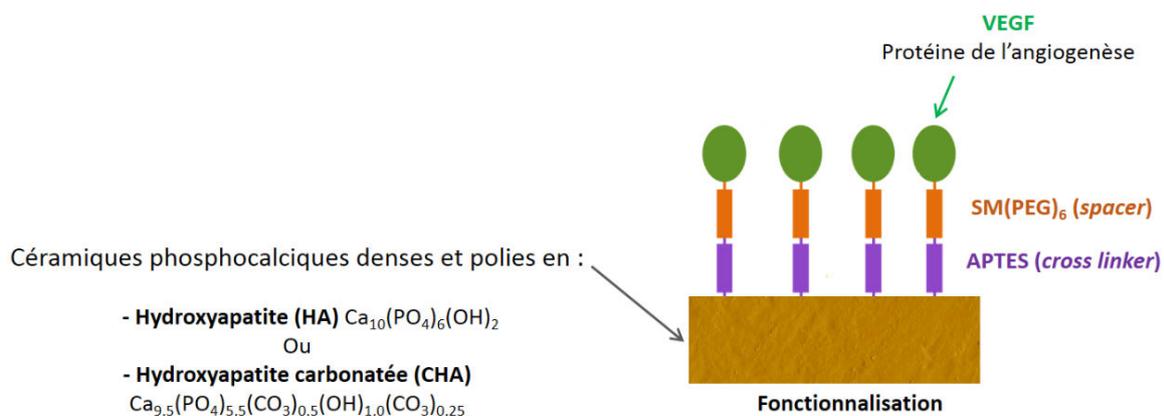


Figure 99 : Représentation schématique de l'immobilisation du facteur de croissance VEGF sur des céramiques denses et polies en HA ou en CHA.

### III.2.1. Caractérisation de la chimie de surface par imagerie Raman

Avant d'imager les surfaces par spectroscopie Raman, une parfaite connaissance des spectres individuels est nécessaire afin de clairement identifier les gammes spectrales d'intérêt. Les différentes étapes de fonctionnalisation sont rappelées à la Figure 100. Une silanisation de surface par l'APTES est l'étape clé. Elle apporte les fonctions de type C-H mais surtout -NH<sub>2</sub> indispensables à l'addition sélective du SM(PEG)<sub>6</sub>. La réaction entre le NHS ester du SM(PEG)<sub>6</sub> et les fonctions amines de l'APTES conduit à l'apparition de fonctions amides (R-C(=O)-NH-R') et induit une augmentation de la quantité d'éléments de carbone aliphatique (fonctions de type C-H). La troisième étape consiste à immobiliser le VEGF thiolé (VEGF-SH) sur la fonction maléimide du SM(PEG)<sub>6</sub>. Toutes les étapes de fonctionnalisation ont été réalisées en milieu anhydre.

Au cours de ce travail, la nomenclature suivante sera utilisée :

- les céramiques en HA et en CHA avant fonctionnalisation seront notées HA et CHA ;

- les mêmes céramiques après silanisation seront notées HA-T et CHA-T ;
- après addition du SM(PEG)<sub>6</sub>, elles seront notées HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> et CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> ;
- après addition du VEGF, elles seront notées HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF et CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF.

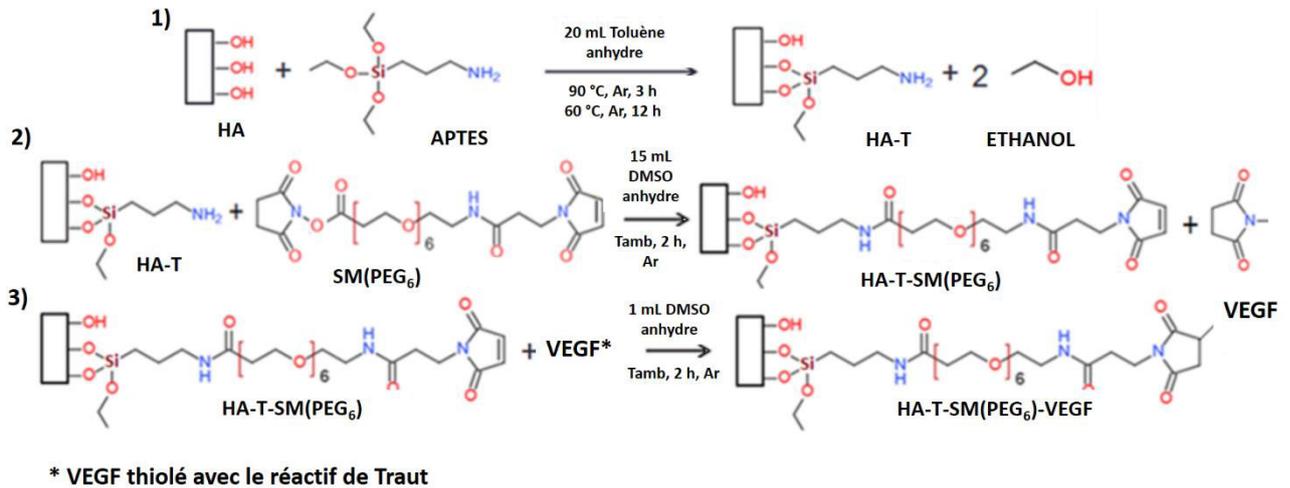


Figure 100 : Schéma réactionnel général de la fonctionnalisation de la surface d'une céramique dense en HA par le VEGF, 1) silanisation, 2) addition du SM(PEG)<sub>6</sub> et 3) addition du VEGF.

### III.2.1.1. Spectres ponctuels

#### III.2.1.1.1. Hydroxyapatite

Les spectres ponctuels acquis après chaque étape de fonctionnalisation de la céramique en HA par le VEGF sont présentés en Figure 101. Les spectres ont été enregistrés de manière aléatoire à la surface, ils ne sont pas normalisés, ainsi aucune comparaison directe entre les intensités intégrées des bandes (bandes d'élongation de la liaison C-H par exemple) ne peut être établie. L'indexation des spectres a été principalement effectuée en se basant sur des tables de vibrations en Infrarouge.

Les quatre spectres de la Figure 101 présentent des bandes communes attribuées aux groupements phosphates du substrat céramique et situées à 960 cm<sup>-1</sup>( $\nu_1$ ), 430 cm<sup>-1</sup>( $\nu_2$ ), entre 1057 et 1078 cm<sup>-1</sup>( $\nu_3$ ) et entre 592 et 608 cm<sup>-1</sup>( $\nu_4$ ). La bande observée à 3573 cm<sup>-1</sup> correspond au mode d'élongation symétrique ( $\nu_s$ ) du groupement hydroxyde (OH) de la structure apatite. Le spectre (B) de la céramique HA-T présente des bandes de faibles intensités caractéristiques de l'amine primaire (NH<sub>2</sub>) de l'APTES situées à 3314 et 3389 cm<sup>-1</sup>, elles sont associées aux élongations asymétrique et symétrique de la liaison N-H. La même bande est observée sur le spectre (D) de la céramique HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF et correspond à l'élongation de la liaison N-H. Cette bande est absente du spectre (C) de la céramique HA-T-

SM(PEG)<sub>6</sub>, cela peut être dû au fait que l'acquisition a été effectuée sur une zone où le SM(PEG)<sub>6</sub> n'a pas été majoritairement fixé.

Les trois étapes de fonctionnalisation (spectres : B, C, D) donnant lieu à des bandes communes caractéristiques de composés organiques. La bande d'élongation de la liaison C-H est observée autour de 2900 cm<sup>-1</sup>, la déformation angulaire δ(CH) à 1439 cm<sup>-1</sup> et la bande caractéristique de la déformation de cisaillement des groupements (Si-CH) à 1460 cm<sup>-1</sup>. La bande amide III du VEGF est observée à 1332 cm<sup>-1</sup>, elle est associée à une élongation de la liaison C-N couplée à la déformation de la liaison N-H (spectre D). La bande amide I du VEGF correspondant à l'élongation de la liaison C=O est observée à 1656 cm<sup>-1</sup>. Cette position qui correspond aux feuillettes β informe sur la structure secondaire de la protéine [209].

Bien que la signature vibrationnelle du SM(PEG)<sub>6</sub> ne soit pas mise en évidence lors de l'acquisition du spectre C (faible intensité de la bande ν(C-H) et absence de la bande ν(N-H)), les molécules organiques ajoutées lors des trois étapes de fonctionnalisation ont une partie de leur réponse vibrationnelle dans une zone de fréquence (2450-3450 cm<sup>-1</sup>) où il n'existe aucun mode caractéristique de la céramique en HA (spectre A), ce qui rend la suite de l'étude beaucoup plus aisée.

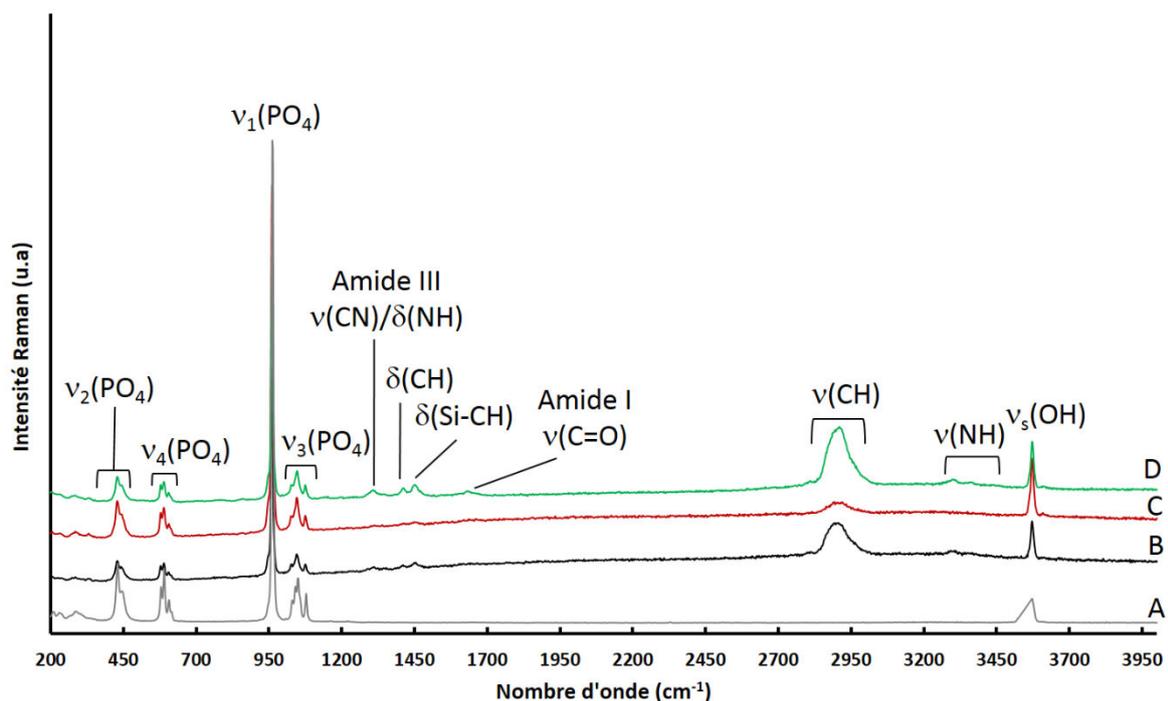


Figure 101 : Spectres ponctuels Raman des céramiques A) HA, B) HA-T, C) HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> et D) HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF dans l'intervalle 200-4000 cm<sup>-1</sup> (532 nm, objectif x100, durée d'acquisition de 10 s).

Les spectres ponctuels acquis dans l'intervalle 200-4000  $\text{cm}^{-1}$  n'ont pas révélé la présence des acides aminés caractéristiques du VEGF. En effet, la bande d'élongation du groupement phosphate  $\nu_1(\text{PO}_4)$  observée à 960  $\text{cm}^{-1}$  est si intense que les bandes de faibles intensités des acides aminés du VEGF ne sont pas visibles. La densité supposée d'APTES immobilisé à la première étape de fonctionnalisation sur une céramique dense en HA est de l'ordre de  $8.10^{-20} \text{ mol}/\mu\text{m}^2$  [171], ce qui ne facilite pas la détection des acides aminés du VEGF présent en faible quantité en surface.

Un spectre enregistré sur la céramique HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF en choisissant une zone où le VEGF semblait être immobilisé a conduit à une saturation du détecteur au niveau de la bande  $\nu_1(\text{PO}_4)$ . Le spectre acquis est présenté en Figure 102. La différence par rapport au spectre de la Figure 101-D est l'apparition de bandes de très faibles intensités à 852  $\text{cm}^{-1}$ , qui peut être associée à la chaîne latérale aromatique de l'acide aminé de la tyrosine (Tyr), et à 1195  $\text{cm}^{-1}$  qui peut être associée à un mélange des acides aminés de la tyrosine et de la phénylalanine (Phe). Enfin un faible épaulement de la bande caractéristique de la phénylalanine (Phe) est observé à 1611  $\text{cm}^{-1}$ .

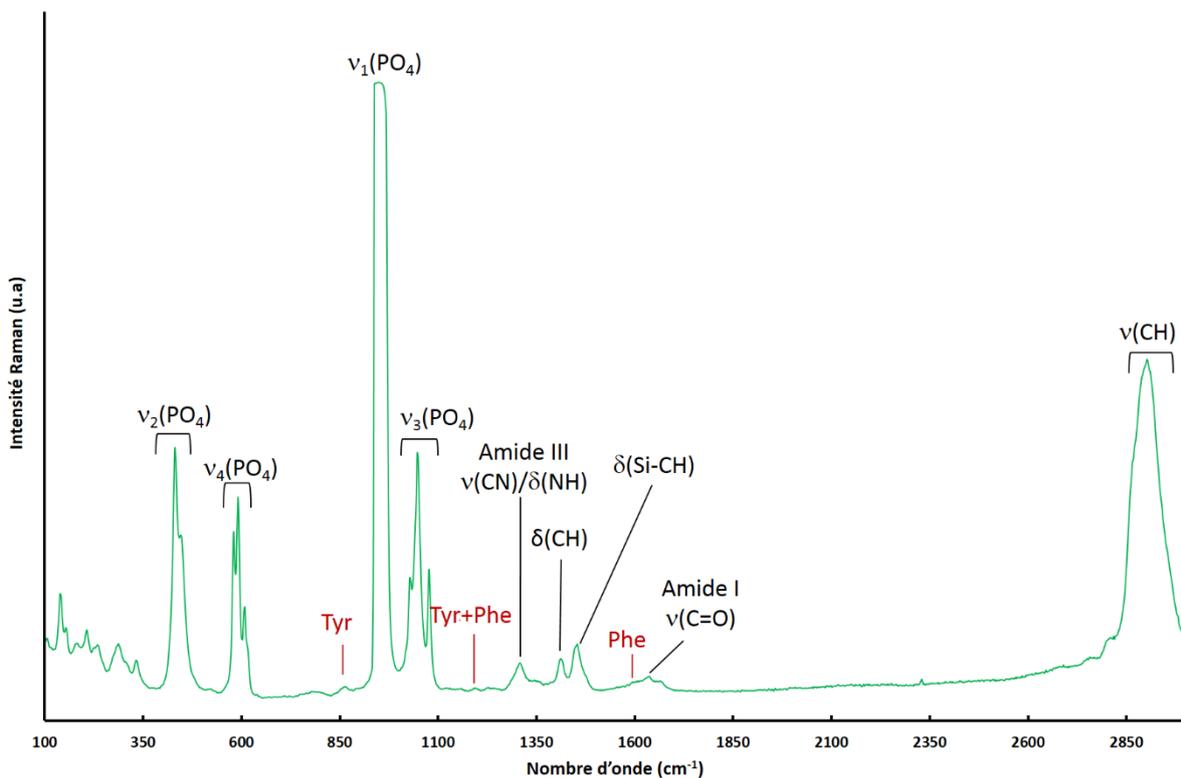


Figure 102 : Spectre ponctuel Raman de la céramique HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF dans l'intervalle 100-3000  $\text{cm}^{-1}$  (532 nm, objectif x100, durée d'acquisition de 10 s).

Afin de s'affranchir des différentes bandes  $\text{PO}_4$  de la céramique en HA qui sont très intenses par rapport aux bandes des molécules organiques ajoutées lors des trois étapes de fonctionnalisation, d'autres spectres ponctuels ont été acquis dans l'intervalle  $1400\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ , les spectres sont présentés en Figure 103. La normalisation des données a été réalisée sur l'intensité intégrée totale des spectres. En évitant la zone de fréquences de vibration des modes du groupement phosphate  $\text{PO}_4$ , les bandes caractéristiques des liaisons chimiques présentes dans les différentes molécules organiques (APTES,  $\text{SM}(\text{PEG})_6$ , VEGF) sont plus intenses par rapport à celles obtenues en Figure 101. Le spectre A (HA-T) présente une bande de déformation de la liaison N-H de l'amine primaire ( $\text{NH}_2$ ) à  $1638\text{ cm}^{-1}$ . Les bandes de l'amine primaire ( $\text{NH}_2$ ) entre  $3314$  et  $3389\text{ cm}^{-1}$  associées aux élongations asymétrique et symétrique de la liaison N-H sont également distinctes sur le spectre A. La réaction entre l'amine primaire de l'APTES et le NHS ester du *spacer*  $\text{SM}(\text{PEG})_6$  engendre des fonctions chimiques amides ( $\text{R-C(=O)-NH-R'}$ ). Les bandes observées respectivement à  $1653$  et  $3326\text{ cm}^{-1}$  sont donc associées aux élongations des liaisons N-H et C=O. Ces bandes sont également présentes sur le spectre HA-T- $\text{SM}(\text{PEG})_6$ -VEGF (C). La réaction entre l'APTES et le  $\text{SM}(\text{PEG})_6$  est donc mise en évidence. Les spectres Raman des différentes étapes de fonctionnalisation présentent une bande commune située à  $2909\text{ cm}^{-1}$  et qui est associée à l'élongation de la liaison C-H. Cette bande est plus intense comparée à celle observée sur les spectres de la Figure 101.

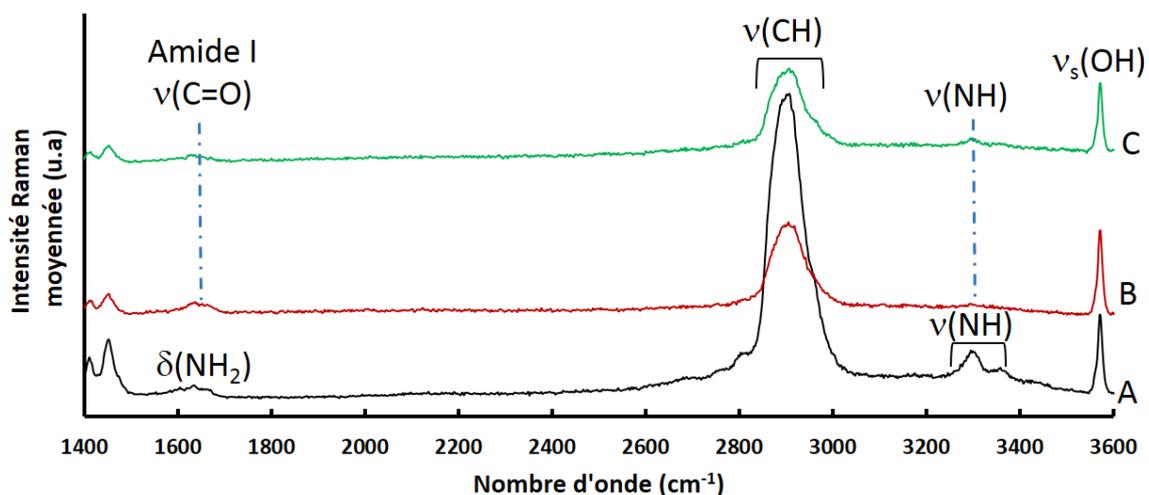


Figure 103 : Spectres ponctuels Raman : A) HA-T, B) HA-T- $\text{SM}(\text{PEG})_6$ , C) HA-T- $\text{SM}(\text{PEG})_6$ -VEGF en mode confocal dans l'intervalle  $1400\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$  (532 nm, objectif x100, durée d'acquisition de 5 s).

Cette étape de faisabilité a montré que l'on était en mesure, de manière indirecte, par l'augmentation de l'intensité intégrée (après normalisation des données) de la bande  $\nu(\text{C-H})$  de mettre en évidence la présence successive de l'APTES, puis du  $\text{SM}(\text{PEG})_6$  et enfin du VEGF. L'acquisition des spectres a été réalisée à des positions aléatoires sur la céramique en

HA fonctionnalisée, d'où une intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  qui n'augmente pas au fil des étapes de fonctionnalisation comme on aurait pu le supposer. Il sera donc nécessaire lors des étapes d'acquisition d'images Raman, d'enregistrer les données des spectres successifs après chaque étape de fonctionnalisation strictement sur la même zone.

### III.2.1.1.2. Hydroxyapatite carbonatée

La même étude a été réalisée sur la céramique de type CHA. Des spectres Raman ponctuels ont été enregistrés sur des positions aléatoires à la surface de la céramique en CHA fonctionnalisée par le VEGF. Les spectres ne sont pas normalisés donc les intensités intégrées de la bande d'élongation de la liaison C-H entre les différentes étapes de fonctionnalisation ne peuvent pas être comparées. La Figure 104 présente quatre spectres A, B, C et D qui correspondent respectivement à la céramique en CHA, l'étape de silanisation (CHA-T), l'addition du SM(PEG)<sub>6</sub> (CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>) et l'addition du VEGF (CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF). Les spectres de la céramique en CHA fonctionnalisée sont similaires à ceux de la céramique en HA fonctionnalisée (Figure 101). Néanmoins, à 1110 cm<sup>-1</sup> une bande supplémentaire caractéristique du mode de vibration  $\nu_1$  des ions carbonates qui ont substitué une partie des ions (OH<sup>-</sup>) dans l'hydroxyapatite (substitution de type A) est observée.

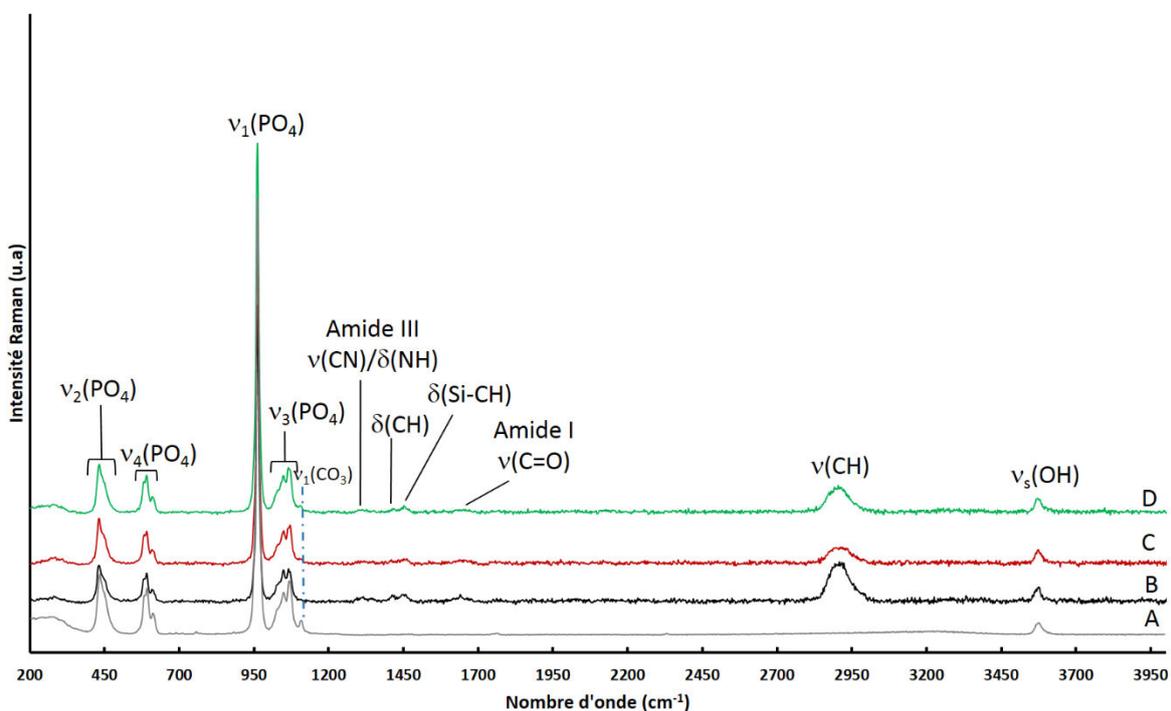


Figure 104 : Spectres ponctuels Raman des céramiques A) CHA, B) CHA-T, C) CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> et D) CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF dans l'intervalle 200-4000 cm<sup>-1</sup> (532 nm, objectif x100, durée d'acquisition de 10 s).

Même en saturant l'intensité de la bande  $\nu_1$  des  $\text{PO}_4$ , les bandes attribuées à la tyrosine et au mélange (phénylalanine-tyrosine) respectivement à 887 et 1161  $\text{cm}^{-1}$  sont extrêmement faibles (Figure 105). Comme pour la céramique HA, nous focaliserons donc notre étude sur la variation d'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  entre 2800 et 3000  $\text{cm}^{-1}$ .

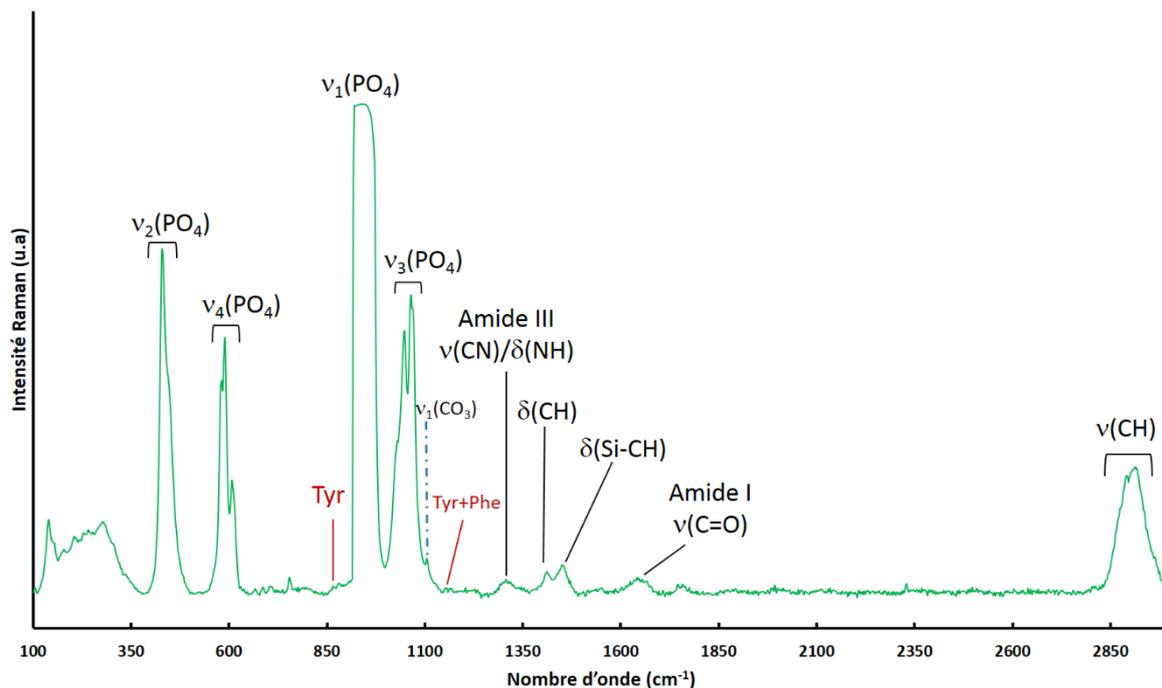


Figure 105 : Spectre ponctuel Raman CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF dans l'intervalle 100-3000  $\text{cm}^{-1}$  (532 nm, objectif x100, durée d'acquisition de 10 s).

La Figure 106 présente les spectres Raman de la céramique en CHA et de ses trois étapes de fonctionnalisation avec une normalisation sur l'intensité intégrée totale des spectres. Les spectres présentent un moins bon rapport signal/bruit que ceux obtenus pour la céramique en HA. En effet, l'hydroxyapatite carbonatée présente une luminescence importante entre 1200 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  à la longueur d'onde de travail (532 nm), une soustraction de la ligne de base a donc été appliquée à tous les spectres afin de s'affranchir de cette luminescence. Les spectres Raman montrent les mêmes bandes caractéristiques des différentes molécules organiques observées sur les spectres de la céramique en HA fonctionnalisée par le VEGF (Figure 103). Cependant le spectre A réalisé après silanisation (CHA-T) montre une seule bande associée à l'élongation de la liaison N-H (amine primaire) au lieu de deux. Cette bande est observée à 3314  $\text{cm}^{-1}$ . Cela peut être dû au fait que l'acquisition du spectre A (CHA-T) a été réalisée sur une zone où très peu d'APTES a été ajouté. La bande à 1592  $\text{cm}^{-1}$  sur le spectre C (HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF) est attribuée à l'acide aminé de la tyrosine. L'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  du spectre B (HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>) est moins élevée que celle observée sur le spectre A

(CHA-T), la zone d'acquisition du spectre B s'avère être une zone où très peu de SM(PEG)<sub>6</sub> a été ajouté. Cependant, une forte augmentation de l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  est observée à l'étape de l'addition du VEGF (spectre C). On a donc un apport en éléments carbone aliphatiques plus important. Cela confirme la présence de la protéine du VEGF.

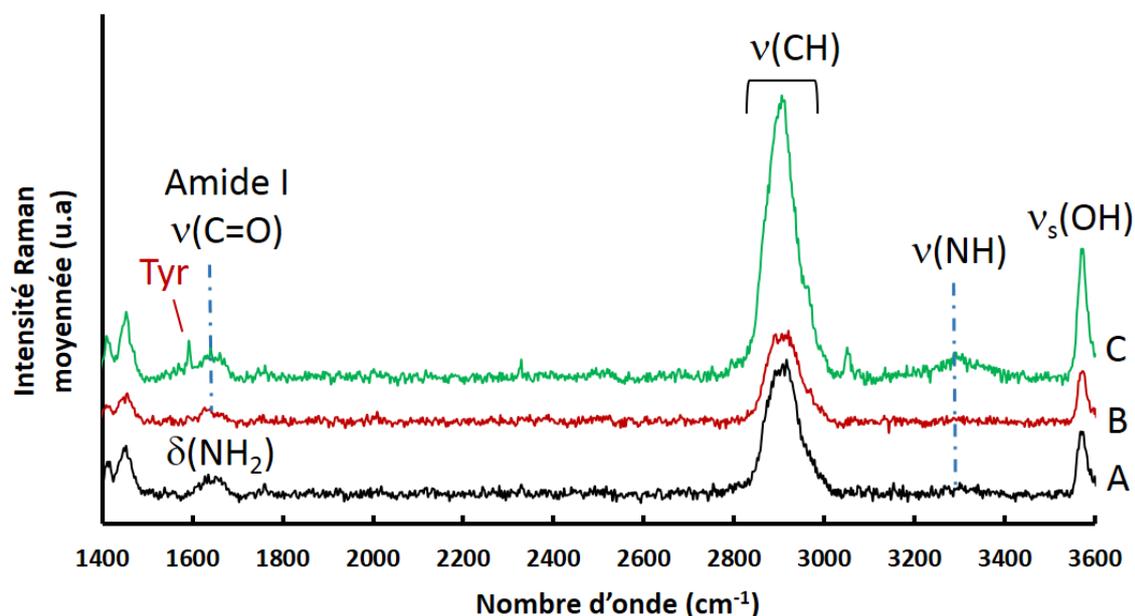


Figure 106 : Spectres ponctuels Raman des céramiques A) CHA-T, B) CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> et C) CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF dans l'intervalle 1400-3600 cm<sup>-1</sup> (532 nm, objectif x100, durée d'acquisition de 5 s).

En résumé, cette étape préliminaire a permis de montrer que les deux céramiques en HA et en CHA fonctionnalisées par le VEGF ne présentent aucun signal des solvants utilisés (toluène et diméthylsulfoxyde (DMSO)) lors des différentes étapes de fonctionnalisation. Le toluène et le DMSO possèdent des signatures Raman observées entre 3100 et 3225 cm<sup>-1</sup> pour les élongations des liaisons =C-H ( $\nu(=\text{C-H})$ ) du toluène et à 1050 cm<sup>-1</sup> pour l'élongation de la liaison S=O ( $\nu(\text{S=O})$ ) du DMSO. Les excès de solvants sont donc bien éliminés par les rinçages effectués lors des différentes étapes du protocole de fonctionnalisation.

Après la troisième étape de fonctionnalisation, la mise en évidence des acides aminés du VEGF demeure difficile. En effet, la plupart des bandes des acides aminés sont confondues avec les bandes très intenses des groupements phosphates, les cycles aromatiques des acides aminés à chaîne latérale aromatique (phénylalanine, tyrosine, tryptophane, histidine) donnent lieu à des bandes Raman entre 1000 et 1033 cm<sup>-1</sup>. D'autres bandes caractéristiques des acides aminés aromatiques peuvent apparaître à 621 et 644 cm<sup>-1</sup> [209], [211]. Néanmoins, les quantités extrêmement faibles attendues rendent leur détection en Raman conventionnel très difficile.

Les spectres Raman réalisés après chaque étape de fonctionnalisation et pour les deux céramiques en HA et en CHA présentent une bande commune autour de  $2900\text{ cm}^{-1}$  qui est associée à la vibration d'élongation de la liaison C-H des composés organiques. Cette bande possède une forte intensité par rapport aux bandes associées à l'élongation de la liaison N-H. De plus, la bande  $\nu(\text{C-H})$  des atomes de carbone aliphatiques présente une section efficace Raman élevée ce qui amène à une signature très claire sur les spectres comme on a pu l'observer précédemment au laboratoire lors des travaux de post-doctorat de David Siniscalco en cours de publication. Enfin, cette zone de fréquence des élongations C-H correspond à une zone de non recouvrement ( $2700\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ ) sur les spectres des céramiques en HA (Figure 101-A) et en CHA (Figure 104-A). Les spectres ponctuels acquis sur des positions aléatoires n'ont pas montré de manière claire une augmentation de l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  au fil des étapes de fonctionnalisation, d'où la nécessité de réaliser des images Raman sur de grandes surfaces et des zones strictement identiques afin de rendre compte de la présence successive de l'APTES, du SM(PEG)<sub>6</sub> et du VEGF.

En conclusion, l'acquisition des images Raman sera effectuée dans l'intervalle  $1300\text{-}3650\text{ cm}^{-1}$ . La reconstruction des images Raman 2D sera réalisée sur l'intensité intégrée de la bande d'élongation de la liaison C-H commune à tous les spectres réalisés après les différentes étapes de fonctionnalisation. Ainsi, les images Raman permettront de comparer l'évolution de la chimie de surface en fonction des étapes de fonctionnalisation.

### **III.2.1.2. Imagerie Raman**

L'imagerie Raman a nécessité la mise en place d'un protocole spécifique afin d'imager strictement la même zone à chaque étape de fonctionnalisation. De plus un contrôle rigoureux des paramètres d'acquisition (temps, puissance) est nécessaire afin de ne pas dégrader les molécules organiques présentes à la surface des substrats céramiques.

#### **III.2.1.2.1. Conditions d'acquisition et traitement des données**

##### **III.2.1.2.1.1. Repérage sur les céramiques**

Dans le but de pouvoir repérer une zone de  $500\text{ }\mu\text{m} \times 500\text{ }\mu\text{m}$  strictement identique après chaque étape de fonctionnalisation et sur une pastille céramique de diamètre 10 mm. Il est nécessaire d'avoir un repère une fois la pastille polie, une de ses extrémités est tranchée afin d'obtenir un coin suffisamment net au microscope optique lequel sera utilisé comme le point origine 0 (voir Figure 108).

Avant la première étape de fonctionnalisation, il faut s'assurer de l'état de surface des céramiques utilisées. La Figure 107 présente les images Raman réalisées à la surfaces des deux céramiques denses et polies en HA et en CHA. Le jeu de données a été normalisé sur

la bande associée à la vibration de l'élongation de la liaison OH de l'apatite et les images ont été reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{O-H})$ . Ce traitement de données sera plus détaillé dans le paragraphe suivant. Les images A et C indiquent respectivement une intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{O-H})$  qui varie entre 0,2 et 0,4 pour HA et entre 0,0100 et 0,0150 pour CHA. Au vu de ces deux échelles, les surfaces des deux céramiques semblent hétérogènes. Cependant, après calibration des échelles sur la même plage de valeurs que celles utilisées pour les céramiques fonctionnalisées qui seront présentées par la suite, soit 0 à 6 et 0 à 25 sur les échelles en couleur des images B et D, les fluctuations observées sur les images A et C deviennent invisibles. La surface des céramiques polies apparaît alors totalement homogène pour une intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{O-H})$  variant de 0 à 6 pour HA et de 0 à 25 pour CHA. Cela contribuera à mettre en évidence de façon assez claire la présence des molécules organiques à la surface des céramiques.

D'un point de vue pratique, après la première étape de fonctionnalisation (silanisation), la céramique est placée sous le microscope en définissant le coin de la pastille comme point origine 0. Les coordonnées x, y sont fixées pour imager une zone d'intérêt à la surface de la céramique (Figure 108). Ces coordonnées x, y seront celles utilisées après étape de fonctionnalisation. La précision du moteur de la table motorisée du microscope couplée au spectromètre a permis ce repositionnement extrêmement précis qui était une étape technique clé pour le suivi ultérieur de la fonctionnalisation.

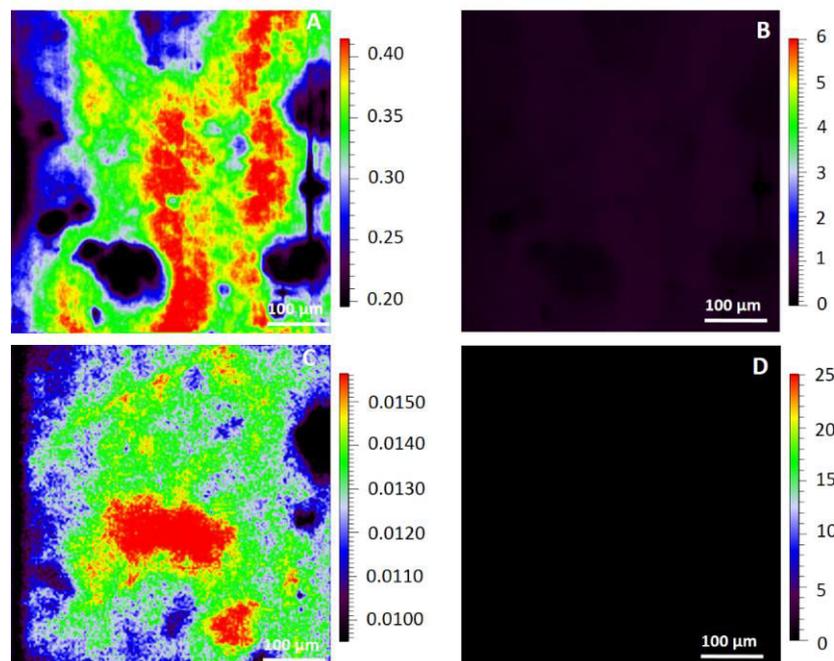


Figure 107 : Images Raman de deux céramiques denses et polies en HA (A, B) et en CHA (C, D), les images Raman sont reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{O-H})$ .

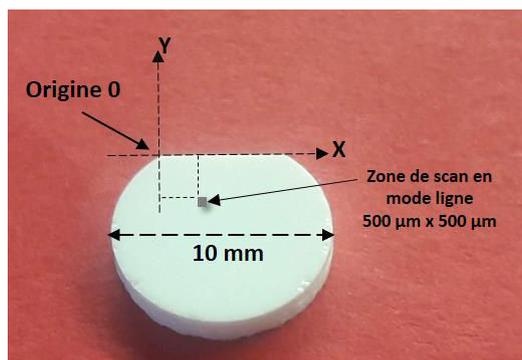


Figure 108 : Schéma illustrant le repérage d'une zone d'intérêt pour le suivi de fonctionnalisation par imagerie Raman.

### III.2.1.2.1.2. Conditions d'acquisition des images Raman

Deux types d'acquisitions ont été réalisés par imagerie Raman : des images sur une grande zone de  $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$  que l'on appellera « images larges » et des images sur une zone dix fois plus petite  $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$  permettant une résolution spatiale beaucoup plus grande qui seront notées : « images HR » pour haute résolution.

#### a) Images Raman

Les images Raman « larges » sont réalisées en mode ligne. Ce dernier est ici utilisé pour générer rapidement une image chimique bidimensionnelle (2D) sur de grandes zones d'un même échantillon. Cela permet également d'avoir un aperçu plus global de la surface de l'échantillon, ici une céramique de 10 mm de diamètre. Le faisceau laser ponctuel est transformé en ligne de manière à abaisser la densité de puissance du laser. Chaque point de la surface de l'échantillon est balayé par la totalité de la ligne laser. Ce suréchantillonnement permet même avec des temps courts et des densités d'énergie faibles d'obtenir un signal de qualité suffisante à la reconstruction d'image. Ce mode permet dans la majorité des cas d'éviter la détérioration de l'échantillon sous l'effet de l'échauffement laser. Les données Raman ont été collectées à une longueur d'onde de 532 nm avec un objectif x20 (ouverture numérique O.N = 0,4). La lumière diffusée est dispersée par un réseau holographique de 1200 traits/mm. La puissance sur échantillon est d'environ 40 mW répartie sur une ligne de surface  $80\ \mu\text{m}^2$  (soit  $0,5\ \text{mW}/\mu\text{m}^2$ ). La surface scannée correspond à une zone de taille  $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$  avec un pas de  $3,2\ \mu\text{m}$ . Le temps d'acquisition par image Raman est de 30 min, le nombre de spectres obtenu est de 24649.

Une étape clé du traitement du jeu de données est le débruitage (*noise filter*), cela consiste en une analyse par composantes principales (PCA pour *principal component analysis*). En effet, l'analyse des données brutes génère des images avec un rapport signal/bruit élevé. L'analyse en composantes principales est un outil d'analyse multivariée qui est appliqué à l'ensemble des données et qui consiste à transformer des variables corrélées en variables décorréées

les unes des autres (composantes principales). Les composantes contenant les informations Raman réelles sont conservées et celles contenant du bruit sont supprimées.

Etant donné que l'on utilise un objectif x20, d'ouverture numérique égale à 0,4 à une longueur d'onde de 532 nm, la résolution axiale théorique (profondeur de champ) calculée est aux environs de 4,7  $\mu\text{m}$ . La réponse Raman contiendra la réponse des molécules de surface mais il y aura également une forte contribution de la céramique comme illustré sur les spectres de la Figure 109. La bande d'élongation des modes OH de l'hydroxyapatite située vers 3570  $\text{cm}^{-1}$  est extrêmement intense et toujours plus intense que les autres modes (élongation C-H et N-H). Ce mode sera donc utilisé pour normaliser les données dans le cas des images « larges ». Après normalisation, la reconstruction de l'image 2D est effectuée sur l'intensité intégrée de la bande située entre 2814 et 3006  $\text{cm}^{-1}$  et associée à la vibration d'élongation de la liaison C-H de la partie organique présente en surface.

La Figure 109 présente un exemple d'une image Raman correspondant à une céramique en HA fonctionnalisée par l'APTES. Les contrastes de couleurs sont associés aux variations de l'intensité intégrée de cette bande en allant des couleurs froides aux couleurs chaudes. Les zones de couleur bleue représentent une intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  très faible (exemple du spectre bleu), ce qui correspond à une faible teneur en APTES présente en surface. Les zones de couleur verte correspondent à des zones où l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  est moyenne (exemple du spectre vert). Enfin, les zones de couleur rouge sont associées à une intensité intégrée plus élevée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  (exemple du spectre rouge) comparée à celle des autres zones. Ainsi plus on se dirige vers les zones de couleurs chaudes, plus l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  augmente. L'image Raman met donc en évidence la présence de l'APTES quasiment sur toute la surface scannée mais dans des proportions différentes.

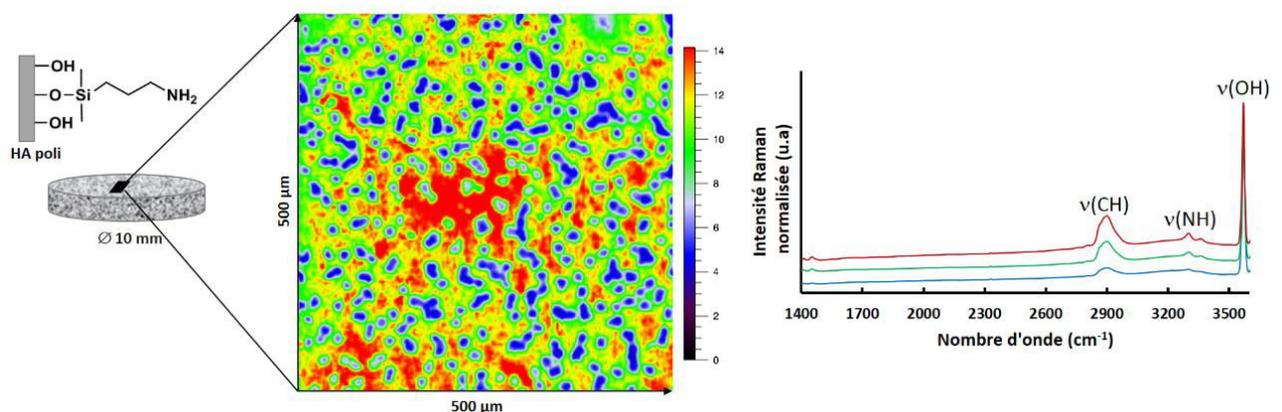


Figure 109 : Image Raman de l'étape de silanisation (HA-T) reconstruite sur l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  et accompagnée de spectres ponctuels extraits illustrant respectivement les zones de couleurs bleue, verte et rouge.

## b) Images HR

Des images Raman ont également été réalisées dans une configuration différente en mode haute résolution confocal. Le laser est dans ce cas en mode point (Aire  $\sim 0,8 \mu\text{m}^2$ ), donc la densité de puissance du laser est beaucoup plus élevée ( $\sim 5 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$ ) que celle en mode ligne ( $\sim 0,5 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$ ). Les données Raman ont été collectées à une longueur d'onde de 532 nm avec un objectif x100 (O.N = 0,85). La lumière diffusée est dispersée par un réseau holographique de 1200 traits/mm. La puissance utilisée correspond à une puissance sur échantillon d'environ 4 mW. La zone scannée correspond à une zone d'intérêt repérée sur l'image Raman « large » (Figure 110-A) avec une taille de  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  et un pas très fin de  $0,5 \mu\text{m}$ . Le temps d'acquisition par image Raman HR est de 6 h, le nombre de spectres obtenu est de 10201.

Il est important de noter dans ce cas que la résolution axiale change drastiquement puisqu'avec un objectif x100 (O.N = 0,85), la résolution axiale est d'environ  $1 \mu\text{m}$ . Dans ce cas, on trouve des zones où la réponse de la céramique en HA (la bande associée à la vibration de l'élongation de la liaison O-H,  $\nu(\text{OH})$ ) est minoritaire par rapport à la bande d'intérêt associée à la vibration de l'élongation de la liaison C-H ( $\nu(\text{C-H})$ ) (Figure 110-spectre de couleur jaune). Le logiciel de traitement du jeu de données ne nous permettant de normaliser les données que sur la bande d'intensité maximale, nous n'avons pas pu garder le même mode de normalisation que pour les images en mode ligne. Pour s'affranchir de cela, nous avons choisi une normalisation sur l'intensité intégrée totale des spectres. Après normalisation, la reconstruction de l'image HR est réalisée comme pour les images « larges » sur l'intensité intégrée de la bande située entre  $2814$  et  $3006 \text{ cm}^{-1}$  et associée à la vibration d'élongation de la liaison C-H de la partie organique présente en surface.

L'image HR met également en évidence des contrastes de couleurs qui sont associés aux variations d'intensité de la bande  $\nu(\text{C-H})$  en allant des couleurs froides aux couleurs chaudes. Les couleurs froides (bleu et vert) correspondent aux zones où l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  est faible à moyenne avec une réponse de la céramique en HA ( $\nu(\text{OH})$ ) très intense. Il s'agit de zones où peu d'APTES est présent. Plus on se dirige vers les couleurs chaudes (jaune), plus l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  augmente et plus la réponse de la céramique HA ( $\nu(\text{OH})$ ) devient minoritaire (spectre jaune).

L'intérêt des images HR réside dans cette réponse minoritaire de la céramique. En effet cela va permettre d'exacerber la réponse des molécules organiques présentes en surface. Néanmoins les temps d'acquisition longs et la densité d'énergie élevée n'en font pas notre choix d'analyse prioritaire.

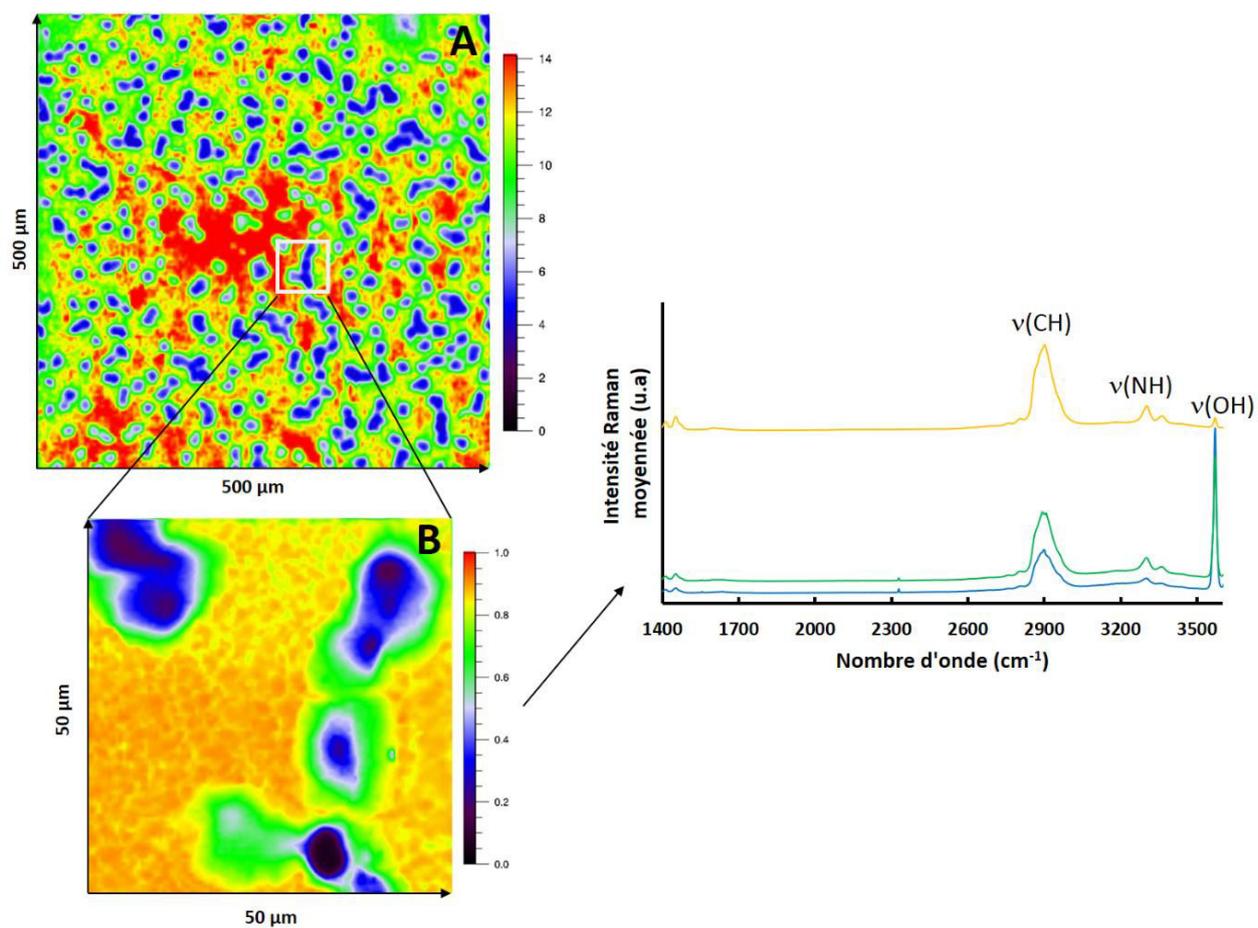


Figure 110 : Images Raman de l'étape de silanisation (HA-T) avec A) image Raman « large » et B) image HR, reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$ . Les spectres ponctuels sont extraits de l'image HR et correspondent respectivement aux zones de couleurs bleue, verte et jaune.

### III.2.1.2.2. Suivi des étapes de fonctionnalisation par imagerie Raman

#### III.2.1.2.2.1. Apport de l'imagerie Raman à l'amélioration du protocole de fonctionnalisation

Le protocole initial utilisé pour l'immobilisation d'une protéine BMP-2 au laboratoire est illustré en Figure 111. Le mécanisme réactionnel général ainsi que le protocole expérimental de la fonctionnalisation de surface de céramiques en hydroxyapatite silicatée par la protéine BMP-2 sont basés sur les travaux initiés à l'IRCER (équipe biocéramiques) par Z. Hjezi et E. Poli [69], [171]. Les étapes de l'addition du SM(PEG)<sub>6</sub> et de la protéine ont été réalisées en milieu aqueux (tampon phosphate salin PBS).

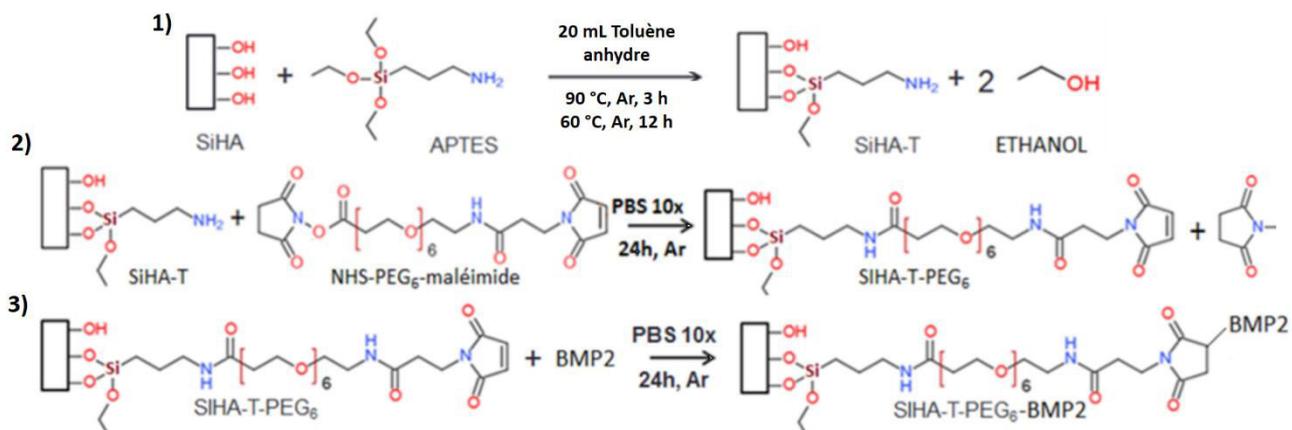


Figure 111 : Schéma réactionnel général de la fonctionnalisation de surface d'une céramique en SiHA par la BMP-2, 1) silanisation, 2) addition du SM(PEG)<sub>6</sub>, et 3) addition de la BMP-2.

Initialement, la fonctionnalisation de la surface des céramiques phosphocalciques en HA et en CHA par le VEGF dans ces travaux de thèse (Figure 100) a été effectuée avec le même protocole énoncé ci-dessus. Mais deux modifications majeures ont été apportées à la lumière des études en imagerie Raman.

L'addition du SM(PEG)<sub>6</sub> a été faite dans du diméthylsulfoxyde anhydre (DMSO) et non du PBS afin de s'affranchir des conditions de pH. Le temps de réaction concernant l'addition du SM(PEG)<sub>6</sub> était fixé à 24 h, ce qui représente un temps assez long comparé aux temps de réactions trouvés en bibliographie. En effet, les travaux de Durrieu *et al.* proposent une fonctionnalisation de surface après silanisation avec un *spacer* SMP (maléimido propinate), qui dispose également d'un groupement maléimide, en 2h [166], [164].

Afin d'évaluer l'impact du temps de réaction utilisé dans le protocole expérimental illustré en Figure 111, des images Raman ont été réalisées sur des céramiques HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> avec deux temps de synthèses différents : 24 h et 2 h. La Figure 112 regroupe les images Raman de ces deux céramiques en HA fonctionnalisées par l'APTES (images A et C) puis fonctionnalisées par le SM(PEG)<sub>6</sub> dans du DMSO pendant 24 h et 2 h (images B et D). Pour pouvoir comparer les images entre elles, celles-ci sont calibrées en intensité comme le montre l'échelle de couleur de la Figure 112. Les images A et C qui correspondent toutes les deux à deux céramiques HA silanisées (HA-T) différentes sont similaires avec des zones de couleur très sombre témoignant d'une faible teneur en APTES et des zones de couleur verte mettant en évidence la présence de l'APTES à la surface des céramiques. Il est à noter que la silanisation n'est pas homogène à cette échelle. Une comparaison des images deux à deux, c'est-à-dire A avec B et C avec D permet de constater, dans un premier temps, que le repositionnement de l'échantillon est parfait puisque la "morphologie" de l'échantillon A est retrouvée sur l'échantillon B et celle de l'échantillon C sur l'échantillon D. Dans chaque cas

après addition du SM(PEG)<sub>6</sub>, l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  augmente comme le traduit le contraste de couleur rouge qui apparaît sur les images. On remarque également que le SM(PEG)<sub>6</sub> ne comble pas les zones sombres mais se positionne sur les zones vertes des surfaces silanisées ce qui va dans le sens d'une réaction préférentielle entre la fonction  $-\text{NH}_2$  de l'APTES et la fonction NHS ester du SM(PEG)<sub>6</sub>. Finalement la comparaison des images B et D met en avant qu'un temps de réaction de 2 h entre l'APTES et le SM(PEG)<sub>6</sub> semble largement suffisant, ce temps de réaction a donc été alors retenu.

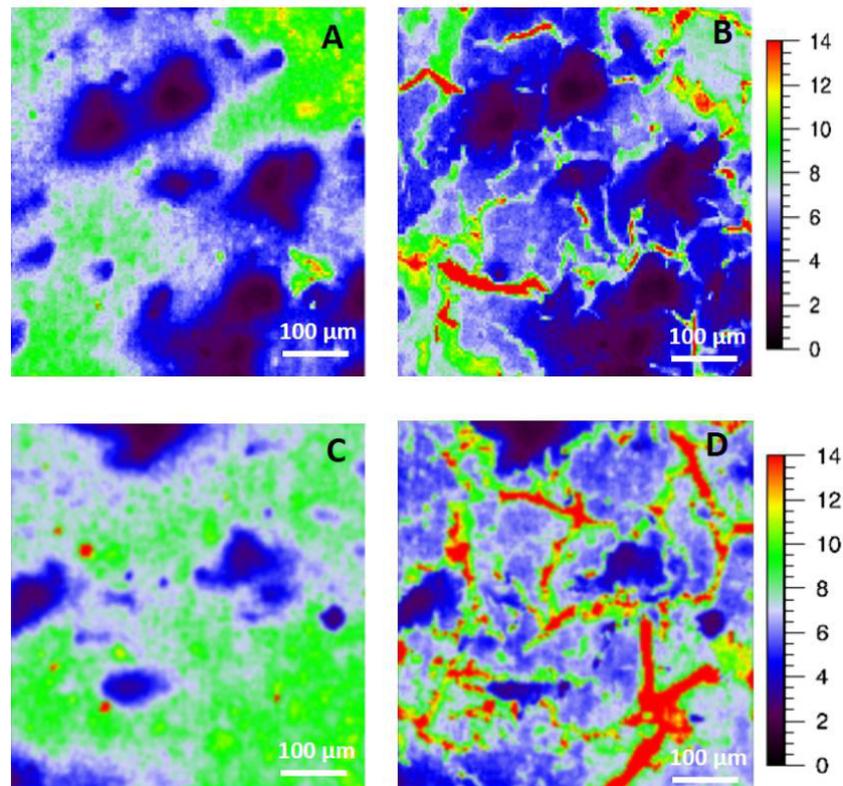


Figure 112 : Images Raman de deux céramiques en HA fonctionnalisées à l'APTES (A, C) puis fonctionnalisées par le SM(PEG)<sub>6</sub> pour un temps de synthèse de 24 h (B) et 2 h (D), les images Raman sont reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$ .

La dernière étape du protocole de fonctionnalisation consiste à immobiliser le VEGF à la surface de la céramique préalablement fonctionnalisée par l'APTES puis le SM(PEG)<sub>6</sub>. Classiquement, cette immobilisation de protéine se fait dans un milieu PBS 10X. Le PBS 10X est une solution tampon phosphate saline et composée d'un mélange de réactifs en concentrations différentes ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) et 10 fois plus concentrée que le PBS 1X. Il s'agit d'une solution couramment utilisée en biochimie, le chlorure de sodium est utilisé pour la salinité et les phosphates pour tamponner la solution. Afin de voir l'influence du milieu sur l'immobilisation de la protéine, l'échantillon HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> (2 h) a été immergé 2 h dans du PBS 10X sous argon et sans protéine. Le résultat est présenté en Figure 113. L'image Raman de la surface de l'échantillon HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-PBS(10X) (image B) est noire ce qui

traduit l'absence de molécules organiques (APTES et SM(PEG)<sub>6</sub>), alors que l'image Raman de la surface de l'échantillon HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> avant immersion (image A) montre clairement leur présence. Le spectre Raman extrait de l'image B de l'échantillon HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-PBS(10X) (spectre B) montre que seule la vibration de la bande associée à l'élongation de la liaison O-H de la céramique en HA est détectée en surface. Aucune vibration de la bande associée à l'élongation de la liaison C-H n'est détectée à la surface de l'échantillon après immersion dans du PBS 10X comparée à la surface de l'échantillon HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> (spectre A). La surface de la céramique a donc totalement été lavée en présence du PBS 10X.

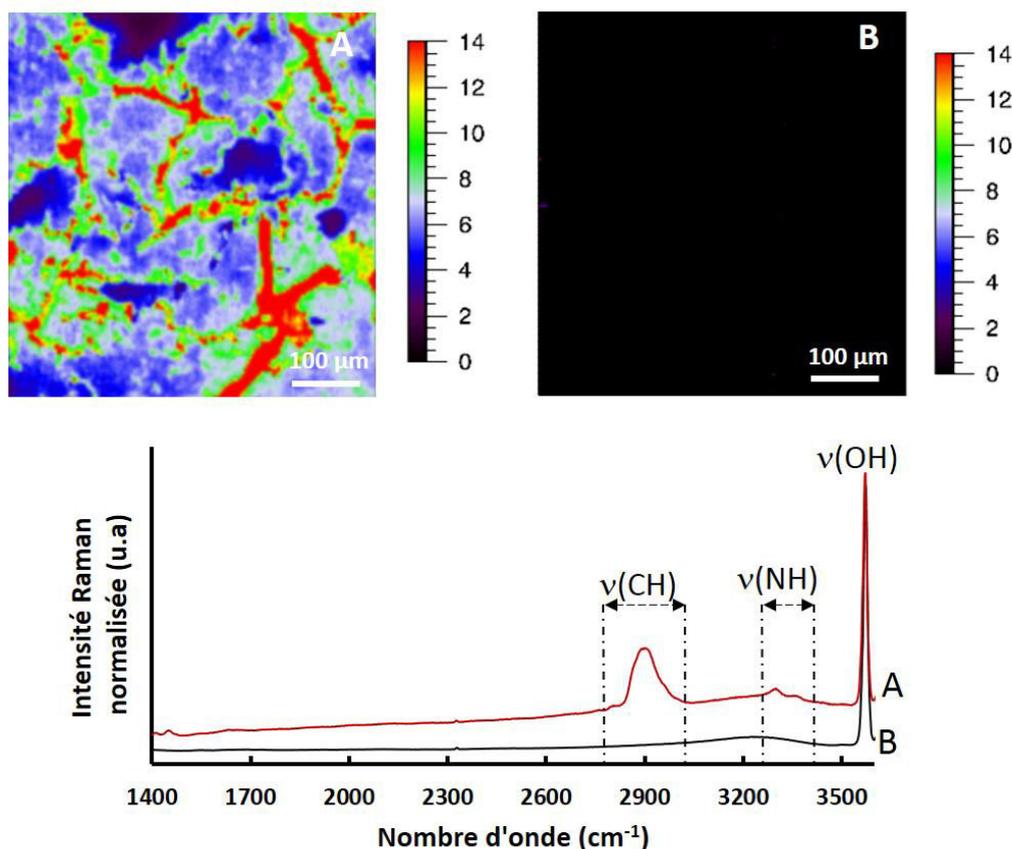


Figure 113 : Images Raman (A) d'une céramique fonctionnalisée avec de l'APTES puis du SM(PEG)<sub>6</sub> HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>(2h), puis (B) immergée 2h dans du PBS 10X, l'échantillon est noté HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>(2h)-PBS10X(2h). Les images Raman A et B sont reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande  $\nu$ (C-H) et accompagnées de leurs spectres extraits A et B.

L'influence d'un milieu comme le PBS a été étudiée par plusieurs auteurs. Il a été mis en évidence une précipitation sous forme globulaire d'agrégats contenant des ions calcium et phosphate après immersion d'un ciment de silicate de calcium une journée dans du PBS 1X [248]. Han *et al.* ont évalué des matériaux endodontiques sur leur capacité à libérer des ions calcium Ca<sup>2+</sup> et à produire des précipités de type apatite après immersion pendant 14 jours dans une solution saline PBS 1X. Le rapport Ca/P était plus élevé dans les précipités formés par rapport aux autres matériaux qui n'ont pas été immergés dans le PBS [249]. Les

mêmes observations ont été effectuées par Ni *et al.* sur de la nacre, matériau composite naturel composé principalement de carbonate de calcium, sous forme de cristaux d'aragonite, et de matières organiques. La surface de la nacre a été transformée en hydroxyapatite après immersion dans du PBS [250]. Le PBS semble donc déclencher un phénomène de dissolution-précipitation à la surface de la céramique en HA ce qui explique l'aspect de l'image Raman (B) obtenue à la Figure 113. Il y a donc élimination du recouvrement de l'APTES et du SM(PEG)<sub>6</sub> présents au préalable en surface.

Afin de voir si la concentration du PBS avait une influence sur le phénomène de dissolution-précipitation observé à la surface de la céramique en HA, nous avons effectué un essai avec du PBS 1X qui est dix fois moins concentré que le PBS 10X. Une céramique HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> a été immergée 2 h dans une solution de PBS 1X puis rincée à l'eau afin d'éliminer les cristaux de sels formés en surface. L'image Raman obtenue avait le même aspect que celle présentée en Figure 113-B. La surface a donc été totalement lavée suite aux phénomènes de dissolution-précipitation qui a lieu en surface de la céramique. La solution du PBS s'avère alors être un milieu inadéquat pour ce type de fonctionnalisation sur ce type de matériaux.

Certains auteurs ont utilisé des solutions anhydres comme le diméthylsulfoxyde (DMSO) [251] ou le N, N-diméthylformamide [164] pour l'immobilisation des protéines. Notre choix s'est porté alors sur le DMSO pour l'immobilisation de la protéine du VEGF.

Les caractérisations de surface par imagerie Raman ont permis de modifier le protocole de fonctionnalisation notamment l'étape de l'addition du SM(PEG)<sub>6</sub> où un temps de synthèse de 2 h s'avère être suffisant par rapport au temps de 24 h utilisé dans l'ancien protocole. La troisième étape de fonctionnalisation (immobilisation de la protéine) a été également améliorée, l'imagerie Raman ayant mis en évidence des problèmes de précipitation-dissolution liés à l'utilisation du PBS comme solvant. Cela justifie le choix du milieu anhydre pour la fonctionnalisation de la surface de la céramique en HA par le VEGF. Le protocole expérimental final adopté lors de ces travaux de thèse est donc celui présenté en Figure 100.

#### **III.2.1.2.2.2. Images Raman des céramiques en hydroxyapatite**

La fonctionnalisation de la surface de la céramique en HA par le VEGF dépend de la silanisation, étape clé pour l'immobilisation du VEGF, car elle permet d'avoir des fonctions amines (-NH<sub>2</sub>) en surface qui fixeront le SM(PEG)<sub>6</sub> lors de la deuxième étape de fonctionnalisation. Ce dernier permettra à son tour d'immobiliser le VEGF après réaction avec sa fonction maleimide. La Figure 114 présente trois céramiques en HA différentes fonctionnalisées par de l'APTES (HA-T). L'image A correspond à une silanisation réalisée avec une seule pastille en HA dans le ballon, l'image B correspond à une pastille fonctionnalisée

par l'APTES en présence de deux autres pastilles dans le ballon et l'image C correspond à une silanisation sur une seule pastille en HA mais avec des réactifs neufs. L'image B est représentative des résultats obtenus dans cette configuration expérimentale.

Les images A et B qui sont calibrées à la même intensité (échelle en couleur Figure 114) présentent des "morphologies" différentes. La synthèse effectuée sur une seule céramique dans le ballon 4 cols indique une silanisation plus homogène (image A) par rapport à celle réalisée sur trois céramiques à la fois. Cette inhomogénéité observée sur l'image B peut être expliquée par des effets de bord dus au positionnement des trois céramiques dans le ballon 4 cols à fond rond. La surface de la céramique n'est probablement pas en contact de manière homogène avec les réactifs ce qui ne permet pas d'obtenir une fixation homogène de l'APTES. Le choix de mettre trois céramiques constituait un gain de temps étant donné que la silanisation dure 2 jours. À la vue de cette inhomogénéité, la silanisation a été effectuée sur une seule céramique (image C) afin de retrouver la même "morphologie" que celle observée sur l'image A. Cependant, l'image C indique une intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  qui est deux fois moins élevée que celles observées sur les images A et B (échelle d'intensité 0-6 contre 0-14). Les zones de couleur verte et rouge traduisent bien la présence de l'APTES en surface mais en faible teneur. La forte intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  ainsi que l'aspect de la silanisation à la surface des céramiques correspondant aux images A et B n'ont pas été reproduits avec l'utilisation de réactifs neufs. *A contrario*, l'aspect de la silanisation indiqué à l'image C a été reproduit plusieurs fois. C'est donc ce type de « morphologie » qui est considérée par la suite comme « morphologie » reproductible et de référence pour la fonctionnalisation par le SM(PEG)<sub>6</sub> et le VEGF.

Deux points sont donc à retenir suite à ces constatations. Premièrement, la silanisation doit être effectuée pastille par pastille avec le dispositif expérimental utilisé. Deuxièmement, il est important d'utiliser des réactifs neufs afin de limiter le vieillissement de l'APTES et sa polymérisation *in situ*.

La forte teneur en APTES (image A) est très certainement due à une polymérisation (homocondensation) *in situ* du réactif, lequel vient ensuite se condenser à la surface de la céramique.

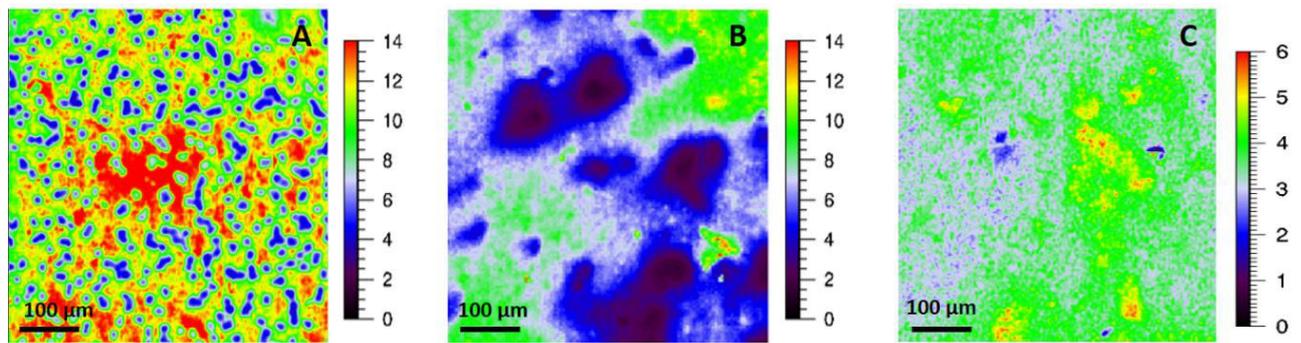


Figure 114 : Images Raman de la surface de trois céramiques en HA différentes, fonctionnalisées par l'APTES. La silanisation a été effectuée sur A) une pastille, B) trois pastilles et C) une pastille (réactifs neufs). Les images Raman sont reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$ .

Le suivi de la fonctionnalisation de la céramique en HA par la protéine du VEGF a été effectué en réalisant des images Raman d'une même zone scannée en mode ligne après chaque étape de fonctionnalisation. La Figure 115 regroupe les images Raman des trois étapes de fonctionnalisation : (A) HA-T, (B) HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> et (C) HA-T-PEG-VEGF. Afin de pouvoir mettre en évidence l'évolution de la fonctionnalisation au fil des étapes et comparer une à une les images, celles-ci sont calibrées en intensité comme le montre l'échelle de couleur de la Figure 115.

L'image A correspondant à la céramique HA silanisée présente des zones de couleur bleue qui témoignent d'une faible quantité en APTES et des zones de couleurs verte et rouge qui correspondent respectivement à une teneur moyenne et élevée en APTES. L'image Raman indique la présence d'APTES quasiment sur la totalité de la surface scannée avec quelques agglomérats. Après addition du SM(PEG)<sub>6</sub> (image B), les zones de couleur rouge, repérées précédemment sur l'image A, deviennent plus intenses traduisant ainsi une augmentation de l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$ . Le SM(PEG)<sub>6</sub> s'est fixé sur les zones de forte teneur en APTES. Quant aux zones de couleur verte et bleue, elles n'ont pas, ou peu, évolué en intensité après l'addition du SM(PEG)<sub>6</sub>. L'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  n'a pas augmenté. En comparant les images A et B, on peut conclure dans un premier temps sur une fixation préférentielle du SM(PEG)<sub>6</sub> sur les zones de forte teneur en APTES. L'image Raman associée à l'immobilisation du VEGF (image C) indique une intensité encore plus élevée des zones de couleur rouge où le SM(PEG)<sub>6</sub> et l'APTES ont été majoritairement fixés (images B et A). Cela confirme alors l'augmentation de l'intensité intégrée de la bande associée à la vibration de la liaison C-H suite à l'immobilisation du VEGF sur le SM(PEG)<sub>6</sub>. Les contrastes de couleurs vert et bleu demeurent stables même après addition du VEGF. Cette évolution d'intensité observée sur l'image C amène à conclure à une réaction privilégiée entre le groupement thiol du VEGF et le maléimide du SM(PEG)<sub>6</sub> comme escompté et à la quasi absence d'adsorption du VEGF sur les zones sans SM(PEG)<sub>6</sub>.

Ces résultats ont mis en évidence une évolution des images Raman en fonction des étapes de fonctionnalisation grâce au repositionnement de l'échantillon qui est identique à chaque étape. En effet, d'une étape à une autre, les zones représentant une forte intensité de la bande  $\nu(\text{CH})$  deviennent de plus en plus intenses. Il semble donc bien que la fonctionnalisation soit sélective : le VEGF est immobilisé sur le  $\text{SM}(\text{PEG})_6$  et ce dernier fixé sur l'APTES puisque ce sont bien les zones où l'APTES était majoritairement présent qui ont permis l'addition du  $\text{SM}(\text{PEG})_6$  puis l'immobilisation du VEGF. Les images Raman ont ainsi confirmé la fonctionnalisation effective de la surface de la céramique en HA par le VEGF.

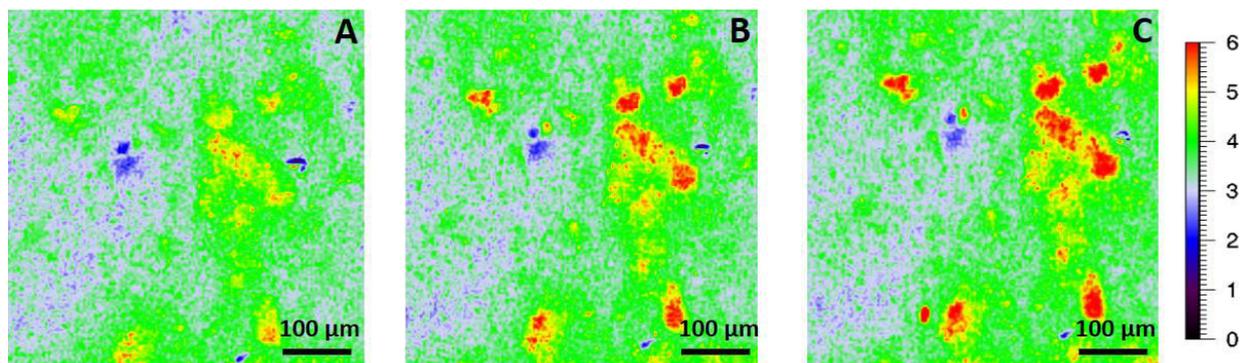


Figure 115 : Images Raman des trois étapes de fonctionnalisation de la surface de la céramique en HA par le VEGF avec A) HA-T, B) HA-T- $\text{SM}(\text{PEG})_6$  et C) HA-T- $\text{SM}(\text{PEG})_6$ -VEGF. Les images Raman sont reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$ .

### III.2.1.2.2.3. Images Raman des céramiques en hydroxyapatite carbonatée

Le même protocole d'immobilisation du VEGF a été appliqué pour la céramique en hydroxyapatite carbonatée (CHA). Le but ici est d'évaluer l'influence d'une céramique autre que l'hydroxyapatite (HA) sur la fonctionnalisation par le VEGF.

Les images Raman ont été réalisées dans les mêmes conditions d'acquisition et de traitement que celles effectuées à la surface de la céramique en HA en scannant toujours la même zone à chaque étape de fonctionnalisation.

Avant d'aborder le suivi de fonctionnalisation par le VEGF de la céramique en CHA, il est important d'évaluer l'influence de la composition chimique de la céramique sur la silanisation puisqu'il s'agit de l'étape primordiale à l'immobilisation ultérieure du VEGF. La Figure 116 présente deux images Raman de la surface de deux céramiques HA (image A) et CHA (image B) fonctionnalisées par l'APTES. Les contrastes de couleur allant du bleu au rouge témoignent d'une augmentation de l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  : les zones rouges sont toujours associées à une forte intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  et les zones sombres à la présence d'une faible teneur en APTES. La distribution de l'APTES semble être plus homogène à la surface de la céramique en HA, contrairement à la céramique en CHA, où sa répartition semble

inhomogène. En effet, l'APTES recouvre partiellement la surface de la céramique en CHA et forme des amas très intenses. L'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  est quatre fois plus élevée que celle obtenue à la surface de la céramique en HA comme le montre les échelles de couleur de la Figure 116. Cette forte intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  sur les amas indique la présence d'une quantité plus élevée d'APTES par rapport à celle présente à la surface de la céramique en HA. La répartition de l'APTES sous forme d'amas à la surface de la céramique en CHA pourrait être expliquée par une compétition entre l'immobilisation de l'APTES par liaison covalente et sa réaction de polycondensation, réaction normalement très limitée en milieu anhydre. Cette hypothèse sera abordée plus en détail dans la discussion générale des résultats concernant le suivi de l'évolution de la fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques.

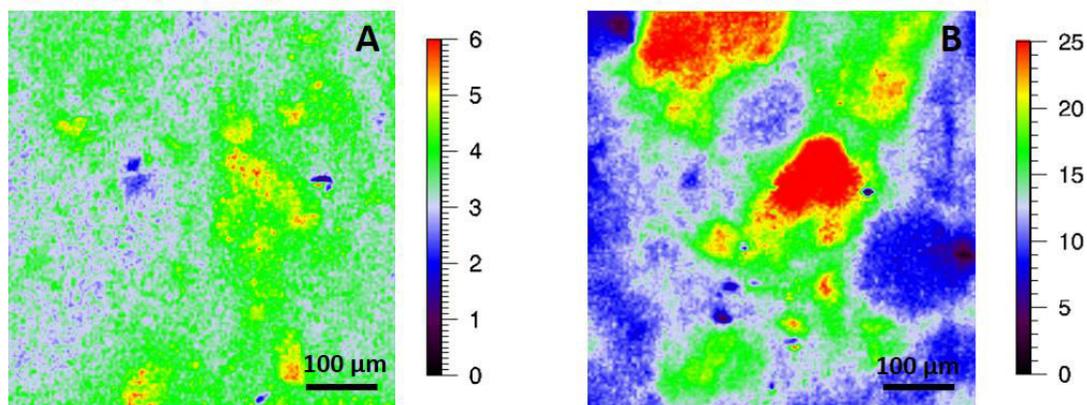


Figure 116 : Images Raman de la surface des céramiques en HA et en CHA fonctionnalisées par l'APTES avec A) HA-T et B) CHA-T. Les images sont reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$ .

La Figure 117 regroupe les trois étapes de fonctionnalisation de la surface de la céramique en CHA : CHA-T (image A), CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> (image B) et CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF (image C). Les images Raman sont calibrées en intensité (échelle de couleur) afin de pouvoir les comparer entre elles et ainsi suivre l'évolution de la fonctionnalisation au fil des étapes.

Comme expliqué précédemment, l'image A (CHA-T) présente des zones de couleur bleue indiquant une faible quantité d'APTES présente en surface et des amas de couleur rouge témoignant d'une forte présence de l'APTES à la surface de la céramique. A l'addition du SM(PEG)<sub>6</sub>, l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  augmente avec les amas de couleur rouge qui deviennent plus intenses ce qui traduit le positionnement du SM(PEG)<sub>6</sub> sur l'APTES. Puis après addition du VEGF, l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  augmente encore plus comme l'indique le contraste de couleur rouge sur l'image C. Le VEGF s'est donc fixé sur le SM(PEG)<sub>6</sub>. Enfin, les contrastes de couleur bleue et verte traduisant des zones d'une faible teneur en APTES n'évoluent pas à l'addition du SM(PEG)<sub>6</sub> et du VEGF. L'évolution des images Raman,

comme le montre la Figure 117, met en évidence une fonctionnalisation qui semble être préférentielle à la surface de la céramique en CHA. En effet, la protéine du VEGF s'est immobilisée sur le SM(PEG)<sub>6</sub> qui s'est fixé à son tour sur les zones où l'APTES était présent en forte teneur. Ces résultats confirment alors la fonctionnalisation de la surface de la céramique en CHA par le VEGF.

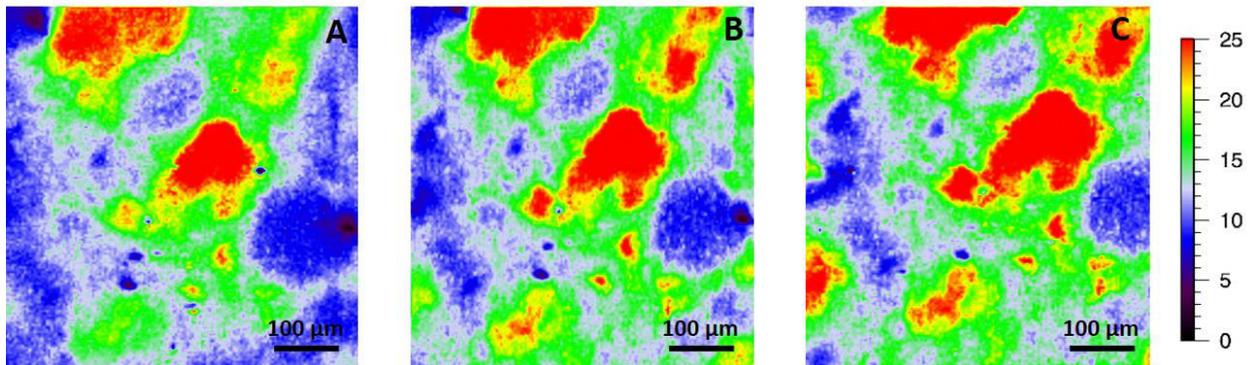


Figure 117 : Images Raman des trois étapes de fonctionnalisation de la surface de la céramique en CHA par le VEGF avec A) CHA-T, B) CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> et C) CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF. Les images sont reconstruites sur l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$ .

#### III.2.1.2.2.4. Discussion

Les images Raman de la surface des deux céramiques en HA et en CHA fonctionnalisées par le VEGF et présentées sur les Figure 115, Figure 117 ont mis en évidence une évolution du contraste de couleur rouge qui traduit une augmentation de l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$ . D'une manière semi-quantitative et afin de traduire cette évolution de contraste de couleur, les intensités intégrées maximales de la bande  $\nu(\text{CH})$  obtenues sur les images Raman ont été tracées en fonction de chaque étape de fonctionnalisation (Figure 118). En comparant, dans un premier temps, l'évolution des intensités intégrées maximales de la bande  $\nu(\text{CH})$  entre HA-T et CHA-T, on retrouve la tendance observée sur la Figure 116, à savoir la fonctionnalisation par l'APTES est beaucoup plus importante dans le cas de la céramique en CHA. En effet, l'intensité intégrée maximale de la bande  $\nu(\text{CH})$  est de 23,7 à la surface de la céramique en CHA, ce qui est quatre fois plus élevée que celle obtenue à la surface de la céramique en HA (4,54). La silanisation des deux céramiques est différente.

Les intensités intégrées maximales de la bande  $\nu(\text{CH})$  à la surface de la CHA continuent à augmenter de manière significative après l'addition du SM(PEG)<sub>6</sub> et du VEGF et sont respectivement de 26,1 et 28,6. Cela confirme l'évolution du contraste de couleur des amas observés sur la Figure 117 attribuée à l'augmentation de la teneur en molécules organiques présentes à la surface de la céramique CHA.

L'évolution de l'intensité des agglomérats observés à la surface de la céramique en HA (Figure 115) traduit une augmentation de l'intensité intégrée maximale de la bande  $\nu(\text{CH})$  beaucoup moins importante par rapport à celle observée pour la CHA. Les intensités intégrées maximales de la bande  $\nu(\text{CH})$  après l'addition de l'APTES, du  $\text{SM}(\text{PEG})_6$  et du VEGF sont respectivement de 4,54; 4,91 et 5,12. La quantité de VEGF immobilisée est directement liée à la quantité de silane. Dans le cas de la céramique en HA, la quantité de silane est plus faible que pour la céramique en CHA. La quantité de  $\text{SM}(\text{PEG})_6$  est donc logiquement relativement faible et celle de VEGF également.

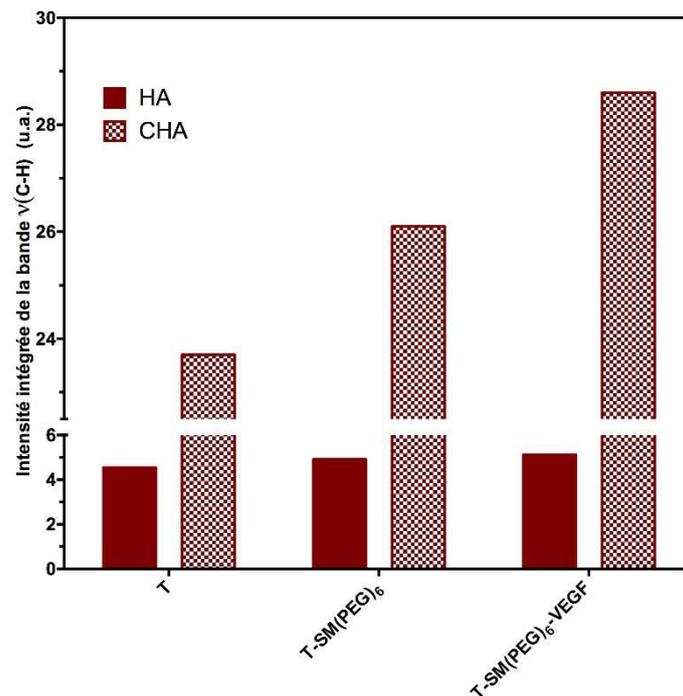


Figure 118 : Histogramme représentant l'évolution de l'intensité intégrée maximale de la bande  $\nu(\text{CH})$  à la surface des céramiques en HA et en CHA en fonction des différentes étapes de fonctionnalisation.

L'augmentation de l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  sur les céramiques en HA (Figure 118) semble réelle mais moins importante. Afin d'exacerber le signal des différentes molécules organiques présentes en surface, les images HR réalisées après chaque étape de fonctionnalisation ont été utilisées afin d'observer plus finement l'évolution de l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$ . L'intérêt des images HR réside dans la réponse très faible de la céramique (résolution axiale d'environ  $1 \mu\text{m}$ ) qui permet de mieux se rendre compte de la teneur en molécules organiques avec l'augmentation de l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$ . La normalisation du jeu de données a été réalisée sur l'intensité intégrée totale des spectres. La Figure 119 présente l'évolution de l'intensité intégrée maximale de la bande  $\nu(\text{CH})$  à la surface de la céramique en HA en fonction des différentes étapes de fonctionnalisation.

L'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  augmente au fil des étapes de fonctionnalisation et varie entre 0,42 et 0,81. L'augmentation de l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  à l'étape de l'addition du  $\text{SM}(\text{PEG})_6$  traduit la fixation de ce dernier sur l'APTES. L'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  continue à augmenter à la dernière étape de fonctionnalisation indiquant l'immobilisation du VEGF sur le  $\text{SM}(\text{PEG})_6$ . De manière générale, l'augmentation de l'intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  confirme alors la succession des différentes étapes de fonctionnalisation et donc l'immobilisation du VEGF en surface.

Ces résultats confirment le suivi de fonctionnalisation observé sur les images Raman et donc l'immobilisation du VEGF à la surface des deux céramiques.

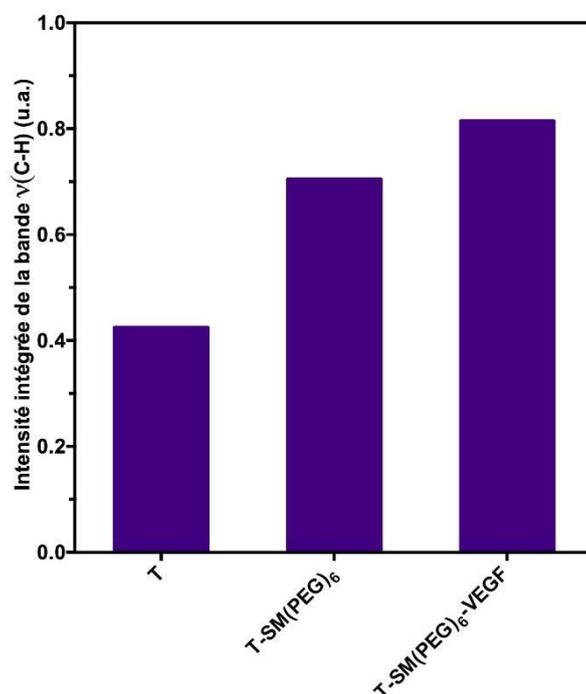


Figure 119 : Histogramme représentant l'évolution de l'intensité intégrée maximale de la bande  $\nu(\text{CH})$  extraite de l'image HR de la surface de la céramique en HA en fonction des différentes étapes de fonctionnalisation.

### III.2.2. Caractérisation des céramiques fonctionnalisées par spectroscopie de photoélectrons X

Des mesures par spectroscopie de photoélectrons X (XPS pour *X-Ray photoelectron spectrometry*) ont été effectuées sur les céramiques en HA et en CHA fonctionnalisées par le VEGF (Figure 100). La chimie de surface après chaque étape de fonctionnalisation a été analysée en réalisant des spectres larges, puis une étude de décomposition (acquisition haute résolution) des éléments chimiques détectés à la surface des céramiques. Les pics caractéristiques des éléments calcium (Ca 2s, Ca 2p, Ca 3s et Ca 3p), phosphore (P 2s, P 2p), oxygène (O 1s) et carbone (C 1s) détectés à la surface des céramiques en HA et en CHA non fonctionnalisées ont fait l'objet d'une étude de décomposition présentée dans le chapitre II. Les mesures par XPS ont été réalisées sur des positions aléatoires à la surface des céramiques lors des différentes étapes de fonctionnalisation.

La Figure 120 représente les spectres larges des céramiques en HA et en CHA fonctionnalisées par le VEGF (étape 3 : addition du VEGF). Ces deux spectres sont représentatifs de tous les spectres larges obtenus après les différentes étapes de fonctionnalisation (voir annexe 3 et 4).

Les pics caractéristiques des éléments oxygène et carbone sont détectés, respectivement, sur les deux céramiques autour de 532 et 284 eV. Les deux pics autour de 555 eV sont attribués aux plasmons de l'atome d'oxygène. L'intensité des pics de l'élément calcium est très faible à la surface de la céramique HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF (spectre A-Figure 120). En effet, les pics Ca 2s, Ca 2p et Ca3p situés respectivement à 434, 347 et 235 eV sont peu intenses comparé aux spectres larges des céramiques non fonctionnalisées présentés au chapitre II. Dans le cas de la céramique CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF (spectre B-Figure 120), seul le pic Ca 3p est suffisamment intense pour pouvoir être observé à 228 eV. La même observation est faite sur les spectres des céramiques CHA-T et CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> présentés en annexe 4. Quant à l'élément phosphore, sa contribution est absente des spectres larges quelle que soit l'étape de fonctionnalisation et la céramique considérée. La profondeur de la mesure par XPS est d'environ 5 nm, dès l'étape de la silanisation, la réponse de la céramique est donc minoritaire. De plus, sachant que la surface d'analyse est de 300 µm x 700 µm, la surface des céramiques doit donc être quasiment recouverte de molécules organiques dès l'étape de la silanisation. L'absence des pics Ca 2p et Ca 2s sur le spectre large de la surface de la céramique CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF semble traduire la présence d'une quantité plus importante en molécules organiques comparé à la céramique HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF.

Le pic très intense observé à 400 eV est attribué à l'élément azote (N 1s). En fonction du spectre considéré, il est dû aux fonctions amines et/ou amides présentes dans les trois

molécules organiques : APTES, SM(PEG)<sub>6</sub> et le VEGF (voir formule sur la Figure 111). Les pics du silicium, Si 2s et Si 2p, sont respectivement observés à 153 et 102 eV. La présence du silicium à la surface d'une hydroxyapatite stœchiométrique (HA) et une hydroxyapatite carbonatée (CHA) fonctionnalisées est uniquement liée à la présence d'APTES, silane utilisé pour la première étape de fonctionnalisation.

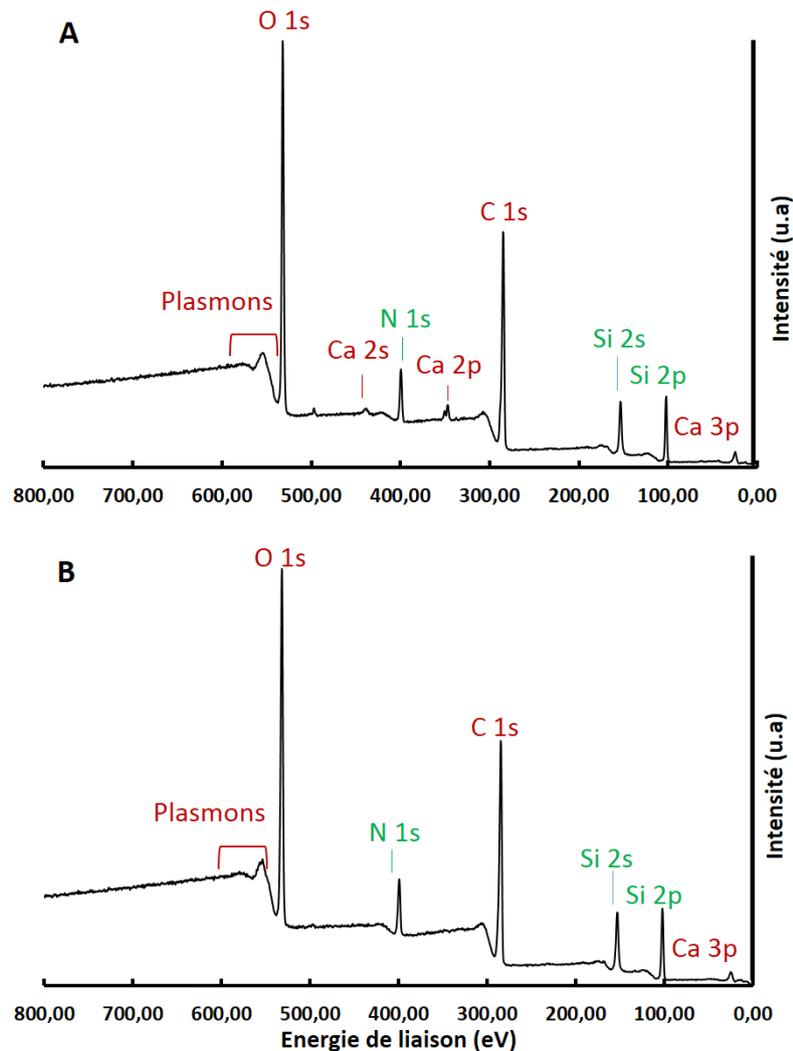


Figure 120 : Spectres XPS larges des céramiques fonctionnalisées A) HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF et B) CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF.

Le Tableau 16 présente les pourcentages atomiques des éléments chimiques présents à la surface des céramiques en HA et en CHA avant et après chaque étape de fonctionnalisation par le VEGF. Les pourcentages atomiques relatifs (la somme des pourcentages des éléments chimiques est égale à 100 %) sont calculés à partir des acquisitions HR des spectres. Ces derniers seront détaillés par la suite.

Les spectres HR permettent de mettre en évidence des contributions qui n'étaient pas détectables sur les spectres larges. Cela est dû aux conditions d'acquisition qui ne sont pas les mêmes.

Le Tableau 16 montre que les contributions en calcium (Ca), en phosphore (P) et en oxygène (O) diminuent de façon significative dès l'étape de silanisation. Plus précisément, l'élément calcium est très peu quantifiable et le phosphore quasiment absent (pourcentages atomiques inférieurs à 1 %). Cela confirme que l'APTES, forme une couche relativement épaisse (profondeur analyse XPS ~ 5 nm) qui couvre la surface des deux céramiques. Si la contribution de l'oxygène chute après la silanisation, son pourcentage demeure stable au fil des étapes. L'APTES doit théoriquement se fixer sur les sites P-OH présents à la surface de la céramique [69], [252], donc plus la quantité d'APTES en surface est importante plus le nombre de sites P-OH et OH (hydroxyde) écrantés augmente. Cela signifie que l'oxygène détecté après chaque étape de fonctionnalisation est propre aux molécules organiques présentes à la surface des céramiques fonctionnalisées.

L'ajout de molécules organiques entraîne une augmentation de la contribution en carbone. Même si le carbone détecté est pour partie dû aux atomes de carbone résiduel (pollution) et aux groupements carbonates dans le cas de la CHA, l'augmentation nette de sa contribution dès l'étape de la silanisation traduit la présence des molécules organiques. Taillac *et al.* ont observé une diminution du pourcentage atomique en oxygène de 46,5 à 32,8 après fonctionnalisation de la cellulose par de l'APTES accompagnée d'une augmentation en carbone de 53,5 à 63,3 [253]. Après la silanisation, l'augmentation de la contribution du carbone dans le cas de la céramique en CHA (72,6 % at) est plus importante que pour celle en HA (52,3 % at). Cela est peut-être dû à la présence des groupements carbonates (environ 2 % at) qui sont propres à la céramique en CHA, mais les contributions très faibles du calcium et du phosphore laissent penser que la céramique est totalement recouverte d'APTES. Cette augmentation pourrait se justifier soit par une contamination de surface (carbone de pollution) plus élevée, soit par la présence d'une grande quantité d'APTES (amas plus importants de molécules organiques) comparé à la céramique en HA.

Le pourcentage atomique en silicium est lié à la présence de l'APTES, alors que celui de l'azote est dû à la présence de l'APTES, du SM(PEG)<sub>6</sub> et du VEGF à la surface des deux céramiques. Le rapport Si/N augmente au fil des étapes de fonctionnalisation, alors qu'on pouvait penser qu'il diminuerait. Cela signifie que le silane est toujours accessible. La forte contribution du silicium après les étapes 2 et 3 de fonctionnalisation indique que le SM(PEG)<sub>6</sub> et le VEGF ne se positionnent pas sur la totalité de la surface recouverte par l'APTES mais se fixent plutôt sur certaines zones comme cela a été montré par imagerie Raman.

% atomique	Ca	P	O	C	Si	N	Si/N
HA	18,2	11,9	54,1	15,8	-	-	-
CHA	17,8	7,5	55,3	19,4	-	-	-
HA-T	0,4	-	26,8	52,3	12,1	8,5	1,42
HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub>	0,5	-	25,9	52,7	13,3	7,5	1,77
HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> -VEGF	0,7	0,2	25	56,1	11,6	6,4	1,81
CHA-T	0,1	-	15,2	72,6	6,9	4,9	1,40
CHA-T-SM(PEG) <sub>6</sub>	-	-	22,9	59,2	10,5	7,5	1,40
CHA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> -VEGF	0,1	0,2	24,8	56,1	12,3	6,4	1,92

Tableau 16 : Pourcentages atomiques des différents éléments chimiques détectés à la surface des céramiques en HA et en CHA avant et après chaque étape de fonctionnalisation.

Les spectres haute résolution de la surface des céramiques en HA et en CHA après chacune des trois étapes de fonctionnalisation par le VEGF sont présentés sur les Figure 121 (décomposition du pic O 1s), Figure 122 (décomposition du pic C 1s), Figure 123 (décomposition du pic Si 2p) et Figure 124 (décomposition du pic N 1s). Les différents éléments chimiques associés à leurs énergies de liaisons (eV) respectives sont récapitulés dans le Tableau 17. Les énergies des liaisons des différents éléments chimiques détectés à la surface des céramiques en HA et en CHA non fonctionnalisées sont présentées au chapitre II, paragraphe II.2.2.8.

La décomposition du pic O 1s (Figure 121) indique les mêmes contributions après les trois étapes de fonctionnalisation des céramiques en HA et en CHA. Les contributions observées autour de 532 eV sont associées aux liaisons de type Si-O, O=C-N et C=O des différentes molécules présentes en surface (Tableau 17). La liaison Si-O est propre à l'APTES utilisé comme *cross linker* lors de l'étape de la silanisation [254], les contributions dues aux fonctions amides (O=C-N) sont liées à l'addition du SM(PEG)<sub>6</sub> et du VEGF et le groupe carboxyle (C=O) au VEGF [254], [255]. Les pics observés autour de 531 eV correspondent majoritairement à l'oxygène lié au carbone de pollution. Enfin, les contributions situées autour de 533 eV sont associées aux molécules d'eau adsorbées en surface [256].

La décomposition du pic C 1s (Figure 122) indique des contributions communes (énergies de liaison différentes) aux trois étapes de fonctionnalisation. La principale contribution autour de 284,7 eV est attribuée au carbone des liaisons C-C [164], [256]. La contribution enregistrée autour de 288 eV est classiquement attribuée soit à la pollution, soit à la liaison C=O/N-C=O

(et à la pollution) après ajout des molécules organiques [257], [254]. La contribution autour de 285,6 eV concerne les liaisons  $\underline{\text{C}}\text{-N}$  [254], [164], [256]. La contribution autour de 286,5 eV qui est présente dans toutes les étapes de fonctionnalisation sauf pour le substrat HA-T et HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> peut être associée au type de liaisons  $\underline{\text{C}}\text{-O}$  [254], [257]. L'étape d'addition du VEGF indique la présence de deux nouvelles contributions (288,9/289,0 eV et 286,0/285,9 eV). La contribution à 288,9 eV pour HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF et à 289,0 eV pour CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF est associée aux liaisons  $\underline{\text{C}}=\text{O}/\text{N}-\underline{\text{C}}=\text{O}$  [254], [164]. Quant aux contributions enregistrées à 286,0 eV et 285,9 eV, elles peuvent être associées à la liaison  $\underline{\text{C}}\text{-N}$ . Les différences de contributions observées sur les céramiques en HA et en CHA peuvent alors être associées à un carbone de pollution et à la présence des molécules organiques. Ces contributions demeurent donc difficiles à interpréter mais leurs évolutions témoignent néanmoins d'une évolution de la chimie de surface.

La décomposition du pic Si 2p (Figure 123) indique la présence du silicium en surface. Celui-ci est uniquement dû au *cross linker* APTES qui a été additionné lors de l'étape de silanisation. La décomposition du pic Si 2p indique une forte contribution à 102,5 eV. Cette dernière est principalement attribuée au groupe SiO<sub>3</sub>C ( $\underline{\text{Si}}\text{-O-C}$ ) de l'APTES [164] et la contribution autour de 103,5 eV est associée à la liaison  $\text{O}-\underline{\text{Si}}\text{-O}$ . Les contributions du silicium présentes sur les autres étapes de fonctionnalisation indiquent d'abord que le silane est toujours accessible en surface. En effet, l'APTES n'ayant pas servi pour la suite de la fonctionnalisation (addition du SM(PEG)<sub>6</sub> et du VEGF) semble résister au solvant DMSO et aux différents rinçages effectués lors de la fonctionnalisation par la SM(PEG)<sub>6</sub> et le VEGF ce qui laisse penser qu'il y a des interactions céramiques/silane relativement fortes.

La décomposition du pic N 1s (Figure 124) indique la présence de deux contributions. La première contribution à 399,5 eV pour HA-T et 399,7 eV pour CHA-T est associée aux liaisons  $\text{C}-\underline{\text{N}}\text{H}_2$  des groupements amines (NH<sub>2</sub>) libres disponibles à la surface silanisée [254], [164]. La deuxième contribution enregistrée autour de 401 eV est attribuée aux liaisons  $\text{C}-\underline{\text{N}}\text{H}_3^+/\text{O}=\text{C}-\underline{\text{N}}\text{H}_2^+$  des amines sous forme protonée [258]. Cette protonation peut être expliquée par la différence d'électronégativité entre l'azote du groupe amine et l'hydrogène des groupes hydroxyles (OH et P-OH) présent à la surface des céramiques en HA et en CHA. Cette différence induit alors la formation de liaisons hydrogènes, favorise la protonation des groupements NH<sub>2</sub> en NH<sub>3</sub><sup>+</sup> [240], et modifie l'orientation de l'APTES qui se replie en surface (Figure 125). Cela nécessite des sites O-H libres qui peuvent être identifiés par la liaison O-H à 532,2 eV sur les céramiques avant fonctionnalisation et la présence d'eau adsorbée en surface à 533,3 eV (Figure 121). Il n'y a pas d'évolution de l'azote après les autres étapes de fonctionnalisation.

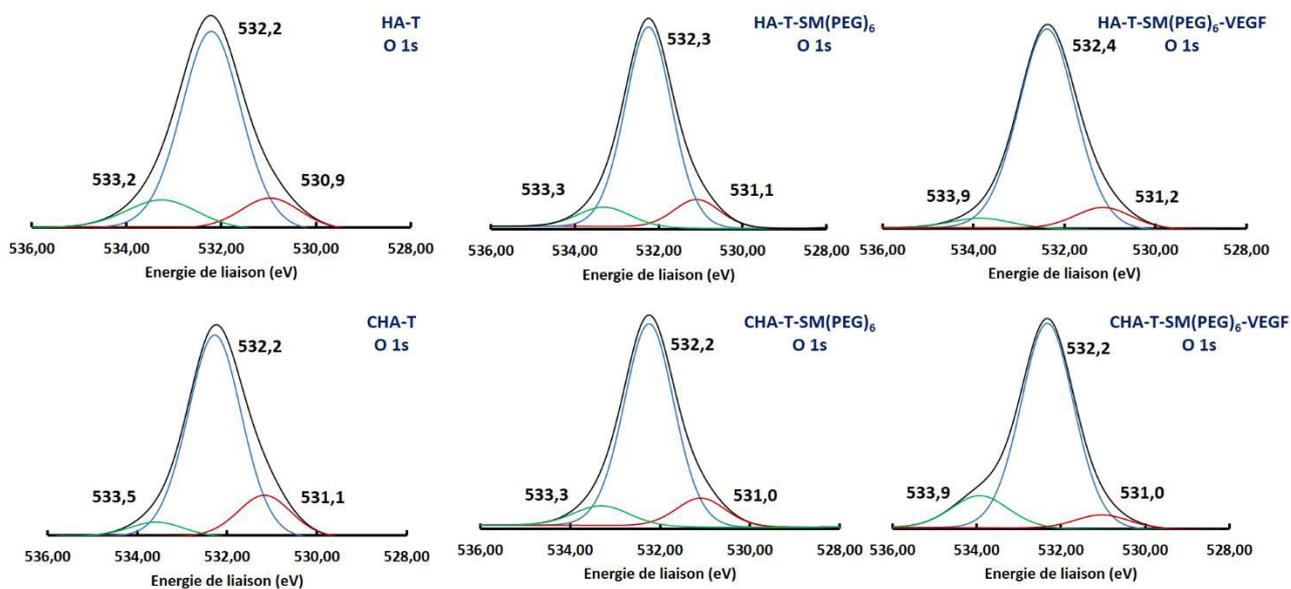


Figure 121 : Décomposition du pic XPS O 1s obtenu à la surface des céramiques denses et polies en HA et en CHA et après chaque étape de fonctionnalisation par le VEGF.

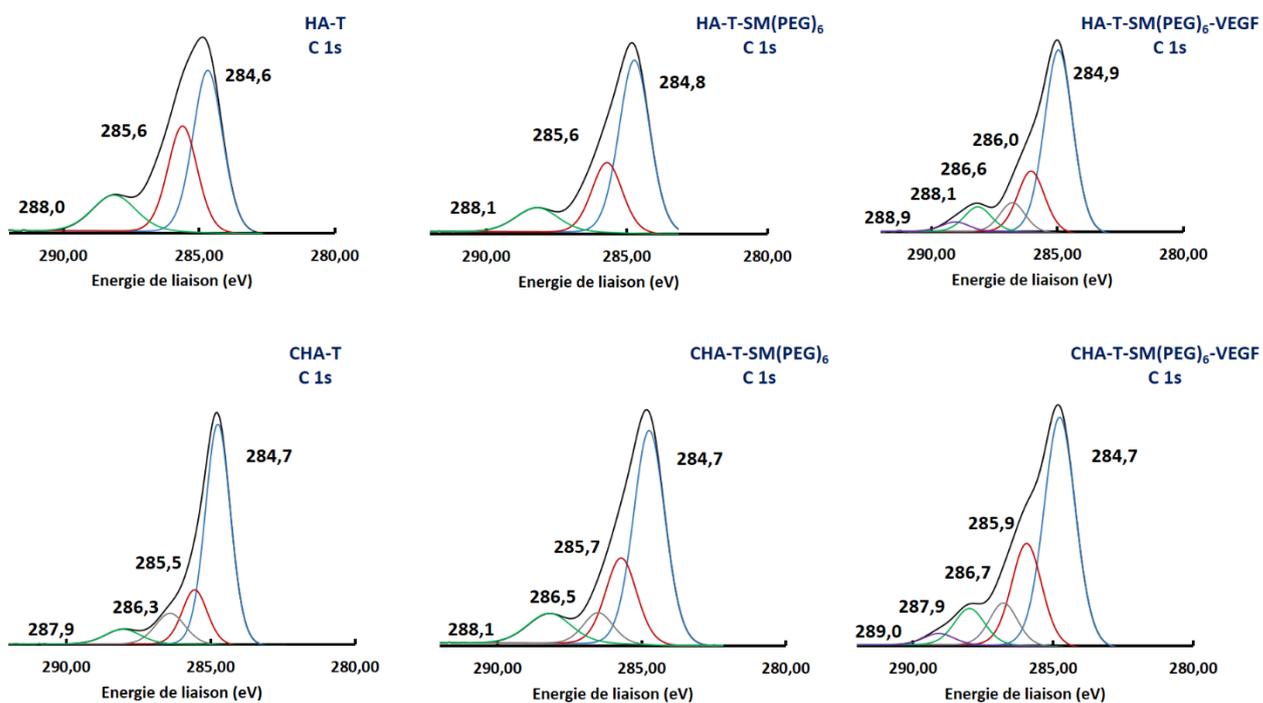


Figure 122 : Décomposition du pic XPS C 1s obtenu à la surface des céramiques denses et polies en HA et en CHA et après chaque étape de fonctionnalisation par le VEGF.

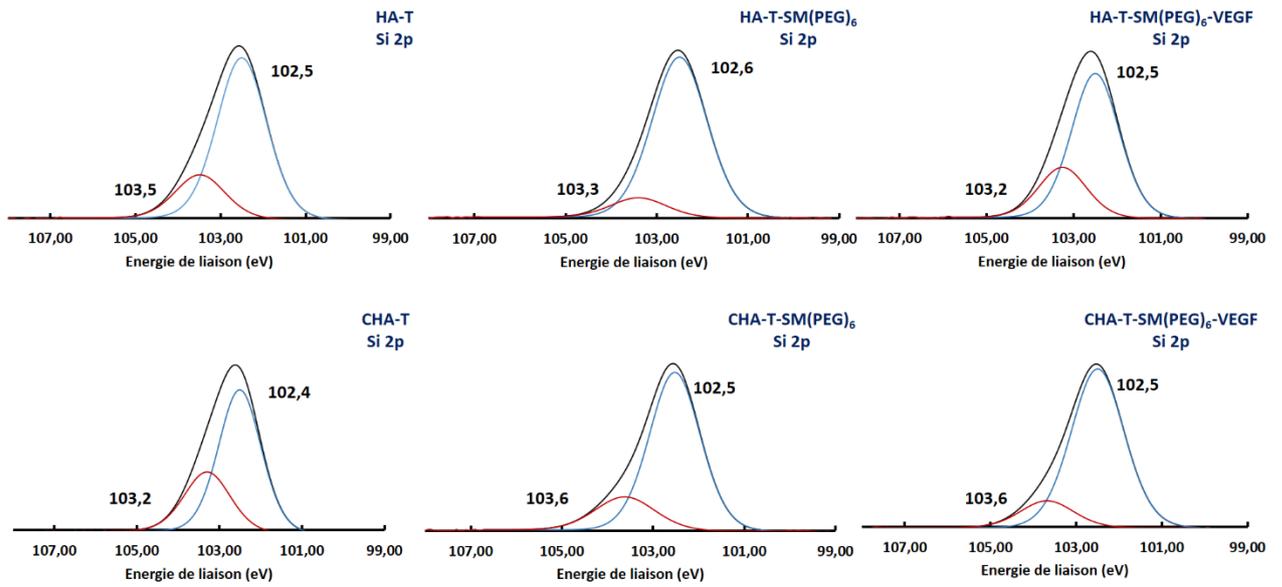


Figure 123 : Décomposition du pic XPS Si 2p obtenu à la surface des céramiques denses et polies en HA et en CHA et après chaque étape de fonctionnalisation par le VEGF.

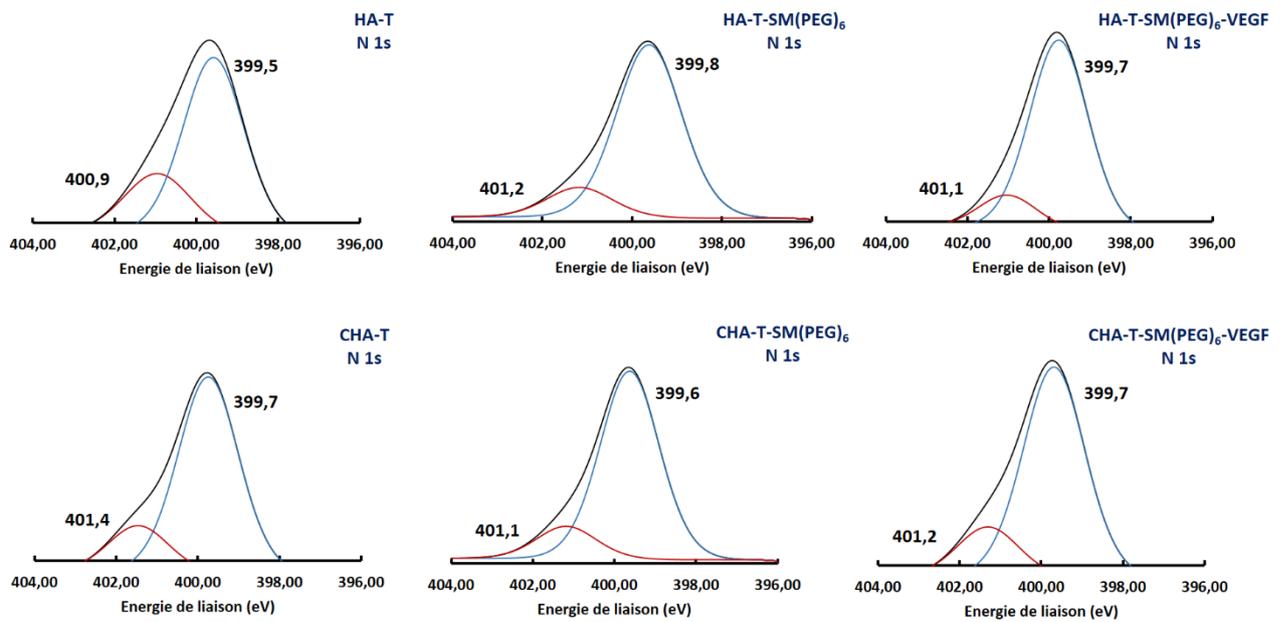


Figure 124 : Décomposition du pic XPS N 1s obtenu à la surface des céramiques denses et polies en HA et en CHA et après chaque étape de fonctionnalisation par le VEGF.

Echantillon	O 1s			C 1s				Si 2p		N 1s		
	H <sub>2</sub> O	Si-O/O=C-N/ C=O	O-C		C=O/N-C=O	C-N	C-C	C-O	O-Si-O	Si-O-C	C-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> / O=C-NH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	C-NH <sub>2</sub>
HA-T	533,2	532,2	530,9		288,0	285,6	284,6		103,5	102,5	400,9	399,5
HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub>	533,3	532,3	531,1		288,1	285,6	284,8		103,3	102,6	401,2	399,8
HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> - VEGF	533,9	532,4	531,2	288,9	288,1	286,0	284,9	286,6	103,2	102,5	401,1	399,7
CHA-T	533,5	532,2	531,1		287,9	285,5	284,7	286,3	103,2	102,4	401,4	399,7
CHA-T-SM(PEG) <sub>6</sub>	533,3	532,2	531,0		288,1	285,7	284,7	286,5	103,6	102,5	401,1	399,6
CHA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> - VEGF	533,9	532,2	531,0	289,0	287,9	285,9	284,7	286,7	103,6	102,5	401,2	399,7

Tableau 17 : Energies des liaisons (eV) des éléments chimiques (O, C, Si, N) détectés à la surface des céramiques en HA et en CHA après chaque étape de fonctionnalisation. Tous les spectres haute résolution sont repositionnés par rapport au calcium Ca 2p<sub>(3/2)</sub> (347 eV). La profondeur d'analyse XPS est d'environ 5 nm.

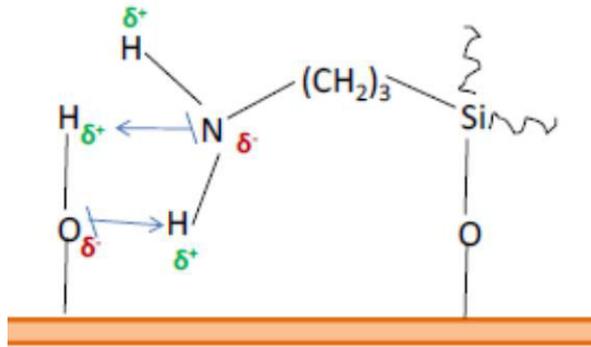


Figure 125 : Schéma illustrant la protonation de la fonction amine de l'APTES lors de son utilisation pour la silanisation de substrat en céramique (HA) [69]

### III.2.3. Caractérisation des céramiques fonctionnalisées par microscopie à force atomique

L'évolution de la surface après chaque étape de fonctionnalisation a été suivie par microscopie à force atomique (AFM pour *atomic force microscopy*). Des images AFM de surface ont été réalisées après chaque étape de fonctionnalisation. Les acquisitions ont été effectuées en mode contact avec des pointes en nitrure de silicium (constante de raideur de 0,046 N/m). La taille des images est de 10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$ . Les images AFM de surface ont été acquises sur différentes zones de manière aléatoire à la surface des deux céramiques en HA et en CHA. Cela signifie qu'il peut y avoir des zones qui présentent manifestement une évolution de surface et d'autres où cette évolution sera moindre. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 126 et la Figure 127 pour la céramique en HA et sur la Figure 128 et la Figure 129 pour la céramique en CHA.

Dans le cas de la fonctionnalisation des céramiques en HA, l'image de l'étape HA-T (image B-Figure 126) présente une échelle de hauteur qui indique une amplitude totale maximale de surface de 532 nm, laquelle est nettement plus importante que celle observée sur la surface de la céramique polie et non fonctionnalisée en HA (image A-Figure 126) qui est de 126 nm. Les rugosités surfaciques ( $S_a$ ) des céramiques HA et HA-T sont respectivement de 5 et 63 nm. L'augmentation de la rugosité sur la céramique HA-T témoigne de la présence d'une couche d'APTES en surface. Les rugosités surfaciques ( $S_a$ ) continuent à augmenter après ajout du SM(PEG)<sub>6</sub> (images C-Figure 126) et du VEGF (images D-Figure 126), et sont respectivement de 87 et 93 nm. De plus, les images AFM de surface mettent en évidence un dépôt sous forme globulaire avec une répartition homogène à la surface de ces zones.

La Figure 127 présente les profils de rugosités extraits des images AFM de surface des céramiques HA (image A-Figure 126) et HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF (image D-Figure 126) après immobilisation du VEGF. Le profil D (Figure 127) indique la présence de vallées et de sommets

avec une hauteur maximale du profil Rz de 0,35  $\mu\text{m}$ , alors que le profil A (Figure 127), extrait de l'image AFM de la surface de la céramique HA polie et non fonctionnalisée, présente un profil de rugosité lisse ( $Rz \sim 0,02 \mu\text{m}$ ). Les aspérités présentes à la surface de la céramique HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF ont une forme globulaire. La présence des différentes molécules organiques ayant été mise en évidence par imagerie Raman et par analyse XPS, ces modifications de surfaces, variation d'amplitude des profils et augmentation de la rugosité surfacique au fil des étapes de fonctionnalisation, témoignent de la présence de l'APTES, du SM(PEG)<sub>6</sub> et du VEGF.

Les images AFM de la surface des céramiques en CHA fonctionnalisées sont présentées en Figure 128. L'échelle de hauteur sur l'image de l'étape CHA-T (image B-Figure 128) montre une amplitude totale de surface maximale à 620 nm alors que sur l'image de la surface de la céramique en CHA polie et non fonctionnalisée (image A-Figure 128), elle est de 113 nm. Les rugosités surfaciques des céramiques CHA et CHA-T sont respectivement de 5 et 58 nm. Cette augmentation de la rugosité entre les deux surfaces témoigne de la présence de l'APTES en surface. Mais, contrairement aux céramiques en HA, la surface de la céramique CHA-T indique une répartition inhomogène de l'APTES. Cette inhomogénéité est confirmée par les profils de rugosités (profil 1 et 2 de la Figure 129 B-) de l'image AFM de surface de CHA-T (image B-Figure 128). Le profil 2, extrait de la zone présentant des amas globulaires indique des vallées et des sommets importants qui témoignent de la présence de l'APTES en surface ( $Rz = 0,35 \mu\text{m}$ ), alors que le profil 1, extrait des zones présentant un aspect de surface poli indique un profil de rugosité lisse ( $Rz = 0,04 \mu\text{m}$ ), synonyme de l'absence d'APTES sur ces zones.

Au fil des étapes de fonctionnalisation, la rugosité surfacique devient de plus en plus importante. Pour les surfaces CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> (image C-Figure 128) et CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF (image D-Figure 128), elles sont respectivement de 69 et de 73 nm. Les profils de rugosité A et D (Figure 129) sont extraits respectivement des images AFM de surface CHA polie (image A-Figure 128) et CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF (image D-Figure 128). Le profil D indique la présence de vallées et des sommets avec une hauteur maximale Rz de 0,41  $\mu\text{m}$  alors que le profil A correspond à un profil de rugosité avec un aspect lisse et une hauteur maximale Rz de 0,04  $\mu\text{m}$ . Comme pour les céramiques en HA, ces modifications de surface traduisent la présence des molécules organiques en surface.

L'évolution des rugosités et des images AFM de surface au fil des étapes de fonctionnalisation des céramiques en HA et en CHA confirment l'addition de molécules organiques sur les zones imagées, mais les zones scannées sont, contrairement à l'imagerie Raman où à l'XPS, de faibles dimensions (10 x 10  $\mu\text{m}$ ). Néanmoins, l'AFM confirme que la céramique en CHA semble générer une silanisation inhomogène comparée à celle observée sur la céramique en HA où

la répartition de l'APTES est plutôt homogène. Ces points seront abordés plus en détail dans la discussion de l'ensemble des résultats obtenus sur la fonctionnalisation des céramiques en HA et en CHA par le VEGF.

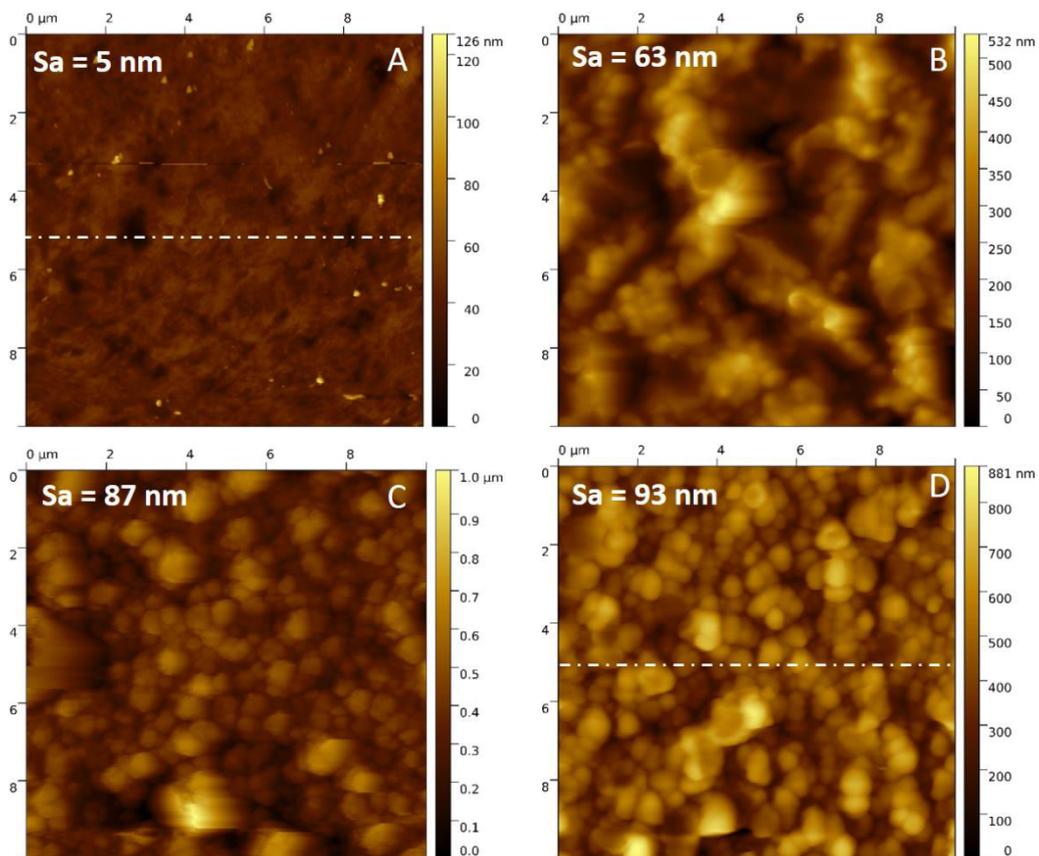


Figure 126 : Images AFM de la surface de la céramique en HA (A) avant et après chaque étape de fonctionnalisation avec (B) HA-T, (C) HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> et (D) HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF.

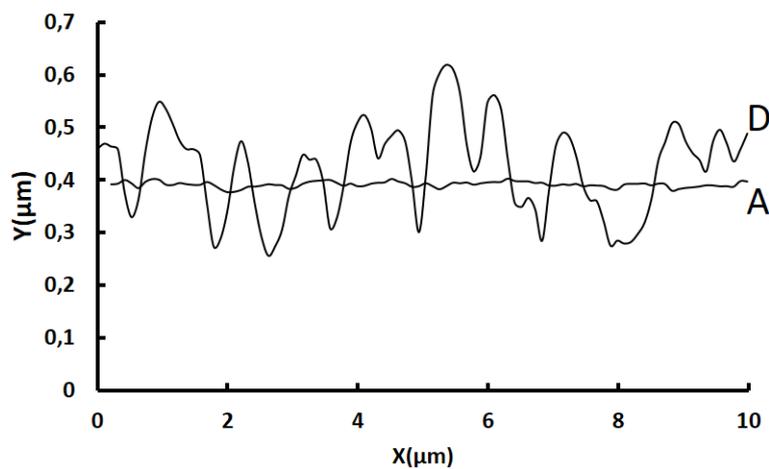


Figure 127 : Profils extraits des images AFM de surface de A) HA polie et D) HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF. Les zones analysées correspondent à celles mentionnées en pointillés sur le figure 64.

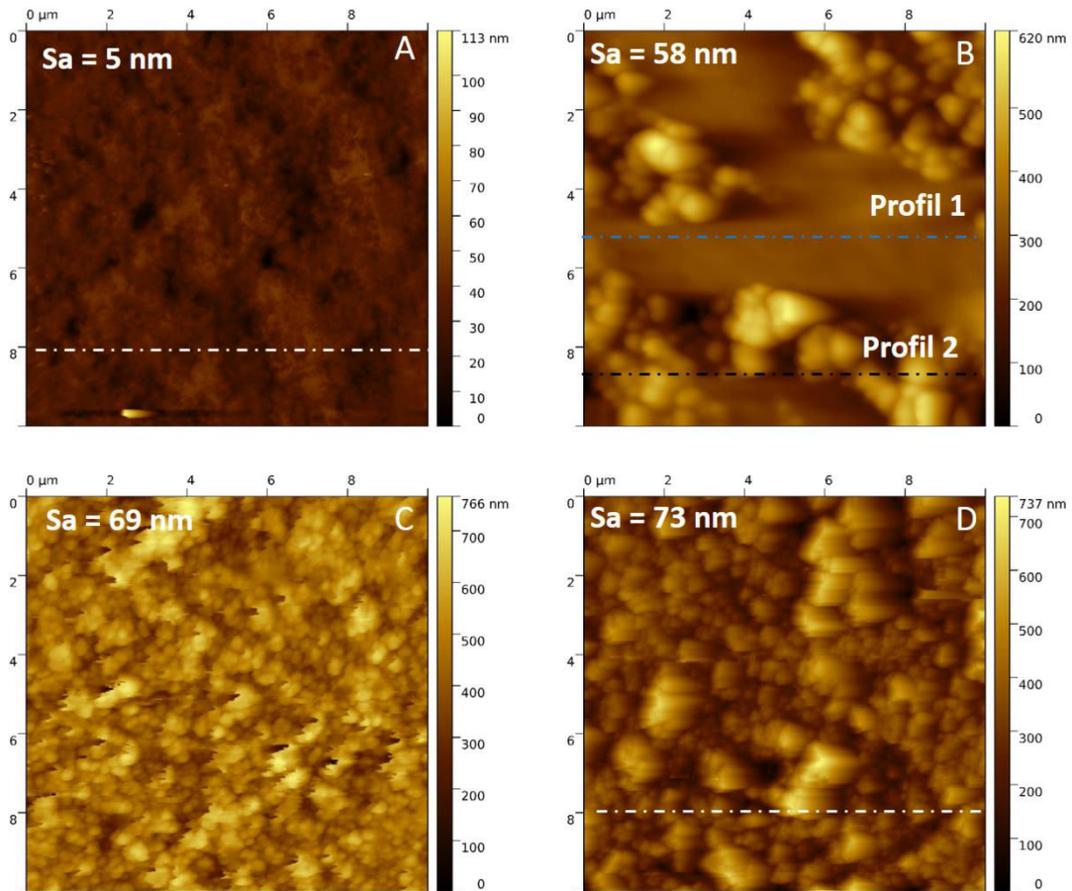


Figure 128 : Images AFM de la surface de la céramique en CHA (A) avant et après chaque étape de fonctionnalisation avec (B) CHA-T, (C) CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub> et (D) CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF.

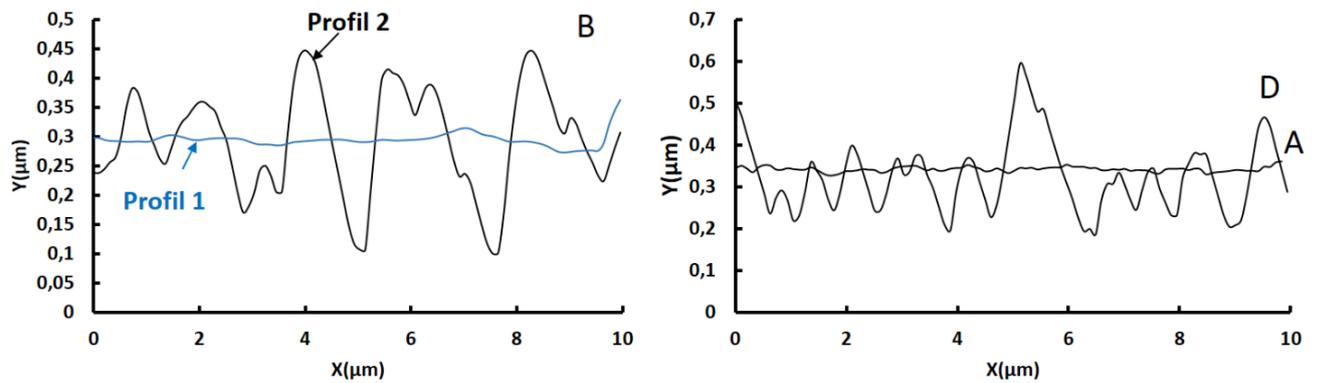


Figure 129 : Profils extraits des images AFM de surface de A) CHA polie, B) CHA-T, et D) CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>-VEGF. Les zones analysées correspondent à celles mentionnées en pointillés sur le figure 66.

### III.2.4. Discussion

La fonctionnalisation de céramiques en HA et en CHA par du VEGF (protéine impliquée dans l'angiogenèse) en utilisant comme *cross linker* l'APTES et comme *spacer* SM(PEG)<sub>6</sub> a été étudiée par différentes techniques de caractérisation. Chacune des étapes de fonctionnalisation a été caractérisée par imagerie Raman, spectroscopie des photoélectrons X et par microscopie à force atomique. La Figure 130 représente un schéma rendant compte des différentes surfaces analysées en imagerie Raman, en XPS, en AFM et la taille d'une cellule endothéliale.

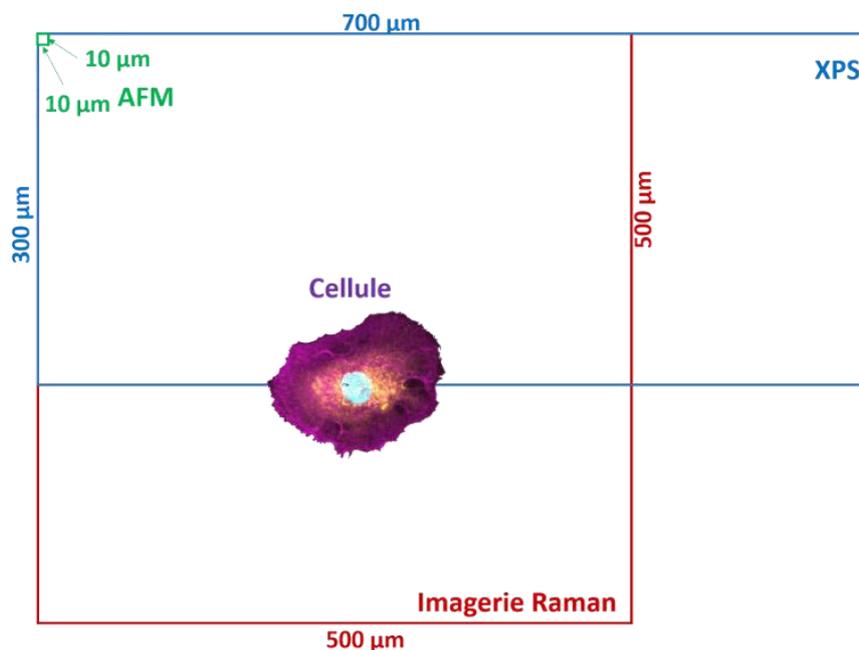


Figure 130 : Schéma représentant les tailles des surfaces analysées en imagerie Raman (500 µm x 500 µm), en XPS (300 µm x 700 µm), en AFM (10 µm x 10 µm) et d'une cellule endothéliale.

Les spectres ponctuels Raman pris aléatoirement à la surface des céramiques en HA et en CHA lors des trois étapes de fonctionnalisation n'ont pas montré de manière claire la présence successive de l'APTES, du SM(PEG)<sub>6</sub> et du VEGF. La présence de la bande associée à la vibration de l'élongation de la liaison C-H, qui est propre aux molécules organiques mises en jeu, a été mise en évidence sur les spectres ponctuels Raman mais l'augmentation de son intensité intégrée au fil des étapes de fonctionnalisation dépend fortement de la zone où le spectre ponctuel est enregistré. Très peu d'acides aminés propres au VEGF ont été détectés à la surface. Ils présentent des bandes très faibles associées à la chaîne latérale aromatique de la tyrosine (852 cm<sup>-1</sup>) et de la phénylalanine (1611 cm<sup>-1</sup>). La mise en évidence des acides aminés du VEGF demeure difficile compte tenu des quantités présentes en surface. En effet, la densité surfacique supposée en fonctions amines d'APTES est de 8.10<sup>-20</sup> mol/µm<sup>2</sup> [171] et pour des quantités en APTES totales, elle est de 30 µmol/m<sup>2</sup> (analyse élémentaire

carbone) [69]. Les résultats obtenus en XPS ont montré une réponse de l'APTES (présence du silicium) après chaque étape de fonctionnalisation et une augmentation de la contribution de l'élément carbone. Mais les différentes contributions de cet élément demeurent difficiles à attribuer du fait de la présence de carbone résiduel en surface. L'absence des fonctions amides ainsi que l'augmentation du rapport Si/N ne permettent pas la mise en évidence de la présence successive de l'APTES, du SM(PEG)<sub>6</sub> et du VEGF. La réponse ponctuelle non satisfaisante obtenue en spectroscopie Raman est confirmée par les résultats XPS.

Les images Raman des deux céramiques en HA et en CHA fonctionnalisées par le VEGF et réalisées sur des surfaces larges strictement identiques, ont mis en évidence une évolution de la chimie de surface au cours des différentes étapes de fonctionnalisation. L'augmentation de l'intensité intégrée de la bande d'élongation de la liaison C-H d'une étape à une autre indique une évolution des molécules organiques en surface. Le SM(PEG)<sub>6</sub> se localise sur les zones où l'APTES est majoritaire et le VEGF où le SM(PEG)<sub>6</sub> est présent. On a donc une sélectivité APTES/SM(PEG)<sub>6</sub>/VEGF. Cet effet « empilement » a également été observé par microscopie à force atomique. Même si les acquisitions des images AFM de surface ont été faites de manière aléatoire et dépendent extrêmement de la zone scannée avec une approche locale (taille du scan 10 µm x 10 µm - Figure 130), une augmentation de la rugosité surfacique et des hauteurs maximales Rz au fil des étapes de fonctionnalisation ont été observées ainsi que la présence d'aspérités globulaires qui sont à présent attribuables aux différentes molécules organiques présentes en surface.

Les analyses par XPS et AFM ont permis d'appuyer les résultats obtenus par imagerie Raman qui témoignent d'un enchaînement sélectif des différentes étapes de fonctionnalisation par le VEGF des céramiques en HA et en CHA.

Si cette tendance est commune aux céramiques en HA et en CHA, les images Raman mettent en évidence des différences dès l'étape de la silanisation. La répartition de l'APTES à la surface de la céramique en HA est plutôt homogène avec une intensité intégrée de la bande  $\nu(\text{C-H})$  qui est quatre fois moins élevée que celle obtenue à la surface de la céramique en CHA. Cette différence est illustrée de manière claire sur les histogrammes présentant l'évolution de l'intensité intégrée maximale de la bande  $\nu(\text{CH})$  en fonction des étapes de fonctionnalisation (Figure 118). La céramique en CHA présente une répartition inhomogène sous forme d'amas d'APTES en surface. La même inhomogénéité a été observée en local sur l'image AFM de la surface de la céramique en CHA silanisée. Malgré ces différentes répartitions de l'APTES à la surface des céramiques, les images Raman ont mis en évidence la présence de l'APTES en faible teneur quasiment sur la totalité de la surface scannée, tout comme les analyses par XPS (300 µm x 700 µm - Figure 130). Ces dernières indiquent la présence de très peu de calcium et de phosphore (pourcentage atomique inférieur à 1) dès

l'étape de la silanisation (profondeur d'analyse environ 5 nm). La contribution du silicium augmente alors qu'elle devrait diminuer compte tenu de l'apport en azote par les différentes molécules ajoutées (SM(PEG)<sub>6</sub> et VEGF) aux étapes 2 et 3 de la fonctionnalisation. L'APTES couvre alors l'ensemble de la surface analysée mais le substrat influence sa répartition.

Les spectres Raman ont mis en évidence une signature d'APTES qui persiste malgré les deux étapes de fonctionnalisation et les différents rinçages effectués. Cela nous amène à dire qu'il y a bien une forte interaction entre l'APTES et les céramiques. La répartition de l'APTES en forte teneur sous forme de petits agglomérats dans le cas de la céramique en HA et d'amas pour la céramique en CHA laisse entrevoir une polymérisation de celui-ci en surface malgré l'utilisation d'un milieu anhydre. Les céramiques en HA et en CHA présentent des propriétés de surface différentes. En effet, en plus de l'effet des ions carbonates, la surface de la céramique en CHA indique une mouillabilité légèrement plus importante que celle de la HA avec des angles de contact moyens respectifs de  $51 \pm 2$  et  $56 \pm 4^\circ$ . Les potentiels zêta des poudres d'HA et de CHA sont respectivement de  $-44 \pm 3$  mV et  $-38 \pm 2$  mV. Le comportement différent de la silanisation entre ces deux céramiques pourrait être expliqué soit par la surface de la céramique en CHA qui est moins chargée par rapport à celle de la céramique en HA, soit par le caractère légèrement plus hydrophile de la CHA comparé à celui de l'HA.

L'ensemble de ces résultats confirme que l'étape clé de l'immobilisation du VEGF est donc la silanisation. En effet, l'APTES est la première molécule organique fixée à la surface de la céramique, elle est le lien entre la partie inorganique (la céramique) et la partie organique c'est à dire les molécules de SM(PEG)<sub>6</sub> et de VEGF. De manière plus explicite, la Figure 131 présente un schéma général indiquant l'immobilisation du VEGF à la surface des céramiques phosphocalciques accompagné d'un zoom sur l'interaction APTES/céramique. La présence d'un film d'APTES sur la totalité de la surface a été mis en évidence par imagerie Raman et par XPS, cependant l'enchaînement de la fonctionnalisation est uniquement observé sur les agglomérats et les amas présentant une forte teneur en APTES. En effet, la détection de l'azote en surface par XPS indique une protonation de l'azote (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) et la présence d'amines NH<sub>2</sub> disponibles pour la suite de la fonctionnalisation. Ce film d'APTES contient alors des amines protonées qui ne seraient pas disponibles pour la suite de la fonctionnalisation. A la vue du mécanisme réactionnel impliqué dans cette fonctionnalisation, beaucoup d'amines NH<sub>2</sub> devraient être présentes en surface après l'étape de la silanisation, malgré la protonation d'une partie de ces amines, la probabilité d'avoir des NH<sub>2</sub> libres est beaucoup plus grande sur les amas observés par imagerie Raman.

En revanche, les différences de répartition de l'APTES observées entre HA et CHA par imagerie Raman n'expliquent pas le mécanisme impliqué dans l'interface silane/céramique pour laquelle des questions demeurent. L'interface APTES/céramique peut être expliquée soit par une fonctionnalisation par liaison covalente avec les sites P-OH de l'apatite (donc une liaison Si-O-P établie), soit par une fonctionnalisation par une partie des fonctions amines ( $\text{NH}_2$ ) présentes dans l'APTES. Dans ce cas-là la polymérisation du silane (homocondensation) pourrait être favorisée. L'autre partie des fonctions amines serait disponible pour la suite de la fonctionnalisation par le SM(PEG)<sub>6</sub>. La mise en évidence de la liaison Si-O n'est pas évidente. Michelot *et al.* ont mis en évidence de l'eau adsorbée à la surface d'échantillons apatitiques (HA séchée à 100 °C, HA lyophilisée, apatite nanocristalline) qui est due à la présence d'une couche hydratée à la surface malgré un pré-séchage préalable et l'utilisation d'un milieu anhydre (toluène) [156]. Cette hydratation persisterait alors, ne permettant pas d'éviter la formation de la liaison Si-O-Si liée à la réaction d'homocondensation des silanes entre eux. On notera que les spectres XPS réalisés après chaque étape de fonctionnalisation traduisent la présence d'eau adsorbée en surface. Les signatures Raman attribuées aux groupes Si-O-P et Si-O-Si n'ont pas pu être observées car elles sont situées entre 900 et 1000  $\text{cm}^{-1}$  pour Si-O-P et à 1070  $\text{cm}^{-1}$  pour Si-O-Si. Ces gammes spectrales correspondent à la vibration d'élongation des groupements phosphates des hydroxyapatites étudiées ce qui rend leur mise en évidence difficile. Selon Michelot *et al.* il semblerait y avoir une compétition entre l'immobilisation par liaison covalente de l'APTES et sa polymérisation en surface. Quels que soient les substrats étudiés, une hydratation de surface est toujours observée, ce qui traduit inévitablement une polymérisation intermoléculaire. Mais, lorsque l'hydratation de surface est limitée, l'APTES est néanmoins présent, la polymérisation limitée et la diminution des bandes OH<sup>-</sup> de l'apatite laisse présager des interactions fortes [156].

La fonctionnalisation par liaison covalente semble nécessiter alors des conditions de séchage drastiques. Une hydratation plus élevée à la surface de la céramique en CHA en étant légèrement plus hydrophile comparée à la surface de la céramique en HA pourrait favoriser une polycondensation plus importante en surface d'où la silanisation différente entre les deux céramiques.

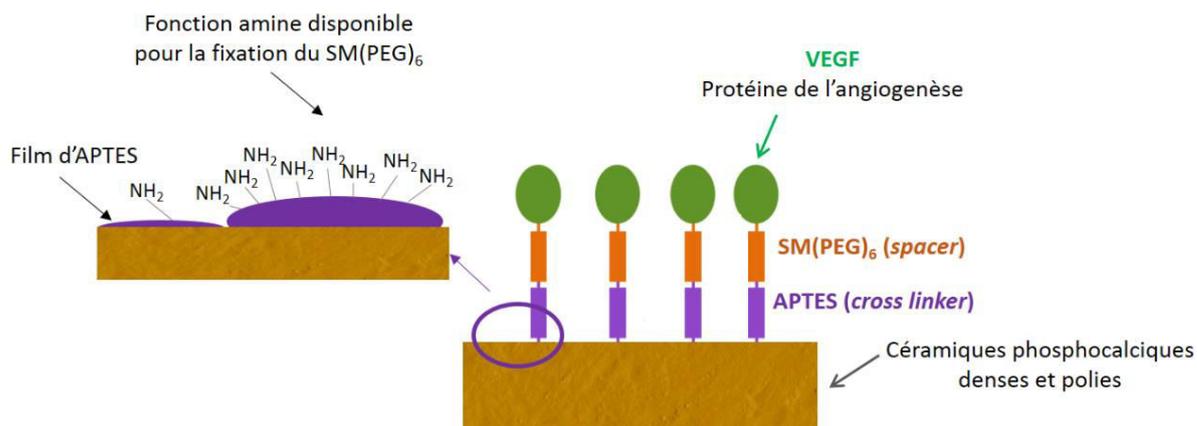


Figure 131 : Représentation schématique de l'immobilisation du facteur de croissance VEGF sur des céramiques phosphocalciques denses et polies avec un zoom sur l'interaction APTES/céramique.

Une couverture totale de la surface de la céramique par l'APTES engendre une réponse intense et suffisante pour suivre les différentes étapes de fonctionnalisation mais n'est pas recherchée. En effet une couverture partielle de la surface par l'APTES, sur lequel le  $SM(PEG)_6$  puis la protéine VEGF seraient immobilisés, serait souhaitée car elle permettrait aux cellules osseuses d'interagir directement avec la céramique. De plus, une présence importante d'APTES et donc de VEGF risquerait de surstimuler le phénomène de l'angiogenèse et donc induire la croissance de cellules cancéreuses. Le but serait de baisser la quantité du silane avec une couverture partielle de la surface. Pour cela, d'autres silanes peuvent être envisagés comme le 3-(éthoxydiméthylesilyl)propylamine (APDMES,  $CH_3CH_2OSi(CH_3)_2(CH_2)_3NH_2$ ) le 3-aminopropyl(diéthoxy)méthylesilane (APMDES,  $CH_3Si(OC_2H_5)_2(CH_2)_3NH_2$ ) présentant respectivement une et deux chaînes éthoxyles. L'utilisation d'APMDES difonctionnel (deux chaînes éthoxyles) limitera la polymérisation intermoléculaire mais ne l'éliminera pas. En revanche l'APDMES possède une seule chaîne éthoxyle, la fonctionnalisation serait alors favorisée par une seule liaison covalente Si-O-P (pas de polymérisation possible en surface) si cette liaison est possible. Cependant des travaux réalisés dans le cadre du post-doctorat de David Siniscalco (travaux en cours de publication) ont montré que même en utilisant les silanes d'APDMES et d'APMDES, les images Raman mettent en évidence une présence importante du silane en surface.

### III.2.5. Conclusion

Cette partie des travaux de thèse s'est intéressée au suivi de la fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques par le VEGF. Le protocole mis en place au laboratoire est un protocole de fonctionnalisation multi-étapes « *grafting from* » basé sur des réactions successives de silanisation (addition de l'APTES), de PEGylation (addition du SM(PEG)<sub>6</sub>) et une réaction *click thiol-ene* pour l'immobilisation du VEGF. Le protocole initial a été modifié (addition du SM(PEG)<sub>6</sub> en 2 h au lieu de 24 h et immobilisation du VEGF dans du DMSO au lieu du PBS) afin d'être réalisé en milieu anhydre et ainsi s'affranchir des problèmes de dissolution-précipitation des phosphates de calcium engendrés lors de l'utilisation d'un milieu PBS pour la fixation de la protéine. Ce protocole pourra être appliqué à d'autres types de protéines.

L'analyse multiéchelle réalisée sur le suivi de la fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques par le VEGF a permis de mettre en évidence la complémentarité des différentes techniques spectroscopiques et d'imagerie comme étant des outils tout à fait appropriés pour suivre la fonctionnalisation par des protéines sur des biocéramiques phosphocalciques. La caractérisation par AFM des surfaces fonctionnalisées par le VEGF a révélé une modification de topographie en fonction des différentes étapes de fonctionnalisation, cependant, l'information requise demeure spatiale (sans repositionnement) avec une échelle petite non représentative à l'échelle cellulaire (Figure 130). L'analyse d'extrême surface (XPS) a fourni une information chimique partielle et moyenne sur la fonctionnalisation mais non spatiale. Aucun repositionnement des échantillons n'est possible, cependant la taille du scan est à l'échelle cellulaire (Figure 130). L'évolution de la nature des liaisons et leurs répartitions à la surface des céramiques ont été mises en évidence par imagerie Raman. Le repositionnement des échantillons a permis d'obtenir un suivi chimique et spatial de la fonctionnalisation par le VEGF avec une taille de scan à l'échelle cellulaire (Figure 130). En effet, Les images Raman acquises après chaque étape de fonctionnalisation ont confirmé la sélectivité de la chimie : le VEGF se positionne sur les zones occupées par le PEG, ce dernier s'étant fixé sur les zones où l'APTES est majoritairement présent. Si ce schéma est indépendant du substrat, la répartition du silane est elle, fonction de la céramique. En effet l'APTES est présent sur la totalité de la surface scannée des substrats et sous forme d'amas sur la céramique en CHA. Cela peut être dû à une polymérisation de surface dans le cas d'une liaison Si-O-P non établie. De nombreuses questions demeurent sur le type de liaison impliquée dans l'interface silane/céramique, seule une caractérisation par la RMN (résonance magnétique nucléaire) solide du silicium corrélé aux éléments azote et phosphore pourrait apporter les réponses nécessaires à la compréhension de l'interface céramique-silane et donc à l'influence du substrat sur la réaction de silanisation.

Quoi qu'il en soit, l'imagerie Raman a permis de mettre en place un suivi chimique et spatial de la fonctionnalisation de céramiques denses en phosphates de calcium. Cette approche pourra être étendue à d'autres molécules organiques comme par exemple les différents silanes cités précédemment pour une meilleure compréhension du comportement de la silanisation et/ou des protéines impliquées dans différents domaines, telles que la BMP-2 pour son rôle dans l'amélioration et la formation osseuse.

## Conclusion générale

---

Ce travail de thèse avait pour but d'évaluer les interactions physiques et chimiques entre des céramiques phosphocalciques et des protéines d'intérêt, la fibronectine impliquée dans l'adhésion cellulaire et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF (pour *Vascular Endothelial Growth Factor*). Cette étude s'inscrit dans le cadre général du développement d'une nouvelle génération de biocéramiques ostéoinductrices capables d'initier le phénomène de régénération osseuse pour la réparation de larges défauts osseux.

Des céramiques phosphocalciques denses en hydroxyapatite de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , en hydroxyapatite silicatée de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,6}(\text{SiO}_4)_{0,4}(\text{OH})_{1,6}$  et en hydroxyapatite carbonatée de formule  $\text{Ca}_{9,5}(\text{PO}_4)_{5,5}(\text{CO}_3)_{0,5}(\text{OH})_{1,0}(\text{CO}_3)_{0,25}$  ont été élaborées à partir de poudres synthétisées par précipitation en voie aqueuse. Les différentes techniques de caractérisation utilisées (DRX, FTIR, Raman, XPS, BET, MEB, AFM, mesure de densité) ont montré que les céramiques mises en forme par frittage présentaient une seule phase cristalline d'apatite (matériaux monophasés) avec une microstructure dense. Les mesures d'angles de contact et de potentiel zêta ont mis en évidence des surfaces hydrophiles chargées négativement.

Les interactions physiques ont été étudiées par spectroscopie de force entre une pointe AFM fonctionnalisée par de la fibronectine et les céramiques phosphocalciques denses en HA, en SiHA et en CHA. La mise en place des images AFM force-volume a nécessité le contrôle de plusieurs paramètres (la cellule de mesure, le milieu liquide, l'évaporation de l'eau, *etc.*) permettant l'acquisition de données fiables. La spectroscopie de force nous a permis d'imager des forces avec une différenciation des grains et des joints de grains et de combiner l'image AFM force-volume à l'image AFM de la topographie de surface afin de corréliser les forces d'adhésion mesurées aux grains et aux joints de grains.

Les forces d'adhésion de la fibronectine sur des céramiques denses et polies sont assez similaires et mettent en évidence une absence de l'influence de la composition chimique. En revanche, les forces d'adhésion de la fibronectine sur les céramiques denses et non polies en HA, en SiHA et en CHA indiquent une forte adhésion de la fibronectine sur les joints de grains. En revanche, à microstructures proches (HA et SiHA), les forces d'adhésion sont nettement différentes, ce qui implique une influence de la topographie modulée par la composition chimique des céramiques.

L'influence de la composition chimique peut être mise en évidence soit en optimisant les paramètres d'acquisition sur les céramiques polies (augmenter le temps de contact et réduire la taille du scan), soit en fixant la microstructure et en modifiant la chimie de surface (par

exemple traiter thermiquement sous CO<sub>2</sub> une pastille non polie frittée en HA pour induire une carbonatation de surface).

Cette technique d'imagerie par spectroscopie de force a été validée pour la fibronectine et pourrait être appliquée à d'autres biomolécules.

La fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques en HA et en CHA par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) a été effectué selon un protocole multi-étapes. Ce dernier consiste à utiliser des agents intermédiaires : un cross linker (3-aminopropyl-triéthoxysilane-APTES) et un spacer (polyéthylène glycol difonctionnel-SM(PEG)<sub>6</sub>) pour l'immobilisation du VEGF. Les interactions chimiques entre cette protéine et les biocéramiques ont été étudiées étape par étape principalement par imagerie Raman. Grâce à cette technique d'imagerie, le protocole de fonctionnalisation issu de travaux précédents a été modifié et effectué entièrement en milieu anhydre.

La présence des différentes molécules organiques d'APTES, du SM(PEG)<sub>6</sub> et du VEGF a été mise en évidence par imagerie Raman en mettant en avant des réactions préférentielles entre ces différentes molécules. La protéine du VEGF se fixe sur le SM(PEG)<sub>6</sub> ce dernier s'étant préalablement fixé sur l'APTES présent en forte teneur à la surface de la céramique. La sélectivité des réactions visées lors de la mise en place du protocole de fonctionnalisation a donc été validée. Il a également été montré que les deux céramiques génèrent une fonctionnalisation différente à l'étape de la silanisation. La distribution spatiale des molécules organiques est inhomogène et sous forme d'amas sur les céramiques en CHA alors qu'elle est plus homogène et avec de petits agglomérats sur les céramiques en HA. Cette répartition laisse penser à une polymérisation intermoléculaire en surface et ce malgré l'utilisation d'un milieu anhydre, polymérisation favorisée sur CHA. Ces résultats ont été appuyés par spectroscopie des photoélectrons X et par microscopie à force atomique. Tous les résultats obtenus amènent sur le fait que l'étape contrôlant l'immobilisation du VEGF est alors l'étape de silanisation. Une couverture totale de surface par l'APTES en proportions différentes a été mise en évidence par les trois techniques de caractérisations citées ci-dessus. Cependant une grande quantité d'APTES en surface n'est pas souhaitable car elle impliquerait la fixation d'une quantité importante de SM(PEG)<sub>6</sub> et donc l'immobilisation par la suite d'une grande quantité de VEGF. Un excès du VEGF en surface risquerait d'induire des effets indésirables tels que la croissance de cellules cancéreuses en surstimulant le phénomène de l'angiogenèse. D'autres silanes présentant une à deux chaînes éthoxyles pourraient alors être utilisés dans le but de baisser l'apport en silane en surface. Néanmoins, il est nécessaire de tester l'activité biologique du VEGF in vitro en cultivant des cellules endothéliales à la surface du matériau fonctionnalisé, puis en réalisant des tests fonctionnels (analyse de la prolifération, des capacités de migration cellulaire) et des tests phénotypiques (état de différenciation cellulaire).

Cela permettra de vérifier que le VEGF présent à la surface est bien fonctionnel et joue son rôle de facteur de croissance en stimulant l'activité des cellules endothéliales.

En termes de perspectives pour cette partie de travail portant sur le suivi de la fonctionnalisation par le VEGF, une caractérisation de l'interface silane/céramique par RMN (résonance magnétique nucléaire) solide du silicium, de l'azote et du phosphore serait nécessaire à la meilleure compréhension de la silanisation à la surface des deux céramiques.

Les résultats obtenus sur le suivi de la fonctionnalisation par le VEGF par imagerie Raman ont mis en avant que cette technique de caractérisation est très bien adaptée et performante pour l'étude de la fonctionnalisation par de faibles quantités de molécules organiques sans les dégrader et sans être en contact direct avec le substrat fonctionnalisé. Le suivi spatial et chimique mis en évidence par imagerie Raman peut alors être envisagé sur d'autres types de molécules organiques telles que des protéines ou des silanes.

A plus long terme, il pourrait être pertinent de regrouper l'imagerie Raman et la spectroscopie de force pour étudier le comportement de cellules endothéliales à la surface de céramiques fonctionnalisées par le VEGF (Figure 132). En effet, l'imagerie Raman permettrait de caractériser la fonctionnalisation par le VEGF comme cela a été montré dans ces travaux de thèse, et la spectroscopie de force permettrait de mettre en évidence l'influence de la céramique fonctionnalisée par le VEGF sur le comportement mécanique de la cellule.

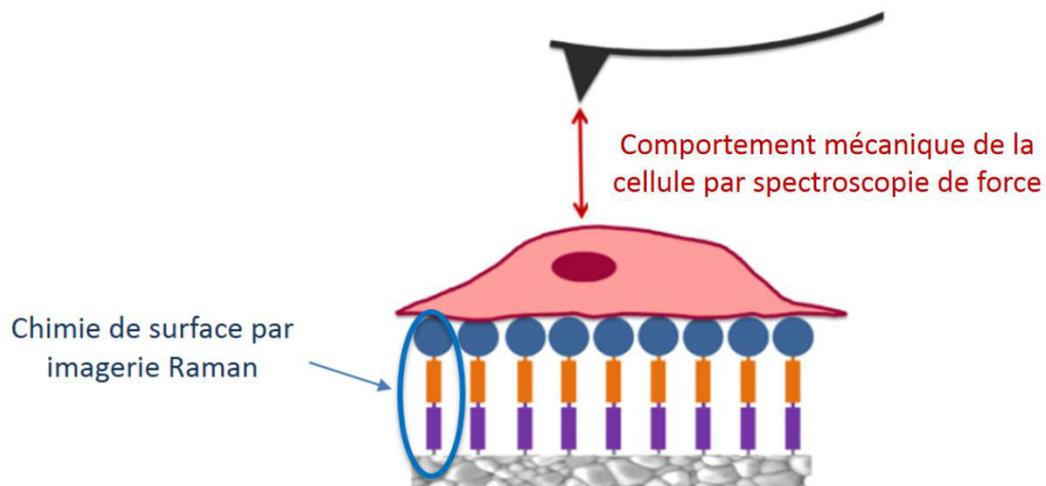


Figure 132 : Schéma illustrant la caractérisation des cellules endothéliales par spectroscopie de force à la surface de céramiques fonctionnalisées par le VEGF et caractérisées par imagerie Raman.



## Références bibliographiques

1. Legros R, Balmain N, Bonel G (1986) Structure and composition of the mineral phase of periosteal bone. *J Chem Res Synop* 8–9
2. Silva HM da, Mateescu M, Ponche A, Damia C, Champion E, Soares G, Anselme K (2010) Surface transformation of silicon-doped hydroxyapatite immersed in culture medium under dynamic and static conditions. *Colloids Surf B Biointerfaces* 75:349–355 . doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.009
3. Carlisle EM (1970) Silicon: a possible factor in bone calcification. *Science* 167:279–280
4. Germaini M-M (2017) Elaboration de céramiques phosphocalciques pour l'ingénierie tissulaire osseuse : étude de l'influence des propriétés physicochimiques des matériaux sur le comportement biologique in vitro. Thèse de doctorat, Université de Limoges
5. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD (2006) The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA* 17:319–336 . doi: 10.1007/s00198-005-2035-9
6. Schmidmaier G, Herrmann S, Green J, Weber T, Scharfenberger A, Haas NP, Wildemann B (2006) Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest, and platelet preparation. *Bone* 39:1156–1163. doi: 10.1016/j.bone.2006.05.023
7. Kawashita M, Hasegawa M, Kudo T, Kanetaka H, Miyazaki T, Hashimoto M (2016) Effect of fibronectin adsorption on osteoblastic cellular responses to hydroxyapatite and alumina. *Mater Sci Eng C* 69:1268–1272. doi: 10.1016/j.msec.2016.08.034
8. Anselme K (2000) Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21:667–681
9. Taton TA (2001) Nanotechnology. Boning up on biology. *Nature* 412:491–492 . doi: 10.1038/35087687
10. Holden JL, Clement JG, Phakey PP (1995) Age and temperature related changes to the ultrastructure and composition of human bone mineral. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 10:1400–1409. doi: 10.1002/jbmr.5650100918
11. Iyengar GV, Tandon L (1999) Minor and trace elements in human bones and teeth. International Atomic Energy Agency
12. Väänänen K (2005) Mechanism of osteoclast mediated bone resorption—rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 57:959–971. doi: 10.1016/j.addr.2004.12.018
13. Kartsogiannis V, Ng KW (2004) Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol* 228:79–102. doi: 10.1016/j.mce.2003.06.002
14. Annaz B, Hing KA, Kayser M, Buckland T, Di Silvio L (2004) An ultrastructural study of cellular response to variation in porosity in phase-pure hydroxyapatite. *J Microsc* 216:97–109 . doi: 10.1111/j.0022-2720.2004.01403.x
15. Matsuo K, Irie N (2008) Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 473:201–209 . doi: 10.1016/j.abb.2008.03.027

16. Detsch R, Boccaccini AR (2015) The role of osteoclasts in bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 9:1133–1149. doi: 10.1002/term.1851
17. Alliston T, Choy L, Ducey P, Karsenty G, Derynck R (2001) TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J* 20:2254–2272. doi: 10.1093/emboj/20.9.2254
18. Anderson HC (1995) Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop* 266–280
19. Rico M, Khurana J, Safadi F Bone Structure, Development and Bone Biology. *Bone Pathol*
20. Orimo H (2010) The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch Nippon Ika Daigaku Zasshi* 77:4–12
21. Barré R (2012) étude du rôle des récepteurs couplés aux protéines G lors de la différenciation cellulaire des ostéoblastes : intérêt de la voie Gi. Thèse de doctorat, Université de Toulouse
22. Bonewald LF, Mundy GR (1989) Role of transforming growth factor beta in bone remodeling: a review. *Connect Tissue Res* 23:201–208
23. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ (1996) Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 19:1S-12S
24. Chen D, Harris MA, Rossini G, Dunstan CR, Dallas SL, Feng JQ, Mundy GR, Harris SE (1997) Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 60:283–290
25. Yamaguchi A, Komori T, Suda T (2000) Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 21:393–411 . doi: 10.1210/edrv.21.4.0403
26. Curtis CD, Davis RB, Ingram KG, Griffin CT (2012) Chromatin-remodeling complex specificity and embryonic vascular development. *Cell Mol Life Sci CMLS* 69:3921–3931 . doi: 10.1007/s00018-012-1023-4
27. Aird WC (2007) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 100:158–173. doi: 10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a
28. DESROCHES-CASTAN A (2014) Inhibition de l'angiogenèse tumorale criblage d'une chimiothèque et caractérisation d'un nouveau composé agissant sur la voie de signalisation Ras-ERK. Thèse de doctorat, Université de Grenoble
29. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C (2003) VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161:1163–1177. doi: 10.1083/jcb.200302047
30. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR (2006) Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27:3413–3431. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.039
31. LeGeros RZ (2002) Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop* 81–98

32. Bohner M (2010) Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. *Mater Today* 13:24–30 . doi: 10.1016/S1369-7021(10)70014-6
33. Dorozhkin SV (2010) Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* 31:1465–1485 . doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.050
34. Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS (2013) Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater* 9:8037–8045. doi: 10.1016/j.actbio.2013.06.014
35. Champion E, Damia C, Viana M, Beaubrun-Giry K, Drouet C, Grossin D (2013) Elaboration de biocéramiques phosphocalciques. *MATEC Web Conf* 7:04010. doi: 10.1051/mateconf/20130704010
36. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemin G (2000) Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 18:959–963. doi: 10.1038/79449
37. Kay MI, Young RA (1964) Crystal Structure of Hydroxyapatite. *Nature* 204:1050–1052. doi: 10.1038/2041050a0
38. Tomoda K, Ariizumi H, Nakaji T, Makino K (2010) Hydroxyapatite particles as drug carriers for proteins. *Colloids Surf B Biointerfaces* 76:226–235. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.10.039
39. Tagaya M, Ikoma T, Hanagata N, Yoshioka T, Tanaka J (2011) Competitive adsorption of fibronectin and albumin on hydroxyapatite nanocrystals. *Sci Technol Adv Mater* 12:034411 . doi: 10.1088/1468-6996/12/3/034411
40. Kilpadi KL, Chang PL, Bellis SL (2001) Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *J Biomed Mater Res* 57:258–267
41. Moursi AM, Winnard AV, Winnard PL, Lannutti JJ, Seghi RR (2002) Enhanced osteoblast response to a polymethylmethacrylate-hydroxyapatite composite. *Biomaterials* 23:133–144. doi: 10.1016/S0142-9612(01)00088-6
42. Ramires PA, Romito A, Cosentino F, Milella E (2001) The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour. *Biomaterials* 22:1467–1474
43. Lafon JP (2004) Synthèse, stabilité thermique et frittage d'hydroxyapatites carbonatées. Thèse de doctorat, Université de Limoges
44. Gibson IR, Best SM, Bonfield W (1999) Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 44:422–428. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(19990315)44:4<422::AID-JBM8>3.0.CO;2-#
45. Palard M (2007) Synthèse et frittage d'hydroxyapatites phosphocalciques silicatées. Thèse de doctorat, Université Limoges
46. Shepherd JH, Shepherd DV, Best SM (2012) Substituted hydroxyapatites for bone repair. *J Mater Sci Mater Med* 23:2335–2347. doi: 10.1007/s10856-012-4598-2
47. Schwarz K, Milne DB (1972) Growth-promoting effects of silicon in rats. *Nature* 239:333–334

48. Carlisle EM (1972) Silicon: an essential element for the chick. *Science* 178:619–621
49. Carlisle EM (1980) Biochemical and morphological changes associated with long bone abnormalities in silicon deficiency. *J Nutr* 110:1046–1056
50. Jugdaohsingh R, Tucker KL, Qiao N, Cupples LA, Kiel DP, Powell JJ (2004) Dietary silicon intake is positively associated with bone mineral density in men and premenopausal women of the Framingham Offspring cohort. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 19:297–307. doi: 10.1359/JBMR.0301225
51. Nielsen FH, Poellot R (2004) Dietary silicon affects bone turnover differently in ovariectomized and sham-operated growing rats. *J Trace Elem Exp Med* 17:137–149 . doi: 10.1002/jtra.20004
52. Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HFJ, Evans B a. J, Thompson RPH, Powell JJ, Hampson GN (2003) Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 32:127–135
53. Botelho CM, Brooks RA, Best SM, Lopes MA, Santos JD, Rushton N, Bonfield W (2006) Human osteoblast response to silicon-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A* 79:723–730 . doi: 10.1002/jbm.a.30806
54. Lehmann G, Cacciotti I, Palmero P, Montanaro L, Bianco A, Luisa Campagnolo, Camaioni A (2012) Differentiation of osteoblast and osteoclast precursors on pure and silicon-substituted synthesized hydroxyapatites. *Biomed Mater* 7:055001. doi: 10.1088/1748-6041/7/5/055001
55. Kim SR, Lee JH, Kim YT, Riu DH, Jung SJ, Lee YJ, Chung SC, Kim YH (2003) Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors. *Biomaterials* 24:1389–1398
56. Vallet-Regí M, Arcos D (2005) Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants. *J Mater Chem* 15:1509–1516. doi: 10.1039/B414143A
57. Marchat D, Zymelka M, Coelho C, Gremillard L, Joly-Pottuz L, Babonneau F, Esnouf C, Chevalier J, Bernache-Assollant D (2013) Accurate characterization of pure silicon-substituted hydroxyapatite powders synthesized by a new precipitation route. *Acta Biomater* 9:6992–7004. doi: 10.1016/j.actbio.2013.03.011
58. Palard M, Champion E, Foucaud S (2008) Synthesis of silicated hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6-x(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_2-x$ . *J Solid State Chem* 181:1950–1960. doi: 10.1016/j.jssc.2008.04.027
59. Arcos D, Rodríguez-Carvajal J, Vallet-Regí M (2004) The effect of the silicon incorporation on the hydroxylapatite structure. A neutron diffraction study. *Solid State Sci* 6:987–994 . doi: 10.1016/j.solidstatesciences.2004.05.001
60. Tang XL, Xiao XF, Liu RF (2005) Structural characterization of silicon-substituted hydroxyapatite synthesized by a hydrothermal method. *Mater Lett* 59:3841–3846. doi: 10.1016/j.matlet.2005.06.060
61. Balas F, Pérez-Pariente J, Vallet-Regí M (2003) In vitro bioactivity of silicon-substituted hydroxyapatites. *J Biomed Mater Res A* 66A:364–375. doi: 10.1002/jbm.a.10579

62. Palard M, Combes J, Champion E, Foucaud S, Rattner A, Bernache-Assollant D (2009) Effect of silicon content on the sintering and biological behaviour of  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})(2\text{-x})$  ceramics. *Acta Biomater* 5:1223–1232. doi: 10.1016/j.actbio.2008.10.016
63. Thian ES, Huang J, Vickers ME, Best SM, Barber ZH, Bonfield W (2006) Silicon-substituted hydroxyapatite (SiHA): A novel calcium phosphate coating for biomedical applications. *J Mater Sci* 41:709–717. doi: 10.1007/s10853-006-6489-8
64. Patel N, Best SM, Bonfield W, Gibson IR, Hing KA, Damien E, Revell PA (2002) A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules. *J Mater Sci Mater Med* 13:1199–1206
65. Porter AE, Patel N, Skepper JN, Best SM, Bonfield W (2004) Effect of sintered silicate-substituted hydroxyapatite on remodelling processes at the bone-implant interface. *Biomaterials* 25:3303–3314. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.006
66. Porter AE, Botelho CM, Lopes MA, Santos JD, Best SM, Bonfield W (2004) Ultrastructural comparison of dissolution and apatite precipitation on hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A* 69:670–679. doi: 10.1002/jbm.a.30035
67. Bohner M (2009) Silicon-substituted calcium phosphates - a critical view. *Biomaterials* 30:6403–6406. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.007
68. Gasquères G, Bonhomme C, Maquet J, Babonneau F, Hayakawa S, Kanaya T, Osaka A (2008) Revisiting silicate substituted hydroxyapatite by solid-state NMR. *Magn Reson Chem MRC* 46:342–346. doi: 10.1002/mrc.2109
69. Hjezi Z (2015) Biocéramiques phosphocalciques fonctionnalisées: étude de la silanisation de surface. Thèse de doctorat, Université de Limoges
70. Damia C, Marchat D, Lemoine C, Douard N, Chaleix V, Sol V, Larochette N, Logeart D, Brie J, Champion E (2018) Functionalization of phosphocalcic bioceramics for bone repair applications. *Mater Sci Eng C*. doi: 10.1016/j.msec.2018.01.008
71. LeGeros RZ, Trautz OR, Klein E, LeGeros JP (1969) Two types of carbonate substitution in the apatite structure. *Experientia* 25:5–7
72. Rey C, Collins B, Goehl T, Dickson IR, Glimcher MJ (1989) The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Calcif Tissue Int* 45:157–164
73. Elliott JC (1994) *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, 1 edition. Elsevier Science
74. Bonel G (1972) Contribution à l'étude de la carbonatation des apatites-1-Synthèse et étude des propriétés physico-chimiques des apatites carbonatées du type A. In: *Ann. Chim* 7. pp 65–88
75. Labarthe J., Bonel G, Montel G (1973) Sur la structure et les propriétés des apatites carbonatées de type B phospho-calciques. In: *Ann. Chim* 8. pp 289–301
76. Vignoles M, Bonel G, Young RA (1987) Occurrence of nitrogenous species in precipitated B-type carbonated hydroxyapatites. *Calcif Tissue Int* 40:64–70. doi: 10.1007/BF02555707

77. Lafon JP, Champion E, Bernache-Assollant D (2008) Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6-x(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x-2y}(\text{CO}_3)_y$  ceramics with controlled composition. *J Eur Ceram Soc* 28:139–147. doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2007.06.009
78. Doi Y, Shibutani T, Moriwaki Y, Kajimoto T, Iwayama Y (1998) Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes. *J Biomed Mater Res* 39:603–610
79. Tadic D, Peters F, Epple M (2002) Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites. *Biomaterials* 23:2553–2559
80. Landi E, Celotti G, Logroscino G, Tampieri A (2003) Carbonated Hydroxyapatite as Bone Substitute. *J Eur Ceram Soc - J EUR CERAM SOC* 23:2931–2937. doi: 10.1016/S0955-2219(03)00304-2
81. Spence G, Patel N, Brooks R, Bonfield W, Rushton N (2010) Osteoclastogenesis on hydroxyapatite ceramics: the effect of carbonate substitution. *J Biomed Mater Res A* 92:1292–1300 . doi: 10.1002/jbm.a.32373
82. Germaini M-M, Detsch R, Grünwald A, Magnaudeix A, Lalloue F, Boccaccini AR, Champion E (2017) Osteoblast and osteoclast responses to A/B type carbonate-substituted hydroxyapatite ceramics for bone regeneration. *Biomed Mater Bristol Engl* 12:035008 . doi: 10.1088/1748-605X/aa69c3
83. Pieters IY, Van N den V, Declercq HA, Cornelissen MJ, Verbeeck RM (2010) Carbonated apatites obtained by the hydrolysis of monetite: influence of carbonate content on adhesion and proliferation of MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Acta Biomater* 6:1561–1568 . doi: 10.1016/j.actbio.2009.11.002
84. Rupani A, Hidalgo-Bastida LA, Rutten F, Dent A, Turner I, Cartmell S (2012) Osteoblast activity on carbonated hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A* 100:1089–1096. doi: 10.1002/jbm.a.34037
85. P. Ducheyne et coll (1992) Bone bonding biomaterials. *Reed Healthc Commun*
86. Rouahi M, Champion E, Gallet O, Jada A, Anselme K (2006) Physico-chemical characteristics and protein adsorption potential of hydroxyapatite particles: influence on in vitro biocompatibility of ceramics after sintering. *Colloids Surf B Biointerfaces* 47:10–19 . doi: 10.1016/j.colsurfb.2005.11.015
87. Rouahi M, Gallet O, Champion E, Dentzer J, Hardouin P, Anselme K (2006) Influence of hydroxyapatite microstructure on human bone cell response. *J Biomed Mater Res A* 78:222–235 . doi: 10.1002/jbm.a.30682
88. El-Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM (1999) Effect of serum proteins on osteoblast adhesion to surface-modified bioactive glass and hydroxyapatite. *J Orthop Res* 17:340–345 . doi: 10.1002/jor.1100170307
89. Koutsopoulos S, Dalas E (2000) The effect of acidic amino acids on hydroxyapatite crystallization. *J Cryst Growth* 217:410–415. doi: 10.1016/S0022-0248(00)00502-9
90. Garnett J, Dieppe P (1990) The effects of serum and human albumin on calcium hydroxyapatite crystal growth. *Biochem J* 266:863–868
91. Combes C, Rey C (2002) Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity. *Biomaterials* 23:2817–2823. doi: 10.1016/S0142-9612(02)00073-X

92. Hunter GK, Goldberg HA (1994) Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem J* 302 ( Pt 1):175–179
93. Harris NL, Rattray KR, Tye CE, Underhill TM, Somerman MJ, D'Errico JA, Chambers AF, Hunter GK, Goldberg HA (2000) Functional analysis of bone sialoprotein: identification of the hydroxyapatite-nucleating and cell-binding domains by recombinant peptide expression and site-directed mutagenesis. *Bone* 27:795–802
94. Matsumoto T, Okazaki M, Inoue M, Hamada Y, Taira M, Takahashi J (2002) Crystallinity and solubility characteristics of hydroxyapatite adsorbed amino acid. *Biomaterials* 23:2241–2247
95. Tavafoghi M, Cerruti M (2016) The role of amino acids in hydroxyapatite mineralization. *J R Soc Interface* 13. doi: 10.1098/rsif.2016.0462
96. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA (1996) Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 317 ( Pt 1):59–64
97. Rosengren A, Pavlovic E, Oscarsson S, Krajewski A, Ravaglioli A, Piancastelli A (2002) Plasma protein adsorption on characterized ceramic biomaterials. *Biomaterials* 23:1237–47 . doi: 10.1016/S0142-9612(01)00244-7
98. Shaw WJ, Ferris K (2008) Structure, orientation, and dynamics of the C-terminal hexapeptide of LRAP determined using solid-state NMR. *J Phys Chem B* 112:16975–16981
99. Pellenc D (2005) Auto-assemblage de la fibronectine induit par l'adsorption caractérisation expérimentale sur l'hydroxyapatite et étude par simulation numérique. Thèse de doctorat, Université Cergy-Pontoise
100. Dalby MJ, Di Silvio L, Harper EJ, Bonfield W (2001) Initial interaction of osteoblasts with the surface of a hydroxyapatite-poly(methylmethacrylate) cement. *Biomaterials* 22:1739–1747
101. Lin L, Chow KL, Leng Y (2009) Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* 89:326–335 . doi: 10.1002/jbm.a.31994
102. Müller P, Bulnheim U, Diener A, Lüthen F, Teller M, Klinkenberg E-D, Neumann H-G, Nebe B, Liebold A, Steinhoff G, Rychly J (2008) Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* 12:281–291. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00103.x
103. Capuccini C, Torricelli P, Sima F, Boanini E, Ristoscu C, Bracci B, Socol G, Fini M, Mihailescu IN, Bigi A (2008) Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: in vitro osteoblast and osteoclast response. *Acta Biomater* 4:1885–1893. doi: 10.1016/j.actbio.2008.05.005
104. Navarro M, Engel E, Planell JA, Amaral I, Barbosa M, Ginebra MP (2008) Surface characterization and cell response of a PLA/CaP glass biodegradable composite material. *J Biomed Mater Res A* 85:477–486. doi: 10.1002/jbm.a.31546

105. Park J-W, Suh J-Y, Chung H-J (2008) Effects of calcium ion incorporation on osteoblast gene expression in MC3T3-E1 cells cultured on microstructured titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A* 86:117–126. doi: 10.1002/jbm.a.31618
106. Lim JY, Dreiss AD, Zhou Z, Hansen JC, Siedlecki CA, Hengstebeck RW, Cheng J, Winograd N, Donahue HJ (2007) The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography. *Biomaterials* 28:1787–1797. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.12.020
107. Karageorgiou V, Kaplan D (2005) Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26:5474–5491. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002
108. Lasgorceix M (2014) Mise en forme par microstéréolithographie et frittage de céramiques macro-micro-poreuses en hydroxyapatite silicatée et évaluation biologique. Thèse de doctorat, Université de Limoges
109. Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH (1995) Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:549–599 . doi: 10.1146/annurev.cb.11.110195.003001
110. Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD (2001) Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 153:1175–1186
111. Beningo KA, Dembo M, Kaverina I, Small JV, Wang YL (2001) Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J Cell Biol* 153:881–888
112. Cairns ML, Meenan BJ, Burke GA, Boyd AR (2010) Influence of surface topography on osteoblast response to fibronectin coated calcium phosphate thin films. *Colloids Surf B Biointerfaces* 78:283–290. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.03.013
113. Pompe T, Glorius S, Bischoff T, Uhlmann I, Kaufmann M, Brenner S, Werner C (2009) Dissecting the impact of matrix anchorage and elasticity in cell adhesion. *Biophys J* 97:2154–2163. doi: 10.1016/j.bpj.2009.07.047
114. Han SJ, Bielawski KS, Ting LH, Rodriguez ML, Sniadecki NJ (2012) Decoupling substrate stiffness, spread area, and micropost density: a close spatial relationship between traction forces and focal adhesions. *Biophys J* 103:640–648. doi: 10.1016/j.bpj.2012.07.023
115. Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM (1998) Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell* 9:1863–1871
116. Sinha RK, Tuan RS (1996) Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone* 18:451–457
117. Ruoslahti E (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:697–715. doi: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.697
118. Damsky CH, Ilić D (2002) Integrin signaling: it's where the action is. *Curr Opin Cell Biol* 14:594–602
119. Grzesik WJ (1997) Integrins and bone--cell adhesion and beyond. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 45:271–275

120. Jarcho M (1981) Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop* 259–278
121. Habibovic P, de Groot K (2007) Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med* 1:25–32. doi: 10.1002/term.5
122. Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Sees TM, van Blitterswijk CA, de Groot K (2006) Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthotopic defect. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 24:867–876. doi: 10.1002/jor.20115
123. Saito N, Takaoka K (2003) New synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering. *Biomaterials* 24:2287–2293
124. Cunningham NS, Paralkar V, Reddi AH (1992) Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11740–11744
125. Kanczler JM, Ginty PJ, White L, Clarke NMP, Howdle SM, Shakesheff KM, Oreffo ROC (2010) The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials* 31:1242–1250. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.059
126. Lin Y, Yao J, Yang X, Tian W, Liu L (2008) Surface modification with fibronectin or collagen to improve the cell adhesion. *Appl Surf Sci* 255:459–461. doi: 10.1016/j.apsusc.2008.06.105
127. Stephansson SN, Byers BA, García AJ (2002) Enhanced expression of the osteoblastic phenotype on substrates that modulate fibronectin conformation and integrin receptor binding. *Biomaterials* 23:2527–2534
128. Schneider GB, Zaharias R, Stanford C (2001) Osteoblast integrin adhesion and signaling regulate mineralization. *J Dent Res* 80:1540–1544. doi: 10.1177/00220345010800061201
129. Bergkvist M, Carlsson J, Oscarsson S (2003) Surface-dependent conformations of human plasma fibronectin adsorbed to silica, mica, and hydrophobic surfaces, studied with use of Atomic Force Microscopy. *J Biomed Mater Res A* 64:349–356. doi: 10.1002/jbm.a.10423
130. Barbucci R, Magnani A, Chiumiento A, Pasqui D, Cangioli I, Lamponi S (2005) Fibroblast cell behavior on bound and adsorbed fibronectin onto hyaluronan and sulfated hyaluronan substrates. *Biomacromolecules* 6:638–645. doi: 10.1021/bm049642v
131. Iuliano DJ, Saavedra SS, Truskey GA (1993) Effect of the conformation and orientation of adsorbed fibronectin on endothelial cell spreading and the strength of adhesion. *J Biomed Mater Res* 27:1103–1113. doi: 10.1002/jbm.820270816
132. Velzenberger E (2008) Validations biologiques et physico chimiques d'un revêtement cellulosique de boîtes pour cultures cellulaires bioactives. Thèse de doctorat, Université de technologie Compiègne
133. Chiu LLY, Radisic M (2010) Scaffolds with covalently immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues. *Biomaterials* 31:226–241. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.039

134. Sharon JL, Puleo DA (2008) Immobilization of glycoproteins, such as VEGF, on biodegradable substrates. *Acta Biomater* 4:1016–1023. doi: 10.1016/j.actbio.2008.02.017
135. Wernike E, Montjovent M-O, Liu Y, Wismeijer D, Hunziker EB, Siebenrock K-A, Hofstetter W, Klenke FM (2010) VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation in vivo. *Eur Cell Mater* 19:30–40
136. Muller YA, Christinger HW, Keyt BA, de Vos AM (1997) The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure* 5:1325–1338. doi: 10.1016/S0969-2126(97)00284-0
137. Hench LL, Polak JM (2002) Third-generation biomedical materials. *Science* 295:1014–1017. doi: 10.1126/science.1067404
138. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Pearcy MJ (2005) Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng* 11:1–18. doi: 10.1089/ten.2005.11.1
139. Nakanishi K, Sakiyama T, Imamura K (2001) On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J Biosci Bioeng* 91:233–244. doi: 10.1016/S1389-1723(01)80127-4
140. Lee W-H, Loo C-Y, Rohanizadeh R (2014) A review of chemical surface modification of bioceramics: Effects on protein adsorption and cellular response. *Colloids Surf B Biointerfaces* 122:823–834. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.07.029
141. Wang K, Zhou C, Hong Y, Zhang X (2012) A review of protein adsorption on bioceramics. *Interface Focus* 2:259–277. doi: 10.1098/rsfs.2012.0012
142. Elangovan S, Margolis HC, Oppenheim FG, Beniash E (2007) Conformational changes in salivary proline-rich protein 1 upon adsorption to calcium phosphate crystals. *Langmuir ACS J Surf Colloids* 23:11200–11205. doi: 10.1021/la7013978
143. Mavropoulos E, Costa AM, Costa LT, Achete CA, Mello A, Granjeiro JM, Rossi AM (2011) Adsorption and bioactivity studies of albumin onto hydroxyapatite surface. *Colloids Surf B Biointerfaces* 83:1–9. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.10.025
144. Zeng H, Chittur KK, Lacefield WR (1999) Analysis of bovine serum albumin adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces. *Biomaterials* 20:377–384. doi: 10.1016/S0142-9612(98)00184-7
145. Xu T, Fu R, Yan L (2003) A new insight into the adsorption of bovine serum albumin onto porous polyethylene membrane by zeta potential measurements, FTIR analyses, and AFM observations. *J Colloid Interface Sci* 262:342–350. doi: 10.1016/S0021-9797(03)00208-X
146. Sharma S, Berne BJ, Kumar SK (2010) Thermal and Structural Stability of Adsorbed Proteins. *Biophys J* 99:1157–1165. doi: 10.1016/j.bpj.2010.05.030
147. Ribeiro N, Sousa SR, Monteiro FJ (2010) Influence of crystallite size of nanophased hydroxyapatite on fibronectin and osteonectin adsorption and on MC3T3-E1 osteoblast adhesion and morphology. *J Colloid Interface Sci* 351:398–406. doi: 10.1016/j.jcis.2010.08.013

148. Midy V, Hollande E, Rey C, Dard M, Plouët J (2001) Adsorption of vascular endothelial growth factor to two different apatitic materials and its release. *J Mater Sci Mater Med* 12:293–298
149. Lode A, Wolf-Brandstetter C, Reinstorf A, Bernhardt A, König U, Pompe W, Gelinsky M (2007) Calcium phosphate bone cements, functionalized with VEGF: release kinetics and biological activity. *J Biomed Mater Res A* 81:474–483. doi: 10.1002/jbm.a.31024
150. Poh CK, Ng S, Lim TY, Tan HC, Loo J, Wang W (2012) In vitro characterizations of mesoporous hydroxyapatite as a controlled release delivery device for VEGF in orthopedic applications. *J Biomed Mater Res A* 100:3143–3150. doi: 10.1002/jbm.a.34252
151. Poh CK, Shi Z, Lim TY, Neoh KG, Wang W (2010) The effect of VEGF functionalization of titanium on endothelial cells in vitro. *Biomaterials* 31:1578–1585. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.042
152. Kozlova D, Chernousova S, Knuschke T, Buer J, Westendorf AM, Epple M (2011) Cell targeting by antibody-functionalized calcium phosphate nanoparticles. *J Mater Chem* 22:396–404. doi: 10.1039/C1JM14683A
153. Comas H, Laporte V, Borcard F, Miéville P, Krauss Juillerat F, Caporini MA, Gonzenbach UT, Juillerat-Jeanneret L, Gerber-Lemaire S (2012) Surface functionalization of alumina ceramic foams with organic ligands. *ACS Appl Mater Interfaces* 4:573–576. doi: 10.1021/am201638a
154. Zurlinden K, Laub M, Jennissen H (2005) Chemical Functionalization of a Hydroxyapatite Based Bone Replacement Material for the Immobilization of Proteins. *Mater Werkst* 36:820–827. doi: 10.1002/mawe.200500978
155. Treccani L, Yvonne Klein T, Meder F, Pardun K, Rezwan K (2013) Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications. *Acta Biomater* 9:7115–7150. doi: 10.1016/j.actbio.2013.03.036
156. Michelot A, Sarda S, Audin C, Deydier E, Manoury E, Poli R, Rey C (2015) Spectroscopic characterisation of hydroxyapatite and nanocrystalline apatite with grafted aminopropyltriethoxysilane: nature of silane–surface interaction. *J Mater Sci* 50:5746–5757. doi: 10.1007/s10853-015-9122-x
157. Pei J, Hall H, Spencer ND (2011) The role of plasma proteins in cell adhesion to PEG surface-density-gradient-modified titanium oxide. *Biomaterials* 32:8968–8978. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.034
158. Cauda V, Schlossbauer A, Bein T (2010) Bio-degradation study of colloidal mesoporous silica nanoparticles: Effect of surface functionalization with organo-silanes and poly(ethylene glycol). *Microporous Mesoporous Mater* 132:60–71. doi: 10.1016/j.micromeso.2009.11.015
159. Kohler N, Fryxell GE, Zhang M (2004) A bifunctional poly(ethylene glycol) silane immobilized on metallic oxide-based nanoparticles for conjugation with cell targeting agents. *J Am Chem Soc* 126:7206–7211. doi: 10.1021/ja049195r
160. Popat KC, Mor G, Grimes CA, Desai TA (2004) Surface modification of nanoporous alumina surfaces with poly(ethylene glycol). *Langmuir ACS J Surf Colloids* 20:8035–8041. doi: 10.1021/la049075x

161. Mohapatra S, Pramanik P (2009) Synthesis and stability of functionalized iron oxide nanoparticles using organophosphorus coupling agents. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp* 339:35–42. doi: 10.1016/j.colsurfa.2009.01.009
162. Mutin PH, Guerrero G, Vioux A (2003) Organic–inorganic hybrid materials based on organophosphorus coupling molecules: from metal phosphonates to surface modification of oxides. *Comptes Rendus Chim* 6:1153–1164. doi: 10.1016/j.crci.2003.07.006
163. Plueddemann EP (1991) *Silane Coupling Agents*, 2nd ed. Springer US
164. Durrieu MC, Pallu S, Guillemot F, Bareille R, Amédée J, Baquey CH, Labrugère C, Dard M (2004) Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion. *J Mater Sci Mater Med* 15:779–786
165. Porté-Durrieu MC, Guillemot F, Pallu S, Labrugère C, Brouillaud B, Bareille R, Amédée J, Barthe N, Dard M, Baquey C (2004) Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti–6Al–4V: physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion. *Biomaterials* 25:4837–4846. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.11.037
166. Porté-Durrieu MC, Labrugère C, Villars F, Lefebvre F, Dutoya S, Guette A, Bordenave L, Baquey C (1999) Development of RGD peptides grafted onto silica surfaces: XPS characterization and human endothelial cell interactions. *J Biomed Mater Res* 46:368–375
167. Meder F, Wehling J, Fink A, Piel B, Li K, Frank K, Rosenauer A, Treccani L, Koeppen S, Dotzauer A, Rezwani K (2013) The role of surface functionalization of colloidal alumina particles on their controlled interactions with viruses. *Biomaterials* 34:4203–4213. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.02.059
168. Tarafdar A, Pramanik P (2006) Synthesis of amino-functionalized mesoporous silica–zirconia mixed oxide using sodium silicate and zirconium carbonate complex. *Microporous Mesoporous Mater* 91:221–224. doi: 10.1016/j.micromeso.2005.11.045
169. Wang V, Misra G, Amsden B (2008) Immobilization of a bone and cartilage stimulating peptide to a synthetic bone graft. *J Mater Sci Mater Med* 19:2145–2155. doi: 10.1007/s10856-007-3306-0
170. Balasundaram G, Sato M, Webster TJ (2006) Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials* 27:2798–2805. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.12.008
171. Poli E, Chaleix V, Damia C, Hjezi Z, Champion E, Sol V (2014) Efficient quantification of primary amine functions grafted onto apatite ceramics by using two UV-Vis spectrophotometric methods. *Anal Methods* 6:9622–9627. doi: 10.1039/C4AY02012J
172. Swan EEL, Popat KC, Desai TA (2005) Peptide-immobilized nanoporous alumina membranes for enhanced osteoblast adhesion. *Biomaterials* 26:1969–1976. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.001
173. Boehmler J, Ploux L, Vincent B, Anselme K, Ponche A (2011) Necessity of a Thorough Characterization of Functionalized Silicon Wafers before Biointerface Studies. *J Phys Chem C* 115:11102–11111. doi: 10.1021/jp201377n

174. Rixman MA, Dean D, Macias CE, Ortiz C (2003) Nanoscale Intermolecular Interactions between Human Serum Albumin and Alkanethiol Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* 19:6202–6218. doi: 10.1021/la026551f
175. Can K, Ozmen M, Ersoz M (2009) Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization. *Colloids Surf B Biointerfaces* 71:154–159. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.01.021
176. Kim W-J, Kim S, Lee BS, Kim A, Ah CS, Huh C, Sung GY, Yun WS (2009) Enhanced protein immobilization efficiency on a TiO<sub>2</sub> surface modified with a hydroxyl functional group. *Langmuir ACS J Surf Colloids* 25:11692–11697. doi: 10.1021/la901615e
177. Stamov DR, Khoa Nguyen TA, Evans HM, Pfohl T, Werner C, Pompe T (2011) The impact of heparin intercalation at specific binding sites in telopeptide-free collagen type I fibrils. *Biomaterials* 32:7444–7453. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.031
178. Schuessele A, Mayr H, Tessmar J, Goepferich A (2009) Enhanced bone morphogenetic protein-2 performance on hydroxyapatite ceramic surfaces. *J Biomed Mater Res A* 90:959–971. doi: 10.1002/jbm.a.31745
179. Cheng K, Blumen SR, MacPherson MB, Steinbacher JL, Mossman BT, Landry CC (2010) Enhanced uptake of porous silica microparticles by bifunctional surface modification with a targeting antibody and a biocompatible polymer. *ACS Appl Mater Interfaces* 2:2489–2495. doi: 10.1021/am100530t
180. Hyndman D, Flynn TG, Lever G, Burrell R (1992) Protein immobilization to alumina supports: I. Characterization of alumina-organophosphate ligand interactions and use in the attachment of papain. *Biotechnol Bioeng* 40:1319–1327. doi: 10.1002/bit.260401105
181. Jain P, Sun L, Dai J, Baker GL, Bruening ML (2007) High-capacity purification of His-tagged proteins by affinity membranes containing functionalized polymer brushes. *Biomacromolecules* 8:3102–3107. doi: 10.1021/bm700515m
182. Goonasekera CS, Jack KS, Bhakta G, Rai B, Luong-Van E, Nurcombe V, Cool SM, Cooper-White JJ, Grøndahl L (2015) Mode of heparin attachment to nanocrystalline hydroxyapatite affects its interaction with bone morphogenetic protein-2. *Biointerphases* 10:04A308. doi: 10.1116/1.4933109
183. Nelson M, Balasundaram G, Webster TJ (2006) Increased osteoblast adhesion on nanoparticulate crystalline hydroxyapatite functionalized with KRSR. *Int J Nanomedicine* 1:339–349
184. Stone D, Phaneuf M, Sivamurthy N, LoGerfo FW, Quist WC (2002) A biologically active VEGF construct in vitro: implications for bioengineering-improved prosthetic vascular grafts. *J Biomed Mater Res* 59:160–165
185. Brewer CF, Riehm JP (1967) Evidence for possible nonspecific reactions between N-ethylmaleimide and proteins. *Anal Biochem* 18:248–255. doi: 10.1016/0003-2697(67)90007-3
186. Kuznetsova TG, Starodubtseva MN, Yegorenkov NI, Chizhik SA, Zhdanov RI (2007) Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron* 38:824–833. doi: 10.1016/j.micron.2007.06.011

187. Rotsch C, Radmacher M (2000) Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophys J* 78:520–535
188. Kedrov A, Janovjak H, Ziegler C, Kuhlbrandt W, Muller DJ (2006) Observing folding pathways and kinetics of a single sodium-proton antiporter from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 355:2–8. doi: 10.1016/j.jmb.2005.10.028
189. Müller D, Engel A (2002) Conformations, flexibility, and interactions observed on individual membrane proteins by atomic force microscopy. *Methods Cell Biol* 68:257–99
190. Benoit M, Gabriel D, Gerisch G, Gaub HE (2000) Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nat Cell Biol* 2:313–317. doi: 10.1038/35014000
191. Beaussart A, El-Kirat-Chatel S, Sullan RM, Alsteens D, Herman-Bausier P, Derclaye S, F Dufrêne Y (2014) Quantifying the forces guiding microbial cell adhesion using single-cell force spectroscopy. *Nat Protoc* 9:1049–55. doi: 10.1038/nprot.2014.066
192. Taubenberger AV, Hutmacher DW, Muller DJ (2014) Single-cell force spectroscopy, an emerging tool to quantify cell adhesion to biomaterials. *Tissue Eng Part B Rev* 20:40–55. doi: 10.1089/ten.TEB.2013.0125
193. Gelmi A, Higgins MJ, Wallace GG (2013) Quantifying fibronectin adhesion with nanoscale spatial resolution on glycosaminoglycan doped polypyrrole using Atomic Force Microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1830:4305–4313. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.03.005
194. Pietak AM, Sayer M (2006) Functional atomic force microscopy investigation of osteopontin affinity for silicon stabilized tricalcium phosphate bioceramic surfaces. *Biomaterials* 27:3–14. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.093
195. Dupont C, Jacquemart I (2003) Patterned collagen layers on polystyrene: Direct probing using AFM in the adhesion mapping mode. *Surf Sci - Surf SCI* 539:145–154. doi: 10.1016/S0039-6028(03)00779-9
196. Agapov RL, Robbins J, Thomas R, Hardman DL, Foster MD (2013) The effect of fluorosurfactant, copolymer latex, and cross-linker on the surface properties of floor polishes: An investigation using AFM with adhesion mapping. *Prog Org Coat* 76:1279–1287. doi: 10.1016/j.porgcoat.2013.03.020
197. Matsui N, Nozaki K, Ishihara K, Yamashita K, Nagai A (2015) Concentration-dependent effects of fibronectin adsorbed on hydroxyapatite surfaces on osteoblast adhesion. *Mater Sci Eng C* 48:378–383. doi: 10.1016/j.msec.2014.12.042
198. González-García C, Sousa SR, Moratal D, Rico P, Salmerón-Sánchez M (2010) Effect of nanoscale topography on fibronectin adsorption, focal adhesion size and matrix organisation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 77:181–190. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.01.021
199. Hyonchol K, Arakawa H, Osada T, Ikai A (2002) Quantification of fibronectin and cell surface interactions by AFM. *Colloids Surf B Biointerfaces* 25:33–43. doi: 10.1016/S0927-7765(01)00299-5
200. Wang B, Guo P, Auguste DT (2015) Mapping the CXCR4 receptor on breast cancer cells. *Biomaterials* 57:161–168. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.04.023

201. Spedden E, White JD, Naumova EN, Kaplan DL, Staii C (2012) Elasticity Maps of Living Neurons Measured by Combined Fluorescence and Atomic Force Microscopy. *Biophys J* 103:868–877. doi: 10.1016/j.bpj.2012.08.005
202. Llopis-Hernández V, Rico P, Ballester-Beltrán J, Moratal D, Salmerón-Sánchez M (2011) Role of surface chemistry in protein remodeling at the cell-material interface. *PLoS One* 6:e19610. doi: 10.1371/journal.pone.0019610
203. Giorgini E, Sabbatini S, Conti C, Rubini C, Rocchetti R, Re M, Vaccari L, Mitri E, Librando V (2015) Vibrational mapping of sinonasal lesions by Fourier transform infrared imaging spectroscopy. *J Biomed Opt* 20:125003. doi: 10.1117/1.JBO.20.12.125003
204. Nallala J, Piot O, Diebold M-D, Gobinet C, Bouché O, Manfait M, Sockalingum GD (2013) Infrared imaging as a cancer diagnostic tool: introducing a new concept of spectral barcodes for identifying molecular changes in colon tumors. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 83:294–300. doi: 10.1002/cyto.a.22249
205. Sebiskveradze D (2011) CARACTERISATION DE LESIONS TUMORALES PAR IMAGERIE SPECTRALE INFRAROUGE ASSOCIEE À LA BIOMETRIE FLOUE. Thèse de doctorat, Université de Reims
206. GIRARD A (2016) Étude du confinement acoustique dans des nano-structures métalliques et semiconductrices par diffusion Raman basse fréquence. Thèse de doctorat, Université de Lyon
207. ACHIR S (2014) Etude des mécanismes de stabilisation des protéines par spectroscopie Raman et dynamique moléculaire. Thèse de doctorat, Université de Lille
208. REYMOND-LARUINAZ S (2014) Biomolécules et systèmes nanostructurés : Caractérisation par spectrométrie Raman exaltée de surface (SERS). Thèse de doctorat, Université de Bourgogne
209. Domènech-Casal J, Tinti A, Torreggiani A (2008) Research progress on metallothioneins: insights into structure, metal binding properties and molecular function by spectroscopic investigations. *Biopolym Res Trends* 11–48
210. TALEB I (2013) Apport de la spectroscopie vibrationnelle, infrarouge et Raman, appliquée au sérum humain pour le diagnostic du carcinome hépatocellulaire chez les patients atteints de cirrhose. Thèse de doctorat, Université de Reims
211. Kahraman M, Wachsmann-Hogiu S (2015) Label-free and direct protein detection on 3D plasmonic nanovoid structures using surface-enhanced Raman scattering. *Anal Chim Acta* 856:74–81. doi: 10.1016/j.aca.2014.11.019
212. Barth A (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* 1767:1073–1101. doi: 10.1016/j.bbabi.2007.06.004
213. Eichert D, Drouet C, Sfiha H, Rey C, Combes C (2009) Nanocrystalline apatite-based biomaterials. *Nanocrystalline Apatite-Based Biomater* 1–86
214. Rey C, Combes C, Drouet C, Grossin D (2011) Bioactive Ceramics: Physical Chemistry. In: *Comprehensive Biomaterials*. pp 187–221

215. Kazanci M, Roschger P, Paschalis EP, Klaushofer K, Fratzl P (2006) Bone osteonal tissues by Raman spectral mapping: orientation-composition. *J Struct Biol* 156:489–496. doi: 10.1016/j.jsb.2006.06.011
216. Buchwald T, Niciejewski K, Kozielski M, Szybowicz M, Siatkowski M, Krauss H (2012) Identifying compositional and structural changes in spongy and subchondral bone from the hip joints of patients with osteoarthritis using Raman spectroscopy. *J Biomed Opt* 17:0170071–0170077. doi: 10.1117/1.JBO.17.1.017007
217. Ueda H, Ida Y, Kadota K, Tozuka Y (2014) Raman mapping for kinetic analysis of crystallization of amorphous drug based on distributional images. *Int J Pharm* 462:115–122. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.025
218. Stadelmann R, Hughes B, Orlovskaya N, Grasso S, Reece MJ (2015) 2D Raman mapping and thermal residual stresses in SiC grains of ZrB<sub>2</sub>–SiC ceramic composites. *Ceram Int* 10 Part A:13630–13637. doi: 10.1016/j.ceramint.2015.07.161
219. Ewing AV, Wray PS, Clarke GS, Kazarian SG (2015) Evaluating drug delivery with salt formation: Drug disproportionation studied in situ by ATR-FTIR imaging and Raman mapping. *J Pharm Biomed Anal* 111:248–256. doi: 10.1016/j.jpba.2015.03.040
220. Gordon KC, McGoverin CM (2011) Raman mapping of pharmaceuticals. *Int J Pharm* 417:151–162. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.12.030
221. Krafft C, Codrich D, Pelizzo G, Sergo V (2008) Raman mapping and FTIR imaging of lung tissue: congenital cystic adenomatoid malformation. *The Analyst* 133:361–371 . doi: 10.1039/b712958k
222. Bonifacio A, Beleites C, Vittur F, Marsich E, Semeraro S, Paoletti S, Sergo V (2010) Chemical imaging of articular cartilage sections with Raman mapping, employing uni- and multi-variate methods for data analysis. *The Analyst* 135:3193–3204. doi: 10.1039/c0an00459f
223. Krafft C, Kirsch M, Beleites C, Schackert G, Salzer R (2007) Methodology for fiber-optic Raman mapping and FTIR imaging of metastases in mouse brains. *Anal Bioanal Chem* 389:1133–1142 . doi: 10.1007/s00216-007-1453-2
224. Krafft C, Knetschke T, Siegner A, Funk RHW, Salzer R (2003) Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. *Vib Spectrosc* 32:75–83. doi: 10.1016/S0924-2031(03)00049-3
225. Cheng J-X, Jia YK, Zheng G, Xie XS (2002) Laser-scanning coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy and applications to cell biology. *Biophys J* 83:502–509. doi: 10.1016/S0006-3495(02)75186-2
226. Capitaine E, Moussa NO, Louot C, Bardet SM, Kano H, Duponchel L, Lévêque P, Couderc V, Leproux P (2018) Fast epi-detected broadband multiplex CARS and SHG imaging of mouse skull cells. *Biomed Opt Express* 9:245–253. doi: 10.1364/BOE.9.000245
227. Brie J, Chartier T, Chaput C, Delage C, Pradeau B, Caire F, Boncoeur M-P, Moreau J-J (2013) A new custom made bioceramic implant for the repair of large and complex craniofacial bone defects. *J Craniomaxillofac Surg* 41:403–407. doi: 10.1016/j.jcms.2012.11.005

228. Raynaud S (1999) Synthèse, frittage et propriétés mécaniques de phosphates de calcium dans le système hydroxyapatite-phosphate tricalcique. Thèse de doctorat, Université de Limoges
229. (2008) NF ISO 13779-3 "Norme AFNOR, Implants Chirurgicaux – Hydroxyapatite – Partie 3 : Analyse chimique et caractérisation de la cristallinité et de la pureté de phase"
230. M. Vignoles-Montrejaud (1984) Contribution à l'étude des apatites carbonatées de type B. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse
231. Montréjaud-Vignoles M, Bonel G, W Holcomb D, A Young R (1988) Influence of Preparation Conditions on the Composition of Type B Carbonated Hydroxyapatite and on the Localization of the Carbonate Ions. *Calcif Tissue Int* 43:33–40. doi: 10.1007/BF02555165
232. El Feki H, Rey C, Vignoles M (1991) Carbonate ions in apatites: Infrared investigations in the  $4 \text{ CO}_3$  domain. *Calcif Tissue Int* 49:269–274. doi: 10.1007/BF02556216
233. A.Maslova O (2014) Spectroscopie et imagerie Raman de matériaux inhomogènes. Thèse de doctorat, Université d'Orléans
234. Lebugle A, Sallek B, Tai AT (1999) Surface modification of monetite in water at 37 °C: characterisation by XPS. *J Mater Chem* 9:2511–2515. doi: 10.1039/A902469G
235. Pérez-Pariente J, Balas F, Vallet-Regi M (2000) Surface and chemical study of  $\text{SiO}_2 \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{CaO} \cdot (\text{MgO})$  bioactive glasses. *Chem Mater* 12. doi: 10.1021/cm9911114
236. Li Yang C, Jian Weng W, Du P, Shen G, Rong Han G (2007) XPS studies of Hydroxyapatite Powders by Grafting Octadecyltrichlorosilane. *Key Eng Mater - KEY ENG MAT* 330–332:765–768. doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.330-332.765
237. Yang CW, Lui TS (2009) Kinetics of hydrothermal crystallization under saturated steam pressure and the self-healing effect by nanocrystallite for hydroxyapatite coatings. *Acta Biomater* 5:2728–2737. doi: 10.1016/j.actbio.2009.03.014
238. Song Y-Y, Hildebrand H, Schmuki P (2010) Optimized monolayer grafting of 3-aminopropyltriethoxysilane onto amorphous, anatase and rutile  $\text{TiO}_2$ . *Surf Sci* 604:346–353. doi: 10.1016/j.susc.2009.11.027
239. Iucci G, Dettin M, Battocchio C, Gambaretto R, Bello CD, Polzonetti G (2007) Novel immobilizations of an adhesion peptide on the  $\text{TiO}_2$  surface: An XPS investigation. *Mater Sci Eng C* 27:1201–1206. doi: 10.1016/j.msec.2006.09.038
240. Matthew J (2004) Surface analysis by Auger and x-ray photoelectron spectroscopy. D. Briggs and J. T. Grant (eds). IMPublications, Chichester, UK and Surface Spectra, Manchester, UK, 2003. 900 pp., ISBN 1-901019-04-7, 900 pp. *Surf Interface Anal - SURF INTERFACE ANAL* 36:1647–1647. doi: 10.1002/sia.2005
241. Xu JL, Khor KA (2007) Chemical analysis of silica doped hydroxyapatite biomaterials consolidated by a spark plasma sintering method. *J Inorg Biochem* 101:187–195. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2006.09.030
242. Chang MC, Tanaka J (2002) XPS study for the microstructure development of hydroxyapatite-collagen nanocomposites cross-linked using glutaraldehyde. *Biomaterials* 23:3879–3885. doi: 10.1016/S0142-9612(02)00133-3

243. Xu J, Liu L, Munroe P, Xie Z-H (2015) Promoting bone-like apatite formation on titanium alloys through nanocrystalline tantalum nitride coatings. *J Mater Chem B* 3:4082–4094. doi: 10.1039/C5TB00236B
244. Lu H, Campbell C, Graham D, Ratner B (2000) Surface Characterization of Hydroxyapatite and Related Calcium Phosphates by XPS and TOF-SIMS. *Anal Chem* 72:2886–94. doi: 10.1021/ac990812h
245. Kilpadi KL, Chang PL, Bellis SL (2001) Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *J Biomed Mater Res* 57:258–267
246. Gelmi A, Higgins MJ, Wallace GG (2013) Quantifying fibronectin adhesion with nanoscale spatial resolution on glycosaminoglycan doped polypyrrole using Atomic Force Microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1830:4305–4313. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.03.005
247. Gan C, Ao M, Liu Z, Chen Y (2015) Imaging and force measurement of LDL and HDL by AFM in air and liquid. *FEBS Open Bio* 5:276–282. doi: 10.1016/j.fob.2015.03.014
248. Ranjkesh B, Chevallier J, Salehi H, Cuisinier F, Isidor F, Løvschall H (2016) Apatite precipitation on a novel fast-setting calcium silicate cement containing fluoride. *Acta Biomater Odontol Scand* 2:68–78. doi: 10.1080/23337931.2016.1178583
249. Han L, Kodama S, Okiji T (2015) Evaluation of calcium-releasing and apatite-forming abilities of fast-setting calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J* 48:124–130. doi: 10.1111/iej.12290
250. Ni M, Ratner BD (2003) Nacre surface transformation to hydroxyapatite in a phosphate buffer solution. *Biomaterials* 24:4323–4331. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00236-9
251. Bilem I, Chevallier P, Plawinski L, Sone ED, Durrieu MC, Laroche G (2016) RGD and BMP-2 mimetic peptide crosstalk enhances osteogenic commitment of human bone marrow stem cells. *Acta Biomater* 36:132–142. doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.032
252. Douard N (2010) Elaboration et fonctionnalisation de biocéramiques phosphocalciques. Thèse de doctorat, Université de Limoges
253. Taillac LB de, Porté-Durrieu MC, Labrugère C, Bareille R, Amédée J, Baquey C (2004) Grafting of RGD peptides to cellulose to enhance human osteoprogenitor cells adhesion and proliferation. *Compos Sci Technol* 64:827–837. doi: 10.1016/j.compscitech.2003.09.011
254. Xiao S-J, Textor M, Spencer N, Sigrist H (1998) Covalent Attachment of Cell-Adhesive, (Arg-Gly-Asp)-Containing Peptides to Titanium Surfaces. *Langmuir* 14:5507–5516. doi: 10.1021/la980257z
255. Xiao SJ, Textor M, Spencer ND, Wieland M, Keller B, Sigrist H (1997) Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *J Mater Sci Mater Med* 8:867–872. doi: 10.1023/A:1018501804943
256. Shamsi F, Coster H, Jolliffe KA (2011) Characterization of peptide immobilization on an acetylene terminated surface via click chemistry. *Surf Sci* 605:1763–1770. doi: 10.1016/j.susc.2011.05.027

257. Dettin M, Herath T, Gambaretto R, Iucci G, Battocchio C, Bagno A, Ghezzi F, Di Bello C, Polzonetti G, Di Silvio L (2009) Assessment of novel chemical strategies for covalent attachment of adhesive peptides to rough titanium surfaces: XPS analysis and biological evaluation. *J Biomed Mater Res A* 91:463–479. doi: 10.1002/jbm.a.32222
258. M. R. Kallury K, Macdonald P, Thompson M (1994) Effect of Surface Water and Base Catalysis on the Silanization of Silica by (Aminopropyl)alkoxysilanes Studied by X-ray Photoelectron Spectroscopy and <sup>13</sup>C Cross-Polarization/Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance. *Langmuir* 10. doi: 10.1021/la00014a025

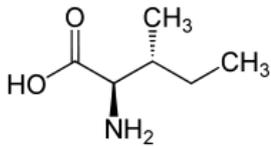
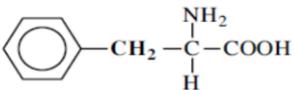
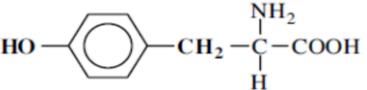
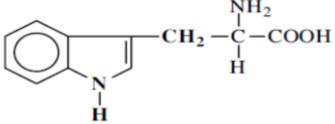
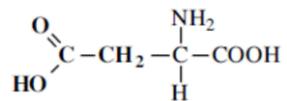
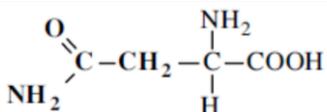
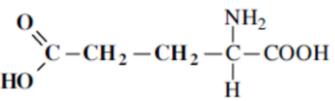


## Annexes

---

Annexe 1. Acides aminés rencontrés chez les eucaryotes .....	198
Annexe 2. Acides aminés présents dans la protéine VEGF .....	200
Annexe 3. Spectres XPS larges des céramiques fonctionnalisées HA-T et HA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> .....	201
Annexe 4. Spectres XPS larges des céramiques fonctionnalisées CHA-T et CHA-T-SM(PEG) <sub>6</sub> ..	202

## Annexe 1. Acides aminés rencontrés chez les eucaryotes

	Nom	Formule	Chaîne latérale R
Acides aliphatiques	Glycine (G)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{COOH} \\   \\ \text{H} \end{array}$	hydrogène
	Alanine (A)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{COOH} \\   \\ \text{H} \end{array}$	méthyle
	Valine (V)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{CH}(\text{CH}_3)_2-\text{C}-\text{COOH} \\   \\ \text{H} \end{array}$	isopropyle
	Leucine (L)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{CH}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\   \\ \text{H} \end{array}$	isobutyle
	Isoleucine (L)		groupement carboxyle et amine
Acides aminés aromatiques	Phénylalanine (F)		phényle
	Tyrosine (Y)		phénol
	Tryptophane (W)		indole
Acides aminés dicarboxyliques et leurs amides	Acide aspartique (D)		groupement $\beta$ -carboxyle
	Asparagine (N)		amide de l'acide aspartique
	Acide glutamique (E)		groupement $\gamma$ -carboxyle

	Glutamine (Q)		amide de l'acide glutamique
Acides aminés dibasiques	Lysine (K)		groupement ε-amino
	Histidine (H)		groupement imidazole
	Arginine (R)		groupement δ-guanidyle
Acides aminés alcools	Sérine (S)		alcool primaire
	Thréonine (T)		alcool secondaire
Acides aminés sulfurés et séléniés	Cystéine (C)		groupement thiol
	Sélocystéine (U)		groupe séléniol
	Méthionine (M)		groupement thioéther
Aminoacide (l'amine de l'acide aminé est une amine secondaire)	Proline		groupe α-aminocarboxylique

Tableau 18 : Noms et formules chimiques des 21 acides aminés rencontrés chez les eucaryotes.

## Annexe 2. Acides aminés présents dans la protéine VEGF

La séquence primaire en acides aminés du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est la suivante :

**APMAEGGGQN HHEVVKFMDV YQRSYCHPIE TLVDIFQEYP DEIEYIFKPS  
CVPLMRCGGC CNDEGLECVP TEESNITMQI MRIKPHQGQH IGEMSFLQHN  
KCECRPKKDR ARQENPCGPC SERRKHLFVQ DPQTCKCCK NTDSRCKARQ  
LELNERTCRC DKPRR**

Séquence primaire du VEGF		
Acide aminé	code	nombre
Alanine	A	4
Proline	P	12
Méthionine	M	6
Acide glutamique	E	16
Glycine	G	9
Glutamine	Q	11
Asparagine	N	7
Histidine	H	7
Valine	V	7
Tyrosine	T	4
Arginine	R	14
Sérine	S	7
Cystéine	C	16
Isoleucine	I	8
Thréonine	T	6
Leucine	L	7
Acide aspartique	D	8
Lysine	K	11
Phénylalanine	F	5

Tableau 19 : Liste des acides aminés présents dans le VEGF.

Annexe 3. Spectres XPS larges des céramiques fonctionnalisées HA-T et HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>

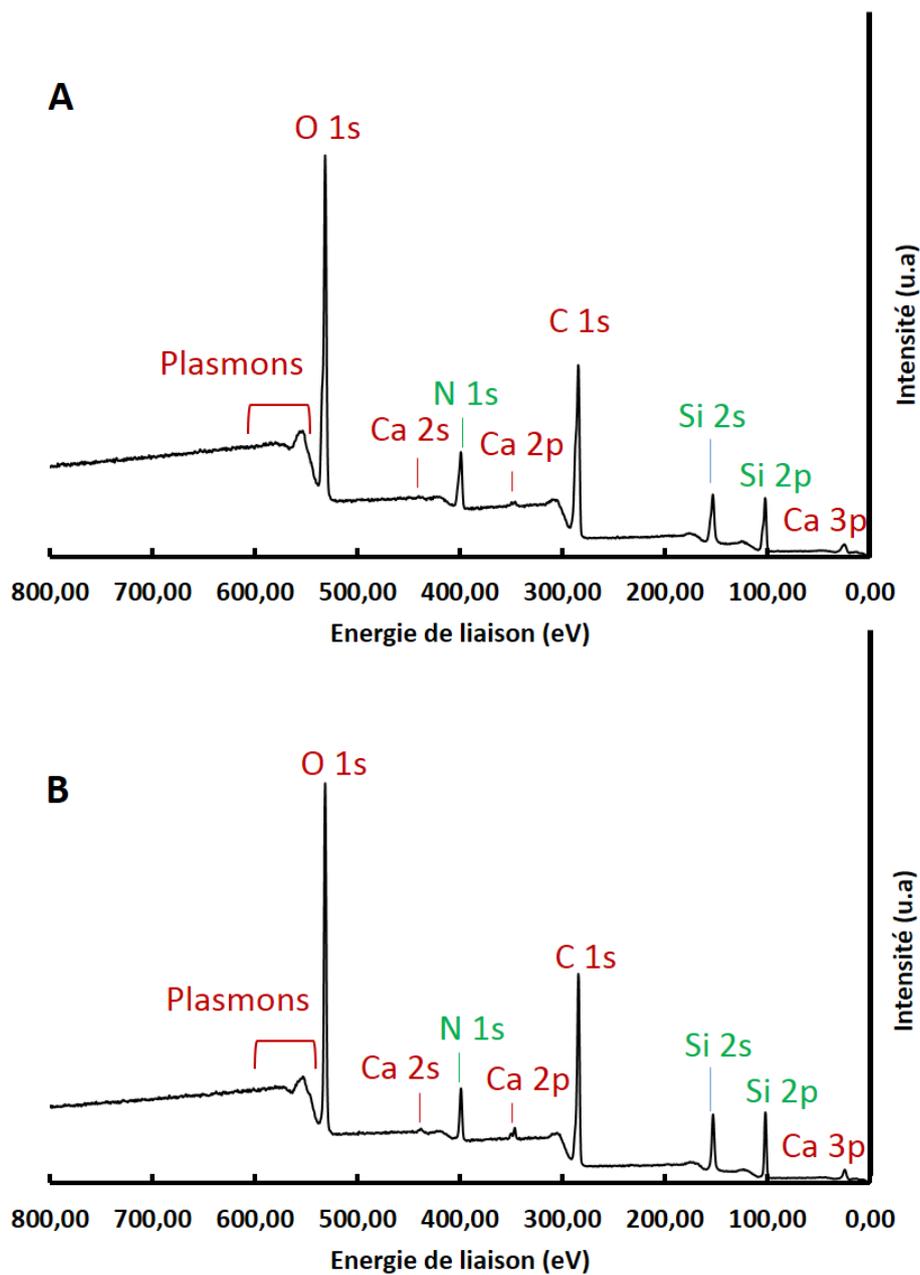


Figure 133 : Spectres XPS larges des céramiques fonctionnalisées A) HA-T et B) HA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>.

Annexe 4. Spectres XPS larges des céramiques fonctionnalisées CHA-T et CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>

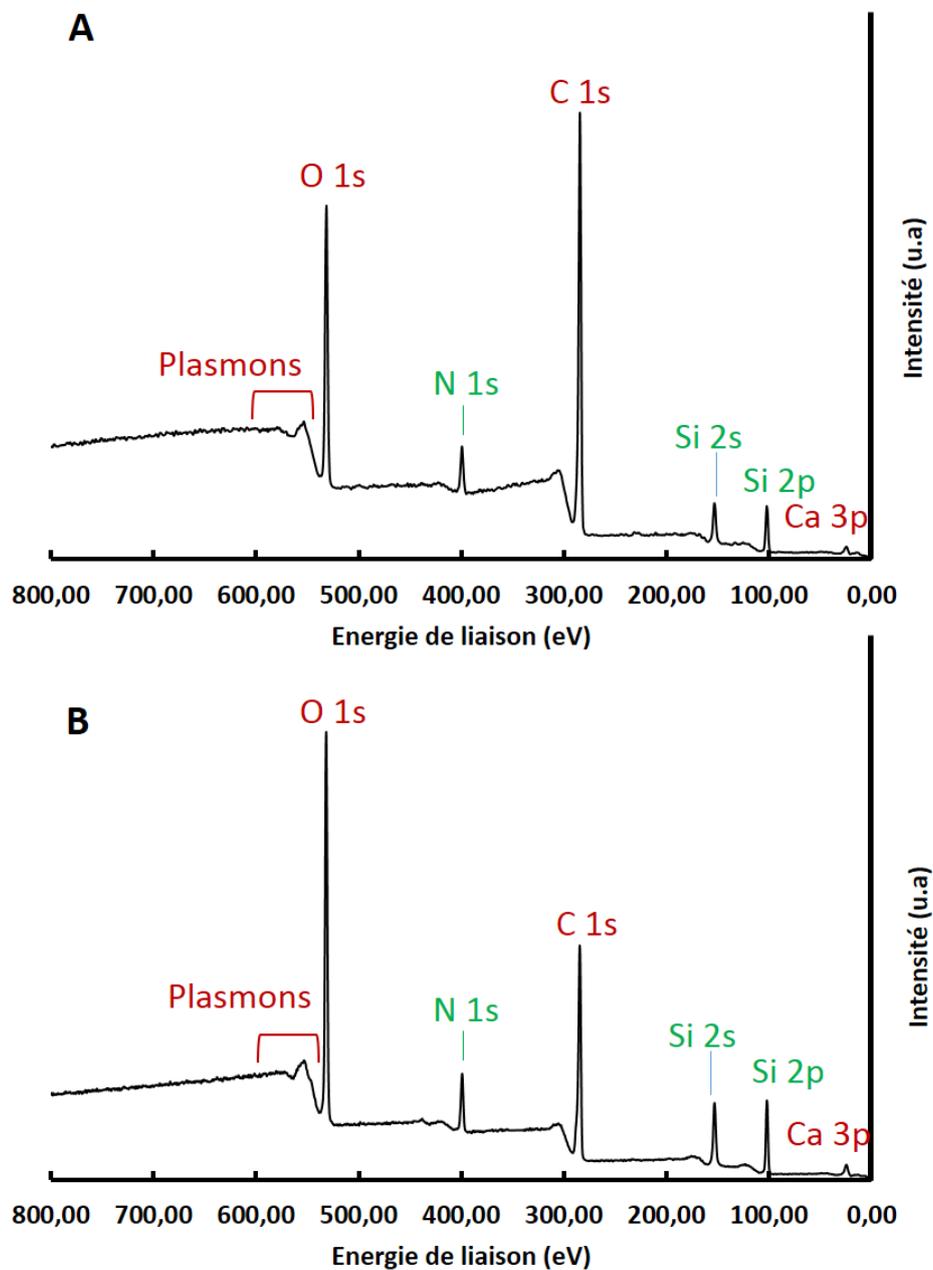


Figure 134 : Spectres XPS larges des céramiques fonctionnalisées A) CHA-T et B) CHA-T-SM(PEG)<sub>6</sub>.



## Résumé

---

Ce travail s'inscrit dans le cadre général du développement de biomatériaux ostéoinducteurs pour la réparation de grands défauts osseux. L'étude est une contribution à la compréhension des interactions physiques et chimiques entre des céramiques phosphocalciques et deux protéines d'intérêt : la fibronectine, protéine d'adhésion cellulaire, et le VEGF (pour *Vascular Endothelial Growth factor*) qui est impliqué dans la vascularisation et l'amélioration de la formation osseuse.

Les interactions physiques fibronectine/biocéramique ont été étudiées par spectroscopie de force afin d'évaluer l'influence de la topographie et de la composition chimique de céramiques phosphocalciques en hydroxyapatite (HA), hydroxyapatite silicatée (SiHA) et hydroxyapatite carbonatée (CHA) sur l'adhésion de la fibronectine. Les résultats obtenus par cartographie de forces mettent en évidence une absence d'incidence de la chimie des céramiques polies sur la répartition en surface et l'intensité des forces d'adhésion. En revanche ces dernières sont plus fortes au niveau des joints de grains des céramiques non polies mettant en avant une influence de la topographie de surface des matériaux modulée par la chimie.

Le protocole de fonctionnalisation par le VEGF consiste en trois étapes : silanisation, addition du SM(PEG)<sub>6</sub> et immobilisation du VEGF. Les interactions chimiques VEGF/biocéramique ont été étudiées principalement par imagerie Raman pour suivre ces étapes successives de la fonctionnalisation par le VEGF de céramiques polies en hydroxyapatite (HA) et hydroxyapatite carbonatée (CHA). Cette approche a permis de cartographier l'évolution chimique de la surface des matériaux et de mettre en évidence la distribution spatiale ainsi que les réactions préférentielles entre les molécules intermédiaires et le VEGF en fonction de la nature du substrat.

---

**Mots-clés :** biocéramique, phosphates de calcium, fonctionnalisation, protéine, caractérisation de surface, VEGF, fibronectine (Fn), imagerie Raman, spectroscopie de force.

## Abstract

---

This work is ascribed within the framework of the development of osteoinductive biomaterials for the repair large bone defects. It is a contribution to the understanding of the physical and chemical interactions between phosphocalcic ceramics and two proteins of interest: fibronectin (Fn), a cell adhesion protein, and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) which is involved in vascularisation and improvement of bone formation.

Fibronectin/bioceramic physical interactions were studied by force spectroscopy to evaluate the influence of the topography and the chemical composition of phosphocalcic ceramics made of hydroxyapatite (HA), silicated hydroxyapatite (SiHA) and carbonated hydroxyapatite (CHA) on fibronectin adhesion. The results obtained in terms of force cartography do not indicate any impact of the polished ceramics chemistry on the surface distribution and intensity of adhesion forces. However, these forces are more intense at the level of the grain boundaries of unpolished ceramics, highlighting an influence of the topography modulated by the chemical composition.

The protocol for functionalisation by VEGF consists of three steps: silanisation, addition of SM(PEG)<sub>6</sub> and immobilisation of VEGF. VEGF/bioceramic chemical interactions were studied mainly by Raman imaging in order to follow the successive steps of the functionalisation by VEGF of the polished surface of ceramics made of hydroxyapatite (HA) and carbonated hydroxyapatite (CHA). This approach allowed to map the surface chemical changes and to point out the spatial distribution as well as the preferential reactions between the intermediate molecules and VEGF depending of the substrate properties.

---

**Keywords:** bioceramic, calcium phosphates, functionalisation, protein, VEGF, fibronectin (Fn), Raman imaging, force spectroscopy

