



Production, traçage en temps réel de domaines de la fibronectine humaine recombinante et immobilisation des recombinants sur des surfaces bioactives : modèles ou à visées thérapeutiques

Cyrine Dridi

► To cite this version:

Cyrine Dridi. Production, traçage en temps réel de domaines de la fibronectine humaine recombinante et immobilisation des recombinants sur des surfaces bioactives : modèles ou à visées thérapeutiques. Biotechnologies. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCD092 . tel-02129312

HAL Id: tel-02129312

<https://theses.hal.science/tel-02129312>

Submitted on 14 May 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.

Ecole de Biologie Industrielle (EBI)

Unité Chimie, Structure et Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques (CSPBAT)

UMR CNRS 7244

Laboratoires de Biomatériaux Pour la Santé - UFR SMBH, Université Paris 13

Ecole Doctorale Galilée

THESE

Présentée et soutenue publiquement par

Cyrine DRIDI

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS 13

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

**Production, traçage en temps réel de domaines de la fibronectine
humaine recombinante et immobilisation des recombinants sur
des surfaces bioactives: modèles ou à visées thérapeutiques**

Soutenue le 9 mars 2015

Jury

Dr Catherine Boisson-Vidal, Rapporteur

Dr Jean-François Renaud de la Faverie, Rapporteur

Pr Dominique Ledoux, Examineur

Dr Florence Dufour, Examineur

Dr Karine Blondeau, Examineur

Dr Abdelatif Elm Selmi, Directeur

Pr Didier Lutomski, Directeur

RESUME

Dans ce travail de thèse, nous avons développé un nouveau procédé de production et de purification en temps réel des domaines 9 et 10 de la fibronectine humaine chez *E.coli*. Cette stratégie combine trois partenaires de fusion en tandem : un double tag d'affinité (10xHis et SBP) et un tag de coloration (le domaine de fixation de l'hème du cytochrome b5) en présence d'un site Tev.

Ce système a montré sa performance dans le traçage visuel des étapes d'expression et de purification et dans la quantification de la CMAT-FNIII9-10. La présence du double tag d'affinité permet une étape de purification simple et offre un degré de pureté atteignant les 98%. Par ailleurs, le cytochrome b5 a montré son intérêt dans le suivi visuel et quantitatif de l'adsorption de la CMAT-FNIII9-10 à la surface d'un support plastique. Ensuite, l'activité du fragment recombinant a été validée avec succès.

Dans cette étude, nous avons construit une matrice adhésive en combinant les propriétés du polymère PCL avec celles de la CMAT-FNIII9-10. L'immobilisation de celle-ci s'est opérée d'une manière orientée en adsorbant la protéine de fusion à la surface des PCL par l'intermédiaire de la streptavidine. Cette approche a conduit à l'élaboration d'un matériau bio-fonctionnalisé en optimisant l'exposition des sites d'attachement cellulaire à la surface des PCL par une immobilisation orientée. La réponse cellulaire des CMS humaines a été validée efficacement sur cette matrice, en absence de sérum et en présence de BSA. Les résultats de cette expérience montrent que cette stratégie a contribué à améliorer l'exposition des sites « RGD » et « PHSRN » favorisant l'interaction avec les récepteurs cellulaires.

Mots clés : Protéine recombinante, fibronectine, traçage en temps réel, technologie de fusion, double purification, adhésion cellulaire, PCL, fonctionnalisation de surface.

ABSTRACT

In this thesis, we have developed a novel method for producing and purifying the 9th and 10th domains of type III human fibronectin in *E.coli*. This strategy combines three fusion partners in tandem: a dual affinity tag (10xHis and SBP) and a coloring tag (the binding domain of cytochrome b5 heme) in the presence of a Tev cleaving site.

This system has demonstrated its performance in the visual tracking of the expression, purification and quantification steps of CMAT-FNIII9-10. The presence of the dual affinity tag allows a simple purification step and offers a degree of purity up to 98%. Moreover, the cytochrome b5 showed its interest in the visual and quantitative monitoring of the CMAT-FNIII9-10 adsorption onto the surface of a plastic support. Then the biological activity of the recombinant fragment was successfully validated.

In this study, we constructed an adhesive matrix by combining the properties of PCL with those of CMAT-FNIII9-10. Immobilization of the recombinant fragments is carried out by an oriented adsorption of the fusion protein onto the PCL film through a streptavidin layer. This approach has led to the development of a bio-functionalized material by optimizing the exposure of cell attachment sites on the surface of the PCL by an oriented immobilization. The cellular response of human MSCs was effectively validated on this matrix, in the absence of serum and in the presence of BSA. The results of this experiment show that this strategy has helped to improve the exposure sites "RGD" and "PHSRN" promoting interaction with cellular receptors.

Keywords: Recombinant protein, fibronectin, real time monitoring, fusion technology, double purification, cell adhesion, PCL, surface functionalization.

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres du jury pour l'honneur qu'ils me font, en acceptant de me consacrer leur précieux temps afin de juger le travail que j'ai l'honneur de leur soumettre dans le cadre de ma soutenance de thèse. Je voudrais remercier Monsieur Jean-François RENAUD de la FAVERIE et Madame Catherine Boisson-Vidal d'avoir accepté de rapporter ce travail ainsi que Madame Florence DUFOUR, Madame Carine Blondeau et Monsieur Dominique Ledoux d'avoir bien voulu l'examiner.

Pendant mes travaux de thèse j'ai eu la chance d'être encadrée par deux directeurs de thèse Monsieur Abdellatif ELM'SELMI et Monsieur Didier LUTOMSKI que je voudrais remercier.

Je souhaiterais remercier Monsieur Abdellatif ELM'SELMI pour m'avoir fait confiance depuis mon stage de projet de fin d'études jusqu'à la réalisation de ma thèse dans le Laboratoire de Biologie Moléculaire de l'Ecole de Biologie Industrielle et pour m'avoir initiée à la recherche. Merci pour le pari que vous avez fait sur moi, pour votre engagement, votre suivi, votre disponibilité à 100%, vos encouragements et vos conseils qui m'ont guidée tout au long de cette belle expérience. Je tiens à vous remercier de m'avoir laissé prendre mon envol, acquérir de l'autonomie et développer mon esprit de recherche. Je tiens aussi à vous exprimer toute mon admiration pour vos compétences scientifiques qui ont valorisé nos travaux de recherche et votre vision innovatrice qui a abouti à des publications scientifiques et un brevet. Je n'oublierai jamais nos réunions et nos discussions à travers les quelles vos critiques et vos conseils m'ont apporté beaucoup de maturité scientifique. Merci de m'avoir fait confiance sur le plan pédagogique en m'ayant confié la responsabilité de l'enseignement et la possibilité de les moduler personnellement pendant ces trois années où j'ai découvert le plaisir d'être enseignante. Enfin, je voudrais vous remercier pour votre aide scientifique et vos conseils pédagogiques.

Professeur Didier Lutomski, nul remerciement ne saurait bien exprimer ma gratitude envers vous pour m'avoir fait confiance et accepté de diriger mes travaux de thèses en nous lançant dans une piste totalement inconnue. Merci pour votre constante modestie et votre savoir vivre qui m'ont toujours laissée admirative. Je voudrais vous remercier également pour vos encouragements incessants, vos conseils judicieux surtout dans les moments difficiles du déroulement du projet sans oublier votre confiance mobilisatrice.

Didier, merci pour vos conseils et corrections qui m'ont beaucoup aidé lors de la rédaction du manuscrit. J'aimerais vous remercier pour votre ouverture d'esprit, votre bonne humeur, votre optimisme et vos qualités humaines qui ont contribué à me faire gravir les difficultés auxquelles on a pu faire face dans une ambiance agréable et détendue. Enfin, merci pour le poste d'Ingénieur de recherche que vous m'avez proposé afin de pouvoir financer la dernière partie de ma thèse.

J'adresse mes vifs remerciements à Madame Florence DUFOUR, Directrice de l'Ecole de Biologie Industrielle, d'avoir bien voulu me permettre de réaliser mon stage de PFE, de mastère et d'accomplir mes travaux de thèse au sein de son honorable institution où j'ai été facilement intégrée. Je souhaiterais lui exprimer ma gratitude pour m'avoir fait confiance, pour m'avoir soutenue et pour avoir financé mes travaux de thèse. Je vous remercie Florence pour vos précieux conseils, vos encouragements intarissables, votre soutien, votre professionnalisme et les inestimables facilitations pour la réalisation de toutes mes manip. Enfin, merci aussi pour m'avoir accordé votre confiance tout au long de ces années en espérant vous avoir donné satisfaction de mon travail.

Je dédie également ce travail, en exprimant ma gratitude et ma reconnaissance, à l'INSAT, à mes enseignants qui m'ont accompagné tout au long de mon parcours académique, m'ont inculqué le savoir, la rigueur et m'ont permis d'être aujourd'hui à ce niveau avec l'esprit de progresser toujours davantage. Un merci à Monsieur Hassib Bouallegui qui a initié l'aventure dans le cadre de la collaboration entre l'INSAT et l'EBI.

Mes remerciements s'adressent particulièrement à Madame Florence Poirrier qui m'a accueillie dans une ambiance chaleureuse et qui a bien voulu lire et relire avec bienveillance mes rédactions scientifiques, me prodiguer ses conseils utiles, m'écouter, me rassurer, me conseiller, m'orienter et formuler ses pertinentes observations pour la réussite de ce travail.

Je remercie particulièrement Madame Sylvie Changotade pour sa joie de vivre, pour son apport scientifique, pour son accompagnement, nos échanges pendant la rédaction. Je n'oublierai pas, Sylvie, nos longues journées de préparation et de comptage cellulaire. Nos longues discussions culinaires. Qu'est ce qu'on a pu rigoler !

Je tenais également à témoigner ma gratitude à Géraldine Rohman pour son accueil, son aide, sa disponibilité permanente, sa réactivité et ses qualités humaines. Tu m'en as tellement appris des choses !

J'adresse un grand merci à toute l'équipe de Bobigny pour m'avoir adoptée et m'avoir offert un cadre convivial où je me suis sentie à l'aise dès le premier jour. Je n'oublierai jamais nos déjeuners et surtout les blagues de Didier et de Karim.

Mes plus vifs remerciements vont à Monsieur Baligh Miladi, qui m'a accueillie pendant mes premiers jours à l'EBI, pour son aide incommensurable, son omniprésence et son soutien incessant. Baligh tu as été plus qu'un collègue, tu es un frère pour moi.

Je voudrais également exprimer ma reconnaissance à Monsieur Guilhem Bœuf pour son assistance permanente. Merci pour ton implication, ta rigueur et ton aide durant ces travaux de thèse et pour toutes les manipulations que je n'ai pas pu lancer. Je n'oublierai jamais ton soutien, ta disponibilité et les drôles qui ont pu faire passer les difficultés auxquelles on a bravement fait face.

Je souhaiterais témoigner ma gratitude à Monsieur Ahmed EL MARJOU pour son implication dans la collaboration entre notre laboratoire et le Laboratoire de Protéines recombinantes de l'Institut Curie. Merci pour toutes les fois où tu nous a dépannés.

Je souhaiterais adresser ma vive reconnaissance à Madame Nabila Hocine pour sa présence permanente, sa patience infinie, ses conseils pertinents, sa disponibilité continue et sa générosité intarissable et pour sa gestion des laboratoires qui m'ont facilité mon travail.

Mes vifs remerciements s'adressent à l'ensemble du personnel de l'Ecole de Biologie Industrielle pour leur soutien, leur aide et leurs qualités humaines. Merci à tous les stagiaires et élèves assistants qui sont passés par le Laboratoire de Biologie Moléculaire.

Je dédie ce travail à ma source, ma vie et mon modèle mes très chers parents auxquels j'exprime toute ma gratitude et sans eux je ne serai ce que je suis aujourd'hui, à mon futur époux pour

son soutien permanent, sa confiance et son amour, à ma sœur et à toute ma famille qui m'ont épaulé et soutenu jusqu'au bout.

I.	INTRODUCTION GENERALE	19
II.	ETAT DE L'ART	22
II.1	LES BIOMATERIAUX	22
II.1.1	Critères de choix des biomatériaux	22
II.1.2	Les différentes classes de biomatériaux.....	24
II.1.2.1	Classification des biomatériaux par nature chimique.....	24
II.1.2.2	Classification des biomatériaux par domaines d'application:.....	26
II.2	LA POLYCAPROLACTONE.....	28
II.2.1	Structure de la polycaprolactone	28
II.2.2	Caractéristiques de la PCL.....	29
II.2.3	Synthèse de la PCL	30
II.2.4	Applications de la polycaprolactone.....	30
II.3	Problème d'intégration des biomatériaux	31
II.4	Amélioration de la bio fonctionnalité du biomatériau	33
II.4.1	Critères requis pour la modification de surface des biomatériaux.....	33
II.4.2	Exemples de modification de surface de biomatériaux	34
II.4.2.1	Modification par greffage de groupements chimiques	34
II.4.2.2	Modification par revêtement de surface.....	34
II.4.2.3	Modification de surface par greffage chimique de polymère	35
II.4.2.4	Modification de surface par implantation de polysaccharide	35
II.4.2.5	Modification par implantation d'ions.....	36
II.4.3	Limites de la technique de modification de surface	36
II.4.4	Les protéines de la MEC comme alternative	37
II.4.4.1	Modification de surface par les biomolécules actives	37
II.4.4.2	Modification de surface par des domaines de biomolécules actives	40
II.5	LA FIBRONECTINE	41
II.5.1	Introduction	41
II.5.2	Caractérisation morphologique de la fibronectine.....	41
II.5.3	Organisation du gène de la fibronectine	42
II.5.4	Formes de la fibronectine	43
II.5.4.1	La fibronectine plasmatique	45
II.5.4.2	La fibronectine cellulaire.....	46
II.5.5	Structure de la fibronectine.....	46
II.5.5.1	Unités structurales de la fibronectine	47
II.5.5.2	La fibronectine : une protéine substrat pour les cellules	49
II.5.6	La fibronectine et ses rôles biologiques.....	52
II.6	Méthodes d'obtention de la fibronectine	55
II.6.1	Extraction et purification de la fibronectine à partir de plasma.....	55
II.6.2	Production de la fibronectine recombinante	56
II.6.2.1	La technologie recombinante.....	57

II.6.2.2	Systèmes d'expression utilisés dans la production de protéines recombinantes	58
II.6.2.3	Limites de la technologie recombinante.....	61
II.7	Technologie de fusion.....	63
II.7.1	Les Tags de fusion	64
II.7.1.1	Tags d'affinité	64
II.7.1.2	Les Tags de solubilité	67
II.7.1.3	Tags de coloration.....	69
II.7.2	Fibronectine et technologie de fusion.....	73
II.7.3	Clivage des protéines de fusion.....	74
II.7.3.1	Le clivage chimique.....	75
II.7.3.2	L'auto-clivage	75
II.7.3.3	Le clivage enzymatique.....	76
III.	MATERIELS & METHODES	81
III.1	Matériel biologique	81
III.1.1	Vecteurs bactériens	81
III.1.1.1	Vecteur pFN 103	81
III.1.1.2	Vecteur de clonage pCR®2.1- TA Cloning ® Kit.....	81
III.1.1.3	Vecteur pEBI.....	81
III.1.2	Souches bactériennes	83
III.1.2.1	<i>E.coli</i> TOP 10F'.....	83
III.1.2.2	<i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS / système pET.....	83
III.1.2.3	<i>E.coli</i> KRX.....	84
III.2	Méthodes	84
III.2.1	Méthodes de biologie moléculaire utilisées.....	84
III.2.1.1	Extraction plasmidique	84
III.2.1.2	Contrôle spectrophotométrique de la qualité des extractions d'ADN	85
III.2.1.3	Electrophorèse sur gel d'agarose	85
III.2.1.4	Purification de fragments d'ADN à partir du gel.....	86
III.2.1.5	Amplification par PCR.....	86
III.2.2	Stratégie de clonage de la fibronectine fusionnée à la cassette d'expression : CMAT-FNIII9-10..	88
III.2.2.1	Préparation de l'insert FNIII9-10.....	88
III.2.2.2	Sous- clonage de l'insert dans le PCR2.1.....	89
III.2.2.3	Transformation des bactéries compétentes par le produit de la ligation.....	89
III.2.2.4	Criblage des clones positifs.....	89
III.2.2.5	Elution de l'insert	90
III.2.2.6	Insertion de la cassette-FN dans les vecteurs d'expression	91
III.2.2.7	Identification et analyse de la séquence contenue dans le PFN103.....	91
III.2.2.8	Transformation des bactéries d'expression : BL21pLysS, KRX	92
III.2.3	Expression et purification de la cassette multitags et de la protéine de fusion.....	92
III.2.3.1	Production	92
III.2.3.2	Extraction des protéines recombinantes	93
III.2.3.3	Solubilisation et renaturation des corps d'inclusion.....	93
III.2.3.4	Purification des protéines d'intérêt	93
III.2.4	Analyse de l'expression et de la purification de la protéine recombinante.....	94
III.2.4.1	Par SDS-PAGE.....	94
III.2.4.2	Analyse de l'expression et de la purification par Western Blot	94

III.2.4.3	Analyse de l'expression et de la purification par spectrométrie de masse.....	95
III.2.5	Suivi de l'adsorption de la CMAT-FNIII9-10	95
III.2.6	Evaluation de l'activité biologique du fragment CMAT-FNIII9-10	96
III.2.6.1	Elaboration de films de PolyCaproLactone.....	96
III.2.6.2	Analyse des disques de PCL par EDX (Energy Dispersive X-Ray)	97
III.2.6.3	Construction de l'échafaudage adhésif : PCL-CMAT.....	97
III.2.6.4	Adhésion cellulaire	98
IV.	RESULTATS.....	100
IV.1	Design et clonage du fragment FNIII9-10	101
IV.1.1	Design de la construction	101
IV.1.2	Clonage du fragment recombinant FNIII9-10.....	101
IV.1.2.1	Synthèse de l'insert FNIII9-10	101
IV.1.2.2	Sous clonage dans le vecteur PCR2.1 et validation	103
IV.1.2.3	Clonage et validation de l'insert dans le vecteur d'expression	104
IV.1.2.4	Validation des étapes de clonage et identification de la séquence par bioinformatique	106
IV.2	Production, validation et traçage du fragment FNIII9-10	112
IV.2.1	Etude de la cinétique de croissance des deux souches BL21 p Lys S et KRX.....	112
IV.2.2	Suivi qualitatif et quantitatif de la production de FNIII9-10.....	113
IV.2.2.1	Traçage en temps réel de l'expression et de la purification de FNIII9-10.....	113
IV.2.2.2	Rôle de la CMAT dans la caractérisation semi-quantitative	114
IV.2.3	Optimisation de l'expression du fragment recombinant FNIII9-10	115
IV.2.3.1	Variation des paramètres de culture.....	116
IV.2.3.2	Solubilisation et renaturation des corps d'inclusion	118
IV.2.4	Rôle de la CMAT dans la quantification des protéines	120
IV.2.5	Double purification de la CMAT-FNIII9-10 par chromatographie d'affinité.....	121
IV.2.6	Validation de la protéine recombinante de fusion.....	122
IV.2.6.1	Validation par Western blot	122
IV.2.6.2	Validation par spectrométrie de masse	123
IV.2.7	Suivi de l'adsorption de la CMAT-FNIII9-10 sur du plastique	125
IV.3	Evaluation de l'activité biologique du fragment recombinant et élaboration d'un échafaudage adhésif	126
IV.3.1	Evaluation de l'activité biologique de CMAT-rFN sur le plastic.....	126
IV.3.2	Elaboration et caractérisation des disques de PCL.....	128
IV.3.2.1	Préparation des disques de PCL	128
IV.3.2.2	Caractérisation des disques de PCL synthétisés	129
➤	Caractérisation morphologique de la surface des disques.....	129
➤	Analyse élémentaire par EXD.....	130
➤	Propriétés physicochimiques des disques de PCL.....	132
IV.3.3	Etude de la réponse cellulaire des CSM humaines au contact d'un film de PCL bioactivé par le fragment recombinant	133
IV.3.3.1	Etude de l'effet de la BSA et du sérum de vœu fœtal sur la spécificité de l'adhésion cellulaire	133
IV.3.3.2	Construction de l'échafaudage adhésif	134
IV.3.3.3	Adhésion cellulaire sur l'échafaudage adhésif	135
IV.3.3.4	Observation en Microscopie Electronique à Balayage.....	136

V. DISCUSSION	140
VI. CONCLUSION & PERSPECTIVES	153
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	156

COMMUNICATIONS ET BUPLICATIONS

Articles de revue internationale

Baligh Miladi, Hassib Bouallagui , Cyrine Dridi , Ahmed El Marjou, Guilhem Boeuf, Patrick Di Martino,

Florence Dufour, Abdellatif Elm'Selmi, A new tagged-TEV protease: Construction, optimisation of production, purification and test activity. Protein Expression and Purification 75 (2011) 75–82

Baligh Miladi, Cyrine Dridi, Ahmed El Marjou, Guilhem Boeuf, Hassib Bouallagui, Florence Dufour, Patrick Di Martino, Abdellatif Elm'selmi . An Improved Strategy for Easy Process Monitoring and Advanced Purification of Recombinant Proteins. Molecular Biotechnology November 2013, Volume 55, Issue 3, pp 227-235

Articles soumis

Cyrine Dridi, Baligh Miladi, Sylvie Changotade, Florence Poirier, Ahmed El Marjou, Jean Jaques Lataillade, Guilhem Bœuf, Didier Lutomski, Abdellatif Elm selmi. Design and production of a biomimetic recombinant Fibronectin containing RGD and PHSRN combined to a colored multi affinity tag for real time monitoring from expression to adsorption; Journal of biotechnology and bioengineering.

Article en cours de rédaction

Cyrine Dridi, Baligh Miladi, Sylvie Changotade, Florence Poirier, Ahmed El Marjou, Géraldine Rohman, Jean Jaques Lataillade, Guilhem Bœuf, Didier Lutomski, Abdellatif Elm selmi. Construction of an adhesive multi layer scaffold for tissue engineering: Recombinant fibronectin fragment with PCL.

Congrès internationaux

Cyrine Dridi, Baligh Miladi, Guilhem Boeuf, Ahmed El Marjou, Didier Lutomski & Abdellatif Elm'selmi

Production of a novel form of the enterokinase and its oriented immobilization for the cleavage of fusion proteins, Proceedings of the 24th Annual meeting of Association Tunisienne des

Sciences biologiques, Acte de congrès et communication par poster, 25 - 28 Mars 2013, Sousse (Tunisie).

C. Dridi, G. Bœuf, A. Elmarjou, S. Changotade, F. Poirier, D. Lutomski, A. Elm'selmi, Engineering a cell adhesive surface using a novel oriented recombinant fibronectin coating strategy, Proceedings of the 22th Annual meeting of European Orthopaedic Research Society (EORS) Conference – Acte de congrès et communication orale, 02-04 Juillet 2014, Nantes (France).

Communications internationales à venir

- 4th Annual World Congress of Advanced Materials-2015 May 27-29, china, Speaker at Sector 9-2: Medical Ceramic, Plastics and Polymers
- 26ème Forum de l'ATSB (association tunisienne des sciences biologiques) du 23 au 26 mars 2015 Monastir-Tunisie

Colloques nationaux

C. Dridi, G. Bœuf, A. Elmarjou, S. Changotade, F. Poirier, D. Lutomski, A. Elm'selmi, Real time targeting of recombinant fibronectin fragment production and purification and its influence on cell attachment. Communication poster, journée biologie et interfaces, 29 Avril 2014, Bobigny (France)

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
ALA : Acide δ -aminolevulinique
CBD: Chitin-binding domain
CIRC: Centre international de recherché sur le cancer
CHO: Cellules ovariennes de Hamster
CMAT: colored multi affinity tag
CP: Calcium Phosphate
Cyto b5 : Cytochrome b5
DAPase : La forme recombinante de l'aminopeptidase dipeptidyl peptidase I
DEAE Diethylaminoethyl
DO : Densité optique
EDA et EDB: Extra domaine A / Extra domaine B
EGF: Endothelial growth factor
ESB: European society of biomaterials
FMN: Flavine mononucléotide
FDA: Food and Drug Administration
FN: Fibronectine
GAG: glycosaminoglycane
GFP: Green Fluorescent Protein
GST: Gluthatione-S-Transférase
HA: hydroxyapatite
His: Histidine
IMAC: Immobilized metal ions affinity chromatography
IPTG : Isopropyl-B-D-Thiogalactopyranoside
LB : Luria Broth
MBP : Maltose-binding protein
MEC : Matrice extracellulaire
CSM: Cellules mésenchymateuses souches
PAGE : SDS Polyacrylamid Gel Electrophoresis
PBS : Polyphosphate Buffered Saline
PCL: Poly caprolactone
PCR : Polymerase chain reaction
PLLA: poly (L-lactic acid)
PLGA: poly (L-glycolic acid)
PGA: Polyglycolic acid
PLA: polylactide acid
PDS: polydioxanone
SBP : Streptavidin-binding peptide
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
TEV : Tobacco Eatch Virus TGF: Transforming growth factor
TCP: Tri-calcium phosphate

Liste des figures

Figure 1: Evolutions des publications illustrant l'utilisation de la PCL dans le domaine des biomatériaux ou de l'ingénierie tissulaire au cours des 20 dernières années	28
Figure 2: Formule chimique de la PCL.....	29
Figure 3: Différentes méthodes de synthèse de la PCL	30
Figure 4: Représentation schématique des interactions moléculaires et cellulaires suite à une réaction tissulaire aux biomatériaux.....	32
Figure 5: L'évolution des biomatériaux classiques utilisés dans les applications cliniques et le développement de leurs applications en fonction des réponses biologiques recherchées	33
Figure 6: Quelques exemples de modification de surface physicochimique.....	35
Figure 7: Micrographie de molécules natives de fibronectine.....	42
Figure 8: Comparaison des structures de la fibronectine cellulaire et du plasma.....	45
Figure 9: Domaines composant la FN.....	47
Figure 10: Modélisation des structures tridimensionnelles des trois domaines de la FN.....	48
Figure 11: La structure du ruban du module III10 de la FN humaine.....	48
Figure 12: Séquences et modèles de la structure cristalline des modules 7-10 du domaine III de la fibronectine mettant en évidence les peptides PHSRN et le RGD	51
Figure 13: Mécanisme d'action d'un peptide contenant les séquences PHSRN et RGD en présence d'intégrines.....	52
Figure 14: Schéma représentatif de l'interaction Fibronectine-intégrines et formation de réseau fibrillaire.....	54
Figure 15: Mécanisme de liaison des deux peptides formant le SBP aux unités de la streptavidine.....	67
Figure 16: Structure RMN du cytochrome b5 humain.....	70
Figure 17: Suivi en temps réel des étapes d'expression, extraction et purification de protéines recombinantes fusionnées au Cytochrome b5	71
Figure 18: Suivi de l'expression protéique de la GST avec le Tag FMN.....	71
Figure 19: Technologie de fusion d'une protéine d'intérêt et sa purification.....	77
Figure 20: Schéma représentatif du principe du TA cloning.....	81
Figure 21: Carte de restriction du vecteur pET 15b modifié.....	82
Figure 22: Les éléments de contrôle du système pET.....	83
Figure 23: Plasmide PFN103 codant pour la fibronectine humaine	88
Figure 24: Composition de la cassette d'expression.....	101
Figure 25: Analyse du clonage par PCR.....	102
Figure 26: Validation de l'insertion du fragment d'intérêt par digestion aux enzymes de restriction.....	104
Figure 27: validation de la ligation pEBI-insert par simulation	105
Figure 28: Résultat de la PCR réalisée sur le pEBI	105
Figure 29: validation de la ligation de l'insert FNIII9-10 dans le vecteur d'expression pEBI par digestion enzymatique	106
Figure 30: Résultat de l'alignement de la séquence FNIII9-10 avec les séquences de la base de données du NCBI.....	111
Figure 31: Cinétique de croissance des souches d'expression BL21pLysS et KRX	112
Figure 32: Traçage en temps réel de l'expression et de la purification du fragment FNIII9-10	114
Figure 33: Corrélation entre l'intensité de la coloration des fractions protéiques et de leurs bandes respectives	115
Figure 34: Effet de la variation de la concentration en inducteur sur l'expression de la FNIII9-10....	116

Figure 35: Effet de la variation de la souche et de la température de culture après induction sur l'expression de la FNIII9-10	117
Figure 36: Effet de la température de culture sur la solubilité.....	118
Figure 37: Analyse de l'expression de CMAT-FNIII9-10 à 18°C/ 0.3 mM IPTG.....	119
Figure 38: Quantité de CMAT-FNIII9-10 et des protéines totales en fonction du temps.....	120
Figure 39: Pourcentage de production de la protéine de fusion par rapport à la totalité des protéines bactériennes	121
Figure 40: Analyse et comparaison de la qualité de la purification de la CMAT-FNIII9-10.....	122
Figure 41: Validation de l'expression de la CMAT-FNIII9-10 par western blot.....	122
Figure 42: Séparation et isolement de la bande à analyser.....	123
Figure 43: Résultat de la spectrométrie de masse réalisée sur la protéine de fusion CMAT-FNIII9-10	124
Figure 44: Suivi de l'adsorption	125
Figure 45: Nombre de cellules adhérant aux supports plastiques coatés avec la rFN et la pFN après 30 minutes d'incubation à 37°C en absence de sérum.	128
Figure 46: Principales étapes de l'élaboration de film de PCL par spin-coating.....	129
Figure 47: Disques de PCL découpés à partir du film de PCL.....	129
Figure 48: MEB environnemental (en absence de coating) d'un disque de PCL	130
Figure 49: Cartographie obtenue par EDX montrant la répartition les atomes C et O	131
Figure 50: Effet de la BSA et du sérum sur l'adhésion des MSCs sur les films de PCL	134
Figure 51: Schéma représentant la déposition de la couche de streptavidine et du fragment CMAT-rFN à la surface de la PCL	134
Figure 52: Nombre de cellules non adhérentes sur les différents supports après 3heures d'incubation à 37°C	136
Figure 53: Observations au microscope électronique à balayage de l'adhésion cellulaire des hMSC sur les supports de PCL coatés ou non de fibronectine recombinante et du plasma	137
Figure 54: Observations au microscope électronique à balayage de l'adhésion cellulaire des hMSC sur les supports de PCL fonctionnalisés et non fonctionnalisés.....	138
Figure 55: comparaison de l'étalement cellulaire sur deux surfaces coatées avec de la fibronectine totale	139

Liste des tableaux

Tableau 1: Quelques exemples de biomatériaux les plus utilisés et leurs domaines d'application	27
Tableau 2: Quelques exemples modifications de surfaces et leurs applications	36
Tableau 3: Exemple de protéines de la MEC utilisées pour la fonctionnalisation des surfaces des biomatériaux et leurs principales caractéristiques	39
Tableau 4: Exemple de motifs peptidiques de protéines de la MEC.	40
Tableau 5: Fonctions de la fibronectine du plasma et de la fibronectine cellulaire au cours du processus de cicatrisation des plaies	44
Tableau 6: Ligands et rôles biologiques des domaines de la FN.....	50
Tableau 7: Certaines complications résultant de l'adjonction de composés plasmatiques	56
Tableau 8: Avantages et inconvénients de la production de protéines recombinantes dans différents compartiments d' <i>E.Coli</i>	58
Tableau 9: Avantages et inconvénients de la levure comme système d'expression	59
Tableau 10: Systèmes les plus couramment utilisés et quelques caractéristiques	60
Tableau 11: Comparaison entre différents tag d'affinité.....	63
Tableau 12: Séquences et tailles de quelques tags d'affinité.....	64
Tableau 13: Matrices et conditions d'élution de quelques tags d'affinité.....	65
Tableau 14: Facteurs affectant la détection de la GFP.....	73
Tableau 15: Exemples de fragments de fibronectine produits par génie génétique chez E.Coli	74
Tableau 16: Milieu réactionnel des réactions PCR.....	87
Tableau 17: Programme PCR.....	87
Tableau 18: Amorces utilisées pour la synthèse de l'insert.....	88
Tableau 19: Conditions de culture et d'induction de Krx et BL21 (DE3) pLysS.....	92
Tableau 20: Résultat de l'identification MS/MS	124
Tableau 21: Quantification de l'adsorption de la CMAT-FNIII9-10.....	126
Tableau 22: Pourcentages massiques théoriques et expérimentaux.....	131
Tableau 23: Caractéristiques massiques et thermiques de la PCL.....	132

Cette thèse est divisée en cinq chapitres :

I. Introduction générale: cette section comporte une brève introduction aux principaux sujets de recherche ainsi que les objectifs de celle-ci.

II. Etude bibliographique: ce chapitre comprend une analyse des sujets liés à l'objectif principal de ce travail de recherche. L'organisation de cette étude a été faite suivant un ordre hiérarchique partant des aspects les plus simples et généraux gravitant autour du sujet traité pour atteindre des informations beaucoup plus spécifiques et détaillées.

III) Matériels et méthodes: cette partie décrit et détaille les techniques et le matériel employés pour la réalisation du projet de recherche. Ce chapitre comprend une énumération du matériel biologique nécessaire aux étapes de clonage, une section descriptive des méthodes de biologie moléculaire et les méthodes liées aux matériaux. Enfin, un détail de tous les tests nécessaires à la caractérisation du comportement cellulaire initial sur le matériau Polycaprolactone fonctionnalisé.

IV) Résultats et discussion: Ce chapitre expose l'ensemble des résultats obtenus pour les expériences réalisées accompagnés d'une interprétation ainsi qu'une discussion fondamentale.

V) Conclusions et perspectives: cette conclusion évoquera principalement les résultats expérimentaux fournis par cette étude et leur pertinence. On finira avec quelques suggestions de travaux futurs à réaliser afin de tracer des perspectives à ce sujet.

I. INTRODUCTION GENERALE

Les progrès de recherche et de développement gravitant autour des biomatériaux et du génie tissulaire se sont intensifiés considérablement au cours de ces dernières décennies. Ces études ont conduit à la génération de nouveaux substituts bioactifs conçus pour mimer les fonctions de la matrice extracellulaire (ECM) et pour interagir avec l'environnement physiologique.

Bien que plusieurs biomatériaux fassent l'objet de diverses applications médicales, ils posent tout de même un problème majeur quant à leur sécurité et de leur devenir dans l'organisme à savoir leur bio-tolérance et leur bio-fonctionnalité. Cet obstacle s'illustre par l'existence de difficultés au niveau de l'interface séparant le matériau implanté et les tissus de l'hôte qu'on qualifie plus communément par « bio-intégration ».

Par conséquent, il est impératif de trouver des solutions qui, d'une part, maintiennent la résistance et les propriétés mécaniques et chimiques des matériaux et de l'autre participent à améliorer la réponse biologique. Ce qui constitue le "cœur" du présent travail de recherche.

Dans le but d'optimiser l'intégration rapide des biomatériaux, de promouvoir leur adhésion de manière sélective et de minimiser les risques d'inflammation, de nombreuses approches de modification de surface ont été développées en combinant plusieurs disciplines : biologie cellulaire, chimie, sciences des biomatériaux, chirurgie...

Opérant dans un vaste domaine d'investigations orientées vers l'innovation des implants, plusieurs méthodes ont été proposées. Parmi celles-ci l'immobilisation, à la surface des implants, de biomolécules actives telles les protéines de la matrice extracellulaire : la fibronectine, la laminine, le collagène, la vitronectine...

Cette technique a conduit à d'importants résultats largement exploités en chirurgie réparatrice. Elle s'est avérée prometteuse dans la mesure où elle a permis de faciliter et d'accélérer la reconnaissance spécifique des matériaux par les récepteurs cellulaires grâce à l'établissement de fortes interactions entre l'implant (alliages, céramiques, polymères) et le milieu physiologique (cellules, tissus, organes). C'est une étape clé puisqu'elle permet de déclencher d'autres processus cellulaires telles que la croissance, la migration, la différenciation cellulaire ...

La modification de surface peut être réalisée par voie chimique, mais se heurte à des obstacles d'ordre structurel et requière de longues étapes de préparation.

De même, l'adsorption non spécifique de protéines ou de fragments peptidiques présente l'inconvénient de masquer les sites actifs en empêchant leur exposition correcte à la surface du matériau. Elle défavoriserait donc l'attachement du matériau aux récepteurs cellulaires.

Dans la perspective de contourner ces obstacles, la stratégie de l'immobilisation orientée de biomolécules actives a été développée et les chercheurs se sont penchés sur la conception de petits fragments recombinants issus de protéines entières de la MEC. Ce point fait partie de notre stratégie de fonctionnalisation du biomatériau et les fragments utilisés codent pour des domaines fonctionnels spécifiques tels ceux reconnus par les récepteurs des intégrines cellulaires. Cette approche de l'ingénierie des protéines de manière recombinante permet, par le biais de la technologie de fusion, l'élaboration de nouveaux recombinants combinant à la fois plusieurs fonctions complémentaires : adhésion cellulaire, ostéoinduction, prolifération, croissance...

La technologie de fusion a été largement utilisée dans la production de protéines recombinantes puisqu'elle offre un moyen de purification simple et rapide. A ce jour, plusieurs tags d'affinité comme le tag polyhistidine, la streptavidine et les systèmes dérivés de la biotine sont devenus des partenaires de fusion indispensables pour la purification ou l'immobilisation de protéines. De nouvelles stratégies de fusion par le biais de marqueurs de coloration ont également émergé et ont vu leur utilisation croître dans les processus de suivi de la production de protéines recombinantes. Cependant ces tags colorés demeurent très peu décrits dans la littérature et la plupart des procédés de production de protéines recombinantes actuels présentent des capacités de suivi en temps réel limitées.

Dans cette perspective, l'intégration de ces marqueurs lors de la conception de la protéine de fusion est intéressante afin de permettre le suivi, en temps réel, de l'expression et de la purification des protéines recombinantes d'intérêt.

Nous avons précédemment rapporté la conception d'une cassette multi-tag : colored multi affinity tag (CMAT) qui est composée d'un marqueur de coloration : le cytochrome b5 et deux tags d'affinité: 10His tag (polyhistidine) et SBP tag (protéine de liaison de la streptavidine).

Le but de cette construction est de permettre d'une part un traçage en temps réel de la production et de la purification de n'importe quelle protéine d'intérêt et de l'autre de garantir un degré de purification performant.

La fibronectine est une glycoprotéine de la MEC dont la capacité à favoriser l'adhésion des cellules a été largement décrite et bien caractérisée. Des études ultérieures ont montré l'implication d'une courte séquence peptidique « Arg-Gly-Asp » (RGD) localisée dans le site de liaison cellulaire du domaine III de la fibronectine humaine (FNIII10) dans l'initiation de l'adhésion grâce à son interaction avec les intégrines cellulaires.

Par ailleurs, des études ont montré que la présence d'une séquence supplémentaire « PHSRN » localisée dans le domaine adjacent au domaine III₁₀ a montré une activité synergique avec ce dernier. Elle est nécessaire à la promotion de l'adhésion cellulaire.

Plusieurs domaines de la fibronectine ont été exprimés avec des partenaires de fusion à la fois pour faciliter l'étape de purification en utilisant les tags d'affinité mais également pour apporter de nouvelles fonctions comme la croissance en utilisant des séquences codant pour la cadhérine ou le facteur de croissance des kératinocytes comme partenaire de fusion.

Ce travail sera porté sur la biofonctionnalisation de la surface d'un bio matériau par un fragment de fibronectine grâce à une immobilisation orientée et l'étude de l'influence de cette construction sur l'attachement cellulaires qui aura lieu à l'interface cellule-biomatériau.

Dans cette thèse, nous avons :

- décrit pour la première fois la production du domaine de fixation cellulaire de la fibronectine humaine (FNIII9-10) contenant le motif « RGD » et la séquence de synergie « PHSRN » en phase avec une cassette multitag (CMAT) dans *Escherichia Coli*.
- cherché à évaluer la capacité de la CMAT dans le traçage en temps réel des étapes de production et de purification.
- développé une nouvelle méthode pour le traçage de l'adsorption de la CMAT- FNIII9-10 et sa quantification grâce à la détection colorimétrique du cytochrome.
- avons immobilisé d'une manière orientée la CMAT-FNIII9-10 à la surface des films de PCL grâce à une couche de streptavidine
- étudié le comportement cellulaire des CSM humaines en présence de cette construction.

II. ETAT DE L'ART

II.1 LES BIOMATERIAUX

Plusieurs définitions ont été proposées concernant les biomatériaux ». La société Européenne pour les Biomateriaux (ESB) définissait, en 1976, un biomatériau comme étant "un matériau non viable utilisé dans un dispositif médical, destiné à interagir avec les systèmes biologiques». Actuellement, un biomatériau est désigné comme étant tout «matériau destiné à se connecter avec les systèmes biologiques pour évaluer, traiter, améliorer ou remplacer tout tissu, organe ou fonction du corps ».

Depuis les trente dernières décennies, la recherche et le développement dans le domaine des biomatériaux ont évolué et le marché connaît un essor croissant. En effet, 88.4 billion de dollars en 2017 contre 44 billion de dollars en 2012. L'Amérique du nord reste le leader mondial dans ce secteur, suivie par l'Europe et l'Asie (markets, 2013).

Les biomatériaux répondent principalement à un besoin médical. Ils ont contribué à l'amélioration de la qualité de vie patients souffrant de diverses pathologies: amputations, brûlures, lésions de la peau, dégénérescence de certains tissus ou organes, dysfonctionnements au niveau des hanches ou des articulations pour les personnes âgées...(Ratner et al. 1996; Holzapfel et al., 2013).

Ainsi, le développement de nouveaux matériaux a orienté le secteur biomédical vers l'adoption progressive de la médecine régénérative au dépend des prothèses et des greffes. En effet, grâce à l'ingénierie tissulaire on s'intéresse à la réparation de l'organe ou du tissu endommagé et non plus à sa substitution (Holzapfel et al., 2013).

II.1.1 Critères de choix des biomatériaux

Les biomatériaux sont destinés à être mis en contact avec le milieu biologique vivant. Cependant, l'introduction des implants dans le corps comporterait certains risques et dangers. A cet effet, un biomatériau doit obéir à certaines propriétés et doit être non toxique et non cancérigène. Le Centre international de la recherche sur le cancer (CIRC) a classé plusieurs matériaux (métaux et composés métalliques) en fonction de leurs caractères cancérigènes. Selon cette classification, le titane par exemple est classé au rang 2B, ce qui signifie qu'il est potentiellement cancérigène.

En effet, dans une étude réalisée sur des patients porteurs d'implants en titane, Balcaen et al ont montré la présence de ce dernier dans le sérum humain à un niveau allant de 2 à 6 $\mu\text{g/L}$ ce taux supérieur à la valeur seuil le qualifierait de cancérigène selon le CIRC (Balcaen et al., 2014).

D'autre part, un biomatériau doit être biocompatible c'est-à-dire qu'il ne doit pas engendrer de réactions inflammatoires ou induire des réponses immunologiques suite à la libération des éléments qui le composent à dose suffisamment élevée (Holzapfel et al., 2013; LeGeros et al., 1993).

Les implants utilisés en ingénierie tissulaire sont recherchés principalement pour leurs propriétés de biodégradabilité. En effet, leur utilisation ne doit pas se faire d'une manière permanente, l'objectif étant leur dégradation progressive afin de permettre aux cellules du milieu environnant de les remplacer et de synthétiser la matrice cellulaire au fil du temps. Il est aussi important de vérifier que les produits de la dégradation n'interfèrent pas avec l'organisme engendrant des réactions inflammatoires (O'Brien, 2011).

Un biomatériau doit également présenter une bonne résistance face à la corrosion. En effet, une fois dans le corps, le biomatériau se trouve en contact direct avec le sang. L'acidité de ce dernier et les ions de chlore qui le composent sont très agressifs. Parmi les candidats présentant une bonne résistance à la corrosion on peut citer les alliages de titane dont le coût reste tout de même élevé (LeGeros et al., 1993; Lévesque and Mantovani, 2003).

En ce qui concerne les propriétés mécaniques, le choix de l'implant dépend fortement de son application et du site où il doit être implanté (O'Brien, 2011). Par exemple, les applications orthopédiques requièrent des matériaux à haute rigidité permettant de supporter les contraintes imposées. Ainsi, les applications de prothèses de hanche par exemple nécessitent des implants présentant une grande résistance à l'usure pour résister au frottement. D'autres matériaux peuvent présenter des propriétés supplémentaires toujours en fonction de leurs applications comme les implants à mémoire de forme dont l'intérêt réside dans leur capacité à se déformer on peut citer les aciers non ferromagnétiques résistants aux examens d'imagerie par résonance magnétique (IRM) et les nitinol qui sont un mélange de titane et de nickel (LeGeros et al., 1993).

Enfin, parmi les critères de sélection des biomatériaux n'oublions pas le coût économique qui est étroitement lié à la technologie de sa fabrication et au processus du scaling-up qui constituent deux étapes critiques (O'Brien, 2011).

II.1.2 Les différentes classes de biomatériaux

La grande diversité des biomatériaux disponibles sur le marché témoigne du besoin croissant de leur adoption dans les processus de réparation des tissus ou organes humains dans le cadre de l'amélioration de la qualité de vie des patients. Les avancées technologiques survenues au fil des 25 dernières années ont permis d'offrir de nombreux substituts innovants offrant de larges perspectives d'applications.

Nous classerons ci-après les biomatériaux selon deux critères : leur nature chimique et leurs domaines d'application.

II.1.2.1 Classification des biomatériaux par nature chimique

Cinq grandes familles de biomatériaux sont utilisées en ingénierie tissulaire présentant chacune des avantages et des inconvénients. On trouve les matériaux biologiques, les métaux, les céramiques, les polymères synthétiques et les polymères naturels.

Les matériaux biologiques : greffes

La reconstruction ou le comblement d'un tissu ou organe défectueux peut s'effectuer par différents types de greffes utilisant divers matériaux biologiques:

- Autogreffe : le matériau provient du patient lui-même et offre par conséquent des avantages remarquables de compatibilité. Cependant ce type de greffe peut induire des fractures de la zone donneuse, des pertes sanguines, des douleurs, un « stock » limité,..(Oryan et al., 2014).
- Xénogreffe : le matériau est prélevé d'un individu d'une espèce différente puis réimplanté chez un autre individu d'une autre espèce. Cependant, l'idée d'introduire des organes d'animaux comme solution biologique présente une faible immuno-compatibilité et un risque de transmission d'infections (Bauer and Muschler, 2000; Oryan et al., 2014).
- Allogreffe : le matériau provient d'un donneur de la même espèce. Un risque de transmissions infectieuses et de rejet immunologique n'est pas à écarter (Bauer and Muschler, 2000; Oryan et al., 2014).

Compte tenu du manque de disponibilité de greffons et des risques que présente la greffe, des matériaux naturels ou de synthèse répondant aux critères mécaniques, fonctionnels et immunologiques ont été développés comme matériaux de substitution.

Les métaux

Les métaux constituent « les ancêtres » des biomatériaux dans la mesure où ils ont été les premiers à avoir été utilisés comme implants. Les principaux métaux utilisés en applications biomédicales sont les aciers inoxydables, le titane et ses alliages, le cobalt et le chrome. Ces derniers sont typiquement inertes. Ils présentent de bonnes propriétés de conductivité, de biocompatibilité et de résistance à la corrosion (Patel and Gohil, 2012).

Cependant, les métaux présentent certains inconvénients comme la corrosion, les réactions immunitaires, l'adaptation des propriétés mécaniques et les problèmes de débris. L'or, bien qu'il soit très résistant à la corrosion, n'est pas appliqué en orthopédie du fait de sa faible rigidité à supporter les contraintes (LeGeros et al., 1993).

Les céramiques

Les céramiques sont largement utilisées dans la régénération de l'os du fait de leur similarité chimique et structurale à ce dernier et sont de ce fait biocompatibles. Elles sont caractérisées par leur bonne résistance à la corrosion, leur rigidité et leur faible élasticité. Ces matériaux peuvent être inertes, actifs ou résorbables. Le Calcium Phosphate (CP), le tri-calcium phosphate (TCP) et l'hydroxyapatite (HA) présentent l'avantage d'être ostéoconducteurs, c'est-à-dire capables de favoriser la repousse de l'os (Patel and Gohil, 2012). Cependant, leur mise en forme pour l'implantation et le contrôle de leur vitesse de dégradation restent des paramètres difficiles à mettre au point (O'Brien, 2011).

Les polymères synthétiques

Plusieurs polyesters comme le poly (L-lactic acid) (PLLA), le poly (L-glycolic acid) (PLGA) ou le PCL (Polycaprolactone) sont couramment utilisés dans de nombreuses applications chez l'humain et approuvées par la « Food and Drug Administration » (FDA).

Ils présentent l'avantage d'être résorbables, inertes (Patel and Gohil, 2012) et bio assimilables pouvant avoir des caractéristiques de dégradation contrôlables et ce en variant le polymère ou sa composition (Furth et al., 2007; Holzapfel et al., 2013; O'Brien, 2011). Toutefois, du fait qu'ils représentent une faible bioactivité les polymères synthétiques peuvent présenter un

inconvenient majeur se traduisant par un risque de rejet. Par ailleurs, il a été démontré que des sous produits résultants de la dégradation par hydrolyse du PLA et du PGA pouvaient induire des nécroses tissulaires et cellulaires (O'Brien, 2011) .

Les polymères naturels

L'utilisation des biomatériaux naturels constitue une alternative prometteuse face aux risques de rejet cités ci-dessus puisqu'ils ont l'avantage de provenir directement des matrices extracellulaires naturelles. En effet, ces derniers présentent de bonnes caractéristiques physico-chimiques et maintiennent les signaux de reconnaissance cellulaire (Holzapfel et al., 2013). Parmi les polymères naturels les plus couramment appliqués citons le collagène, la gélatine, l'acide hyaluronique, les protéoglycanes, la chitine, la cellulose...

La fabrication d'échafaudages à partir de ces matériaux reste un challenge puisque ces derniers présentent de faibles propriétés mécaniques ce qui rend leur application limitée en orthopédie par exemple (Furth et al., 2007; O'Brien, 2011).

II.1.2.2 Classification des biomatériaux par domaines d'application:

Les biomatériaux trouvent des champs d'application très diversifiés comme la fabrication de membre, de jointure, d'échafaudage cellulaire (échafaudage), des lentilles de contact,...(Holzapfel et al., 2013). Le tableau I représente les champs d'application des biomatériaux les plus couramment utilisés.

Tableau I: Quelques exemples de biomatériaux les plus utilisés et leurs domaines d'application

Biomatériaux	Domaines d'application	Référence
Céramiques	Régénération de l'os, chirurgie dentaire et orthopédique	(O'Brien, 2011)
	Coating des implants métalliques	
Collagène	Régénération et Reconstruction tissulaire, bandage de la cornée	(Buddy D. Ratner, 1996; Patino et al., 2002)
Métaux	Prothèses de hanches et genoux	(Patel and Gohil, 2012)
Titane, aluminium	Implants dentaires, arthroplastie	
Acier inoxydable	Plaque osseuse pour la fixation des fractures, valve cardiaque	(Ratner et al., 1996)
PCL	Suture résorbable, système de délivrance de médicament, substitut de greffe osseuse, réparation de l'os	(Kweon et al., 2003)
Polyglycolic acid (PGA), polylactide (PLA)polydioxanone (PDS)	Dispositifs résorbables de fixation des os ou de matériaux de suture.	(Holzapfel et al., 2013)
Silicone-Acrylate hydrogel	Lentilles de contact	(Ratner et al., 1996)

Au vu de cette introduction bibliographique sur les biomatériaux et la diversité de leurs applications, nous allons ensuite détailler les propriétés du biomatériau chimique utilisé au cours de mon travail de thèse, la PCL. Nos travaux ayant été appliqués au coating de la PCL par un fragment recombinant de la fibronectine humaine.

II.2 LA POLYCAPROLACTONE

La polycaprolactone (PCL) a été introduite sur le marché des biomatériaux du fait de biodégradabilité par les microorganismes (Molpeceres et al., 1996). Ainsi, plusieurs travaux de recherche se sont intéressés à ce matériau dans diverses applications médicales surtout avec l'émergence de l'ingénierie tissulaire (Figure 1). L'intérêt de la PCL a de ce fait considérablement augmenté au fur et à mesure des années.

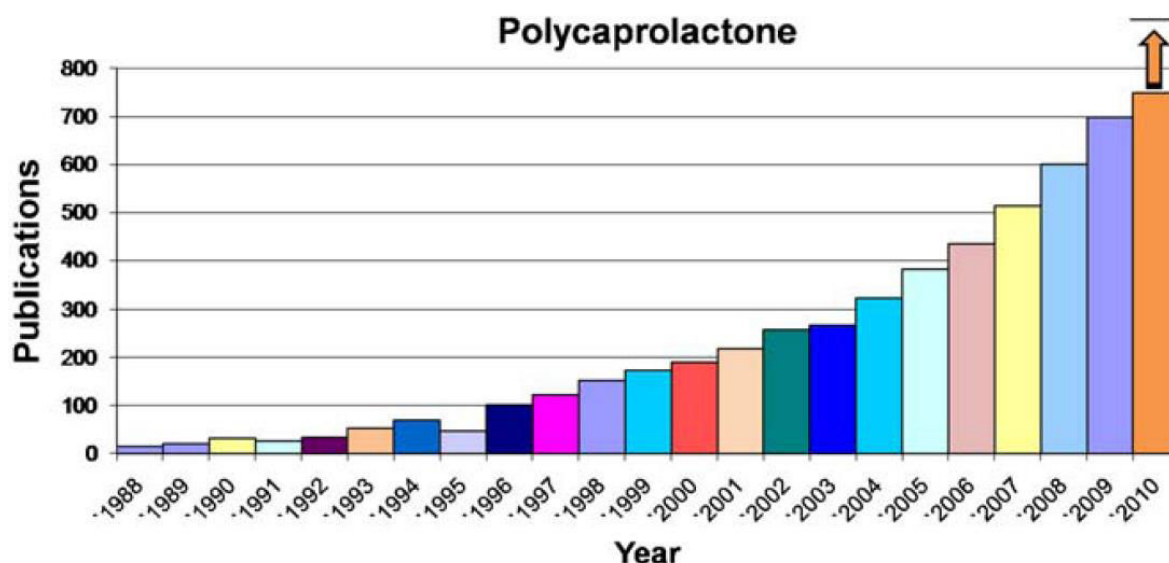


Figure 1: Evolutions des publications illustrant l'utilisation de la PCL dans le domaine des biomatériaux ou de l'ingénierie tissulaire au cours des 20 dernières années (Lim et al., 2000).

II.2.1 Structure de la polycaprolactone

La PCL est un polymère synthétique de formule chimique $-(CH_2)_5-CO-O-$ (figure 2) appartenant à la famille des polyesters aliphatiques (Detrez et al., 2007; Kweon et al., 2003). Elle possède une structure semi cristalline. Elle a une masse moléculaire de 42500 g/mol. La PCL est commercialisé sous forme de granulés (SIGMA Aldrich).

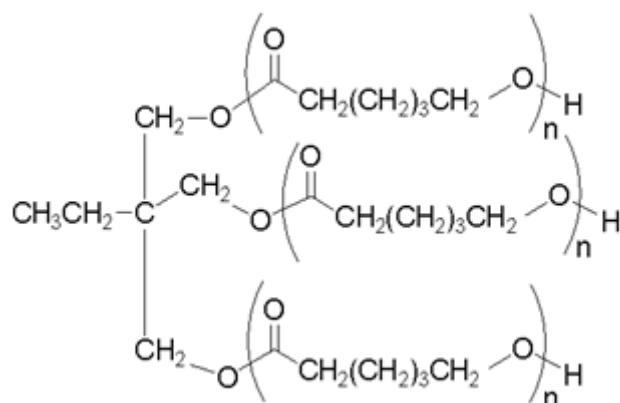


Figure 2: Formule chimique de la PCL (Ratner et al., 1996)

II.2.2 Caractéristiques de la PCL

La PCL fait partie des polymères les plus couramment utilisés pour la fabrication de différentes combinaisons de biomatériaux en applications médicales (Kwak et al., 2013). Son point de fusion est situé entre 54°C et 59°C. Elle est considérée comme non toxique, et présente, ainsi que ses produits de dégradation, des propriétés de biocompatibilité avec les tissus humains (Detrez et al., 2007). La PCL présente également une biodégradabilité plus lente que celle du PLA (2-4 années en fonction de la masse moléculaire initiale du dispositif ou de l'implant) (Ratner et al., 1996) par hydrolyse de ses fonctions esters (Detrez et al., 2007).

La PCL est reconnue pour son caractère résorbable et hydrophobe. Cette hydrophobicité peut être modulée par l'adjonction de groupements fonctionnels permettant de rendre le polymère plus hydrophile (Lim et al., 2000). Ce polymère est doté d'une solubilité élevée dans un certain nombre de solvants comme le chloroforme, le dichlorométhane, le carbone tétrachlorure, le benzène, le toluène, le cyclohexanone et le 2-nitropropane à température ambiante. La PCL est par contre moins soluble dans l'alcool et l'éther (Lim et al., 2000).

La PCL présente de bonnes propriétés mécaniques, rhéologiques et viscoélastiques facilitant sa mise en forme et la fabrication de supports par adaptation de la taille de ses pores (paramètre important pour la croissance cellulaire) (Lim et al., 2000).

II.2.3 Synthèse de la PCL

Le processus de fabrication de la PCL est simple et sa production est peu onéreuse (Lim et al., 2000). Cette molécule est miscible dans de nombreux solvants comme le dichlorométhane mais est insoluble dans l'eau et l'éthanol. Elle peut être synthétisée par polymérisation suivant plusieurs méthodes : par ouverture du cycle de ϵ -caprolactone, par oxydation du cyclohexanone et en faisant intervenir divers agents tensioactifs anioniques ou cationiques (Hombreiro et al., 2000; Kwak et al., 2013) (figure 3).



Figure 1 Synthèse de ϵ -caprolactone by oxidation of Cyclohexanone with Peracetic acid

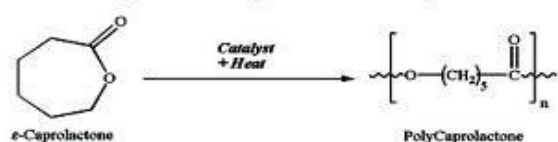


Figure 2 Ring opening polymerization of ϵ -caprolactone to polycaprolactone

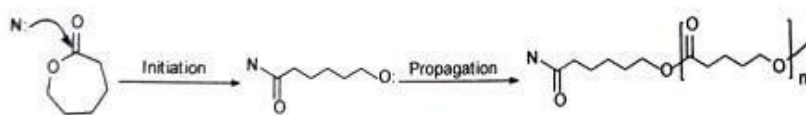


Figure 3 Anionic polymerization of ϵ -caprolactone and related lactones

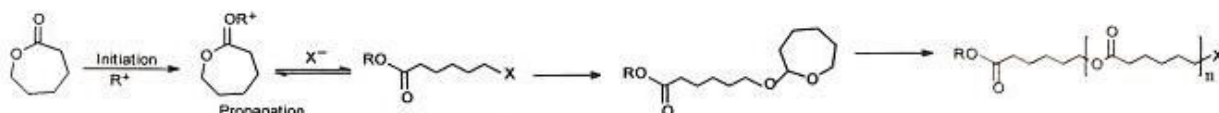


Figure 4 Cationic polymerization of ϵ -caprolactone and related lactones

Figure 3: Différentes méthodes de synthèse de la PCL (Detrez et al., 2007).

II.2.4 Applications de la polycaprolactone

La PCL a beaucoup été utilisée dans les systèmes de délivrance de médicaments notamment la rhodamine B (Wong, 2012), des séquences d'ADN (Lim et al., 2000), la cyclosporine (Molpeceres, 2000) et ce grâce à sa perméabilité mais surtout à sa capacité de résorption ce qui permet son élimination par le corps.

La PCL a été utilisée également comme plate-forme de fixation cellulaire pour la régénération tissulaire dans le cas des soins post-opératoires (Wong, 2012) et dans le remplacement d'outils et d'appareils métalliques utilisés dans le secteur de fabrication de dispositifs médicaux.

Parmi les applications de la PCL dans le domaine de l'ingénierie tissulaire on peut citer la fabrication d'échafaudage. Cette approche vise à promouvoir la réparation et / ou la régénération des tissus endommagés par le biais d'un système qui associe des biomolécules à un polymère (PCL) qui assure un maintien depuis les conditions de culture *in vivo* jusqu'à l'implantation (van Wachem et al., 1994).

La PCL a également fait l'objet d'application en médecine dentaire en association avec un composite de verre / phosphate destiné au remplissage de la racine dentaire. Cette structure a été capable de produire un joint assurant l'étanchéité dans l'environnement aqueux (Heydarkhan-Hagvall et al., 2008). Il a été rapporté que la PCL contribuait à la croissance cellulaire (Kweon et al., 2003).

II.3 Problème d'intégration des biomatériaux

Le choix d'un biomatériau « idéalement » adapté, ne présentant aucun risque allergique et produit à un coût modéré demeure un challenge difficile à relever. Même si certains matériaux ont montré de bonnes propriétés *in vitro*, certains échecs se sont manifestés *in vivo* après l'implantation (O'Brien, 2011). De plus même si les biomatériaux n'ont pas présenté de réels dangers à court terme la recherche continue à s'interroger sur le long terme (LeGeros et al., 1993).

Les biomatériaux classiques tels que les métaux ou les céramiques ont été largement utilisés à des fins de réparation ou de remplacement de tissu ou d'organe grâce à leur propriété de biocompatibilité et un bénéfice / risque acceptable. Cependant, leur utilisation se heurte au problème majeur qu'est la biointégration.

En effet, en chirurgie reconstructive, un développement d'une interface entre le biomatériau et le tissu biologique conduisant à la formation d'un tissu fibreux peut être observé. Les répercussions de ce dernier se traduisent par des réactions inflammatoires provoquées par l'introduction du matériau artificiel connu sous le terme de synovite. Celle-ci peut aussi se manifester tardivement suite à la libération des débris en provenance du matériau (figure 4).

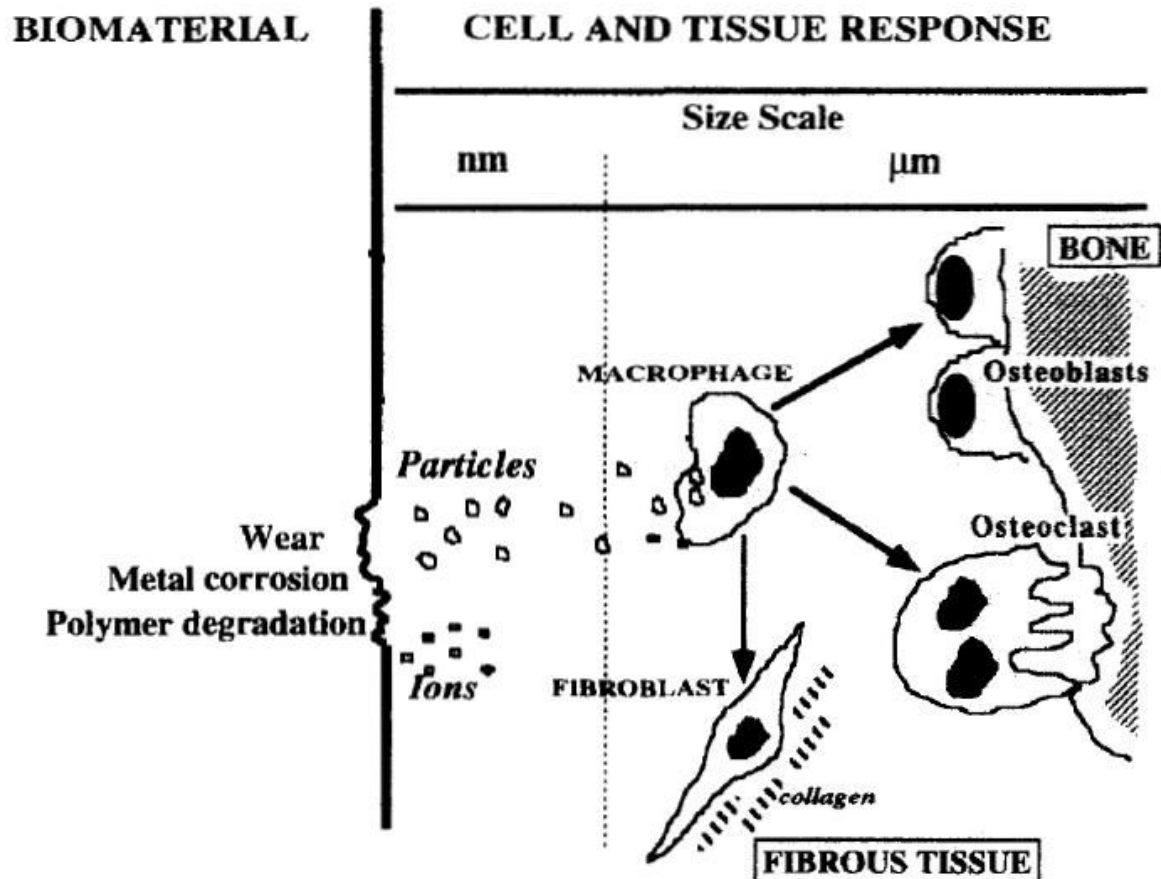


Figure 4: Représentation schématique des interactions moléculaires et cellulaires suite à une réaction tissulaire aux biomatériaux d'après Ratner et al. (1996).

Un autre signe de l'échec de l'implantation peut se traduire par la diminution de la stabilité mécanique de l'implant ou la perte de l'intégrité de l'os entraînant plusieurs interventions chirurgicales voir même l'élimination de l'implant dans les cas de réactions immunoallergiques. Ainsi, le terme intégration a été introduit par Branemark et dont l'enjeu majeur consiste en l'élaboration rapide et stable, d'une interface solide entre l'os et l'implant (en titane) afin de faciliter la fixation de ce dernier au niveau de son site de destination (Branemark, 1983).

De ce fait, le développement des implants dans le but d'améliorer leur durée de vie, de promouvoir la rapidité de leur intégration, et de fournir un support structural optimisé, une fois implanté, a conduit à la recherche de nouvelles propriétés (figure5). Ainsi, le terme de « biomatériaux intelligents » a été conçu pour désigner les implants qui participent activement dans les processus cellulaires tels que l'adhésion, la croissance et la différenciation cellulaires lors de la réparation et la régénération des tissus ou des organes endommagés.

Ces matériaux sont par exemple capables de se dégrader suivant une période contrôlée et assurent une activité mimétique des réponses cellulaires spécifiques (Holzapfel et al., 2013). De ce fait, une large gamme d'échafaudage s'a été désignée combinant des matériaux naturels ou synthétiques facilement manipulables en conditions cliniques (Stoop, 2008) .

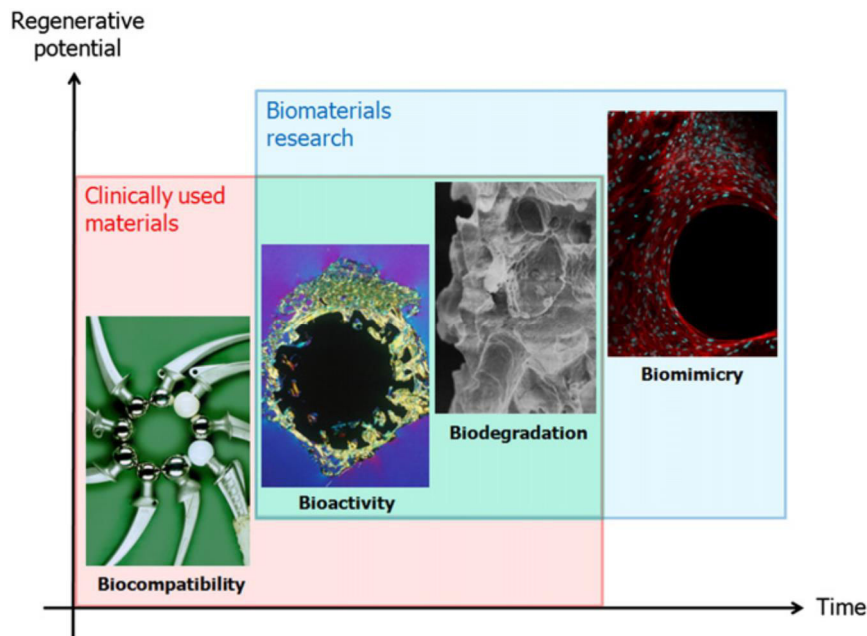


Figure 5: L'évolution des biomatériaux classiques utilisés dans les applications cliniques et le développement de leurs applications en fonction des réponses biologiques recherchées (Holzapfel et al., 2013).

II.4 Amélioration de la bio fonctionnalité du biomatériau

Les avancées réalisées dans le domaine des biomatériaux et l'ingénierie tissulaire occupent de plus en plus une place importante dans l'élaboration de matériaux à visée thérapeutique, principalement en chirurgie orthopédique et dentaire. L'objectif est d'améliorer les propriétés mécaniques, fonctionnelles et d'ostéointégration des implants et minimiser les risques de rejet ou de déformation sur le long terme par le biais de la fonctionnalisation des surfaces des biomatériaux (Kwak et al., 2013).

II.4.1 Critères requis pour la modification de surface des biomatériaux

La manipulation et le contrôle des surfaces des biomatériaux doivent s'opérer avec rigueur afin de ne pas altérer les propriétés du substrat, ce qui constitue un défi d'une importance cruciale dans la conception de matériaux biomédicaux.

Ainsi, la modification des surfaces des biomatériaux doit s'opérer dans des conditions bien déterminées afin de garantir des propriétés mécaniques et fonctionnelles adaptées. En effet, il est recommandé que la zone de la surface à modifier obéisse à une certaine épaisseur. Cette dernière est déterminée spécifiquement pour chaque système, évitant ainsi les phénomènes d'érosion mécanique et de délaminage du matériau (Ratner et al., 1996).

Par exemple, le coating des surfaces par des protéines requiert une fine épaisseur. Il est par ailleurs possible de varier cette épaisseur dans la mesure d'assurer une bonne homogénéité à la surface du matériau traité.

D'autre part, la modification des surfaces des biomatériaux doit garantir une bonne résistance du biomatériau. Ceci peut être réalisé par le biais de liaisons covalentes entre les groupements fonctionnels à greffer et la matrice initiale (surface du biomatériau). Par ailleurs, la modification de surface peut engendrer des changements chimiques et de structures résultant en la diffusion de molécules. Afin d'inhiber ce changement, deux approches sont couramment utilisées : le cross-linking ou l'introduction d'une couche imperméable entre le biomatériau et la surface modifiée (Ratner et al., 1996).

II.4.2 Exemples de modification de surface de biomatériaux

La modification des surfaces des biomatériaux peut être effectuée par plusieurs techniques et ce à différents niveaux de complexité via des méthodes physicochimiques ou biologiques. Différents exemples sont cités et représentés ci-après (figure 6).

II.4.2.1 Modification par greffage de groupements chimiques

L'utilisation de groupements chimiques chargés tels que OH^- , COO^- , NH_3^+ permet d'améliorer les interactions électrostatiques pour une adsorption spécifique. Ces fonctions servent de linker intervenant dans l'optimisation de l'orientation structurale des sites de fixation par exemple (Stevens, 2008).

II.4.2.2 Modification par revêtement de surface

Des travaux se sont orientés vers d'autres approches de développement de matériaux à résistance améliorée à la corrosion grâce à un revêtement évitant la libération des ions métalliques dans l'organisme hôte (LeGeros et al., 1993).

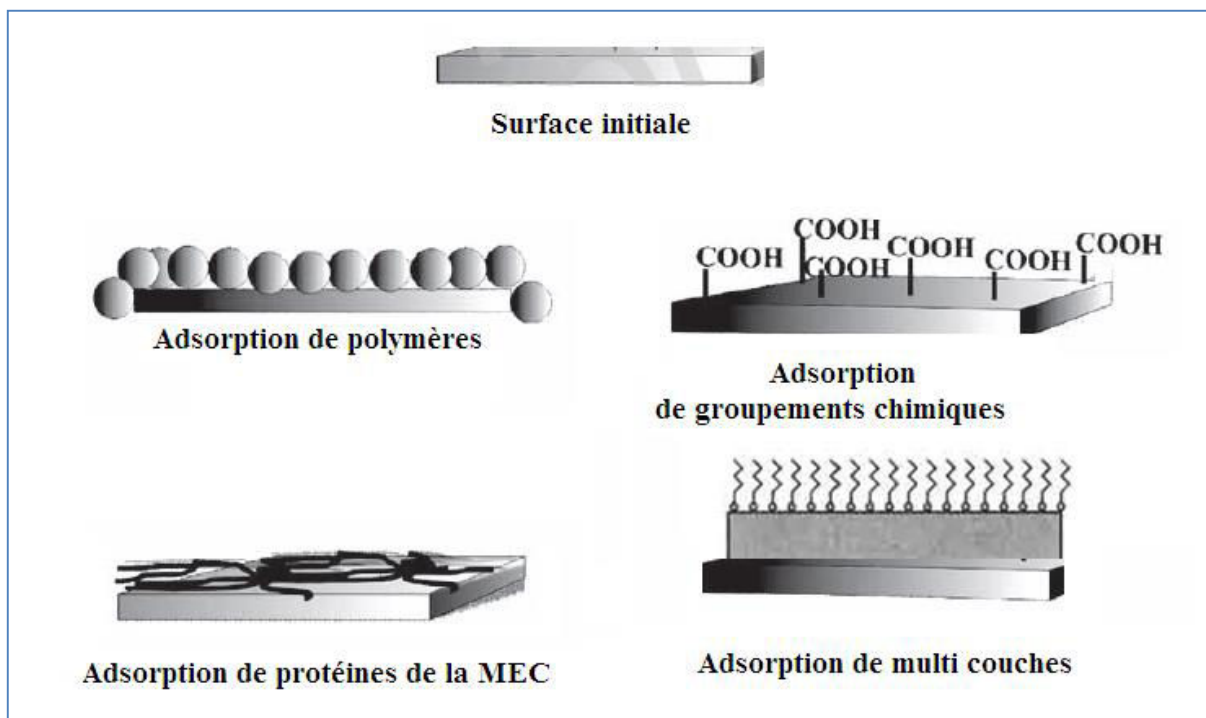


Figure 6: Quelques exemples de modification de surface physicochimique adapté de (Vasita et al., 2008)

II.4.2.3 Modification de surface par greffage chimique de polymère

Plusieurs matériaux ont été fonctionnalisés par greffage chimique de polymères. La fragilité des échafaudages de céramique par exemple a été améliorée en traitant la surface par le biais de polymères (LeGeros et al., 1993). Afin de garantir l'adhésion cellulaire, la prolifération, et l'ostéoinduction une modification de la surface du calcium phosphate biphasique (BCP) a été effectuée par un couplage à la PCL ainsi qu'une fonctionnalisation à la silice (Kwak et al., 2013).

II.4.2.4 Modification de surface par implantation de polysaccharide

L'infection bactérienne reste un obstacle majeur lors de l'utilisation d'implants médicaux. Ainsi, des travaux de recherche ont porté sur le développement de polymères résistant à l'adhésion bactérienne pour le revêtement de dispositifs médicaux (Hetrick and Schoenfisch, 2006). Le chitosane (CH) est un polysaccharide polycationique présentant un intérêt dans le domaine de la modification de surface du fait de ses propriétés antibactériennes (Jou et al., 2007).

II.4.2.5 Modification par implantation d'ions

La PCL étant hydrophobe et ne présentant pas de sites de reconnaissance biologique ne garantit donc pas un milieu optimum pour l'adhésion cellulaire. Des études ont permis l'amélioration du caractère hydrophile de la PCL grâce à l'implantation d'ions à sa surface (Kwak et al., 2013). D'autre part, il a été démontré que l'association de la PCL avec le collagène et l'hydroxyapatite formait un échafaudage présentant une meilleure propagation et prolifération cellulaire (Phipps et al., 2011).

Ainsi, plusieurs modifications de surfaces ont été développées en fonction des applications requises, en voici un résumé dans le tableau II.

Tableau II: Quelques exemples modifications de surfaces et leurs applications
(Ratner et al., 1996).

Application recherchée	Exemple de modification de surface des biomatériaux
Compatibilité du sang	Modification chimique du polystyrène
Adhésion & croissance cellulaire	Oxydation de la surface du polystyrène Traitement de surface plasma d'ammoniac
Contrôle de l'adsorption protéique	Immobilisation du polyéthylène glycol Particules de chromatographie d'affinité
Résistance à la corrosion	Implantation d'ions Dépôt de diamants

II.4.3 Limites de la technique de modification de surface

Bien que plusieurs méthodes de modification de surface aient été développées, elles présentent néanmoins certains inconvénients (Phipps et al., 2011).

En effet, il a été constaté que la modification de la topographie des matériaux peut engendrer une réduction de la densité cellulaire et une diminution de la réponse cellule-cellule lors de la communication cellulaire dans le cas où les considérations spatiales ne sont pas prises en compte (Kwak et al., 2013).

D'autre part, les méthodes chimiques de fonctionnalisation de surface requièrent de longues étapes et peuvent induire certains effets indésirables. Dans une étude réalisée par (van Wachem et al., 1994), il a été rapporté que l'utilisation du glutaraldéhyde comme agent chimique dans le cross-linking induisait des effets toxiques. Par ailleurs, la méthode de cross-linking des biomatériaux collagéniques par exemple a montré une réduction de la taille des pores de ce dernier, ce qui engendre une vascularisation retardée du biomatériau (Heydarkhan-Hagvall et al., 2008).

II.4.4 Les protéines de la MEC comme alternative

Afin de favoriser les interactions spécifiques entre des matériaux et les cellules en réduisant les risques de dénaturation des stratégies prometteuses ont été mises en place durant les dernières décennies. Elles visent à recréer le contexte topographique de la matrice extracellulaire (MEC) et à attirer les cellules des patients à la surface des implants (Schwarzbauer, 1991). La MEC fournit un microenvironnement dynamique permettant l'interaction des cellules entre elles pour l'assemblage cellulaire, la formation de tissu, le contrôle de la mobilité cellulaire...

II.4.4.1 Modification de surface par les biomolécules actives

L'approche de modification de surface par les biomolécules actives consiste en la modification des surfaces des biomatériaux par l'immobilisation des protéines de la MEC à la surface des implants. Cette stratégie constitue une alternative attrayante aux méthodes décrites précédemment puisqu'elle favorise l'interaction sélective entre le tissu biologique et le biomatériau dans le milieu physiologique (Schwarzbauer, 1991; Stevens, 2008; Zhang et al., 2010).

Les protéines peuvent s'adsorber spontanément à la surface des biomatériaux mais d'une manière non spécifique par le biais de faibles interactions, il est donc nécessaire d'optimiser leur adsorption pour une réponse optimale en combinant des liaisons ioniques ou covalentes (Stevens, 2008).

En effet, la reconnaissance des récepteurs cellulaires par les sites de fixation des protéines de la MEC est une étape régulée et qui dépend des caractéristiques structurales des motifs de fixation ainsi que de leur orientation spatiale et de leur densité (Luo et al., 2007).

Les glycoprotéines de la MEC comme la fibronectine, la laminine, la vitronectine, le collagène, l'élastine ... dotées principalement de propriétés d'adhésion ont servi de facteurs pour guider certains processus cellulaires (Tableau III) (Cutler and García, 2003; Furth et al., 2007; Zhang et al., 2010).

Tableau III: Exemple de protéines de la MEC utilisées pour la fonctionnalisation des surfaces des biomatériaux et leurs principales caractéristiques

Protéine	Propriétés	Principales Fonctions	Références
Fibronectine	Attachement cellulaire (RGD), Fixation du collagène, héparine, fibrine...	Support structural Signalisation cellulaire	(Lewandowska et al., 1992) (Rezania and Healy, 1999)
Collagène	Faible antigénicité Biocompatibilité Biodégradabilité	Protéine de structure	(Elloumi et al., 2009; Geissler et al., 2000)
Vitronectine	Protéine multi-domaines Fixation du collagène, glycosaminoglycanes, héparine	Régulation de la formation de caillots Régulation de la réponse immunitaire, fournit des signaux biologiques pour l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire	(Heng et al., 2012)
Laminine	Principal composant de la membrane basale, de l'épithélium sous-jacent et des cellules endothéliales	Self-assembly and binding to several matrix proteins and integrins	(Heng et al., 2012)
Elastine	Protéine de structure Principal composant du tissu conjonctif des artères, ligaments, peau et du poumon	Promotion de l'adhésion cellulaire Migration cellulaire	(Nakamura and Whited, 2003)

II.4.4.2 Modification de surface par des domaines de biomolécules actives

Parmi les objectifs de la fonctionnalisation des surfaces, le contrôle du comportement cellulaire à travers des étapes précises telles que l'adhésion, l'assemblage, la prolifération... Des études structurales et protéomiques des différentes protéines de la MEC, ont fourni des données sur la possibilité d'exploiter une partie des protéines c'est-à-dire des domaines et ou motifs impliqués dans des applications spécifiques recherchées.

Il a été rapporté que l'adsorption de protéines entières à la surface des matériaux peut entraîner un masquage des sites de fixation en fonction de la méthode du coating (Lewandowska et al., 1992) et un risque antigénique (Yewdell and Bennink, 2001). De plus, l'utilisation de fragments recombinant de protéines telle que la FN offre plusieurs avantages comparé à la molécule entière. En effet, cette approche participe dans la réduction de l'antigénicité et la sélection ciblée des domaines dont les réactions sont souhaitées grâce à la souplesse de l'ingénierie recombinante.

Ainsi, plusieurs motifs peptidiques ont été isolés à partir de protéines de la MEC (tableau IV) dont le domaine adhésif « arginine-glycine- acide aspartique » (RGD) qui est spécifiquement reconnu par la cellule via les récepteurs transmembranaires des intégrines. Il demeure le plus couramment incorporé à la surface des biomatériaux lors de leur fonctionnalisation (Jou et al., 2007). La fibronectine fait partie des protéines naturelles qui contiennent le RGD et qui a fait l'objet de nombreuses études.

Tableau IV: Exemple de motifs peptidiques de protéines de la MEC (Kwak et al., 2013).

Protéine	Domaine extrait
Fibronectine	RGD
	KQAGDV
	PHSRN
Laminine	LGTIP
	LRE
	PDGSR
Collagène	DGEA
	GFOGER
Elastine	VAPG

Ainsi, la fibronectine et ses domaines constituent un candidat intéressant pour la fonctionnalisation de surfaces de biomatériaux afin de promouvoir leur intégration. Avant de détailler l'utilisation de cette protéine à ces fins, nous allons l'étudier et la caractériser.

II.5 LA FIBRONECTINE

II.5.1 Introduction

La fibronectine a été découverte pour la première fois en 1948 à partir du plasma et mise en évidence par co-précipitation avec le fibrinogène. Longtemps, elle fût associée à une forme dérivée de ce dernier jusqu'à ce que sa purification via des anticorps anti fibrinogène vienne contredire cette propriété. Elle fût désignée sous le nom de « cold insoluble globulin » pour sa capacité à précipiter à de basses températures. Le nom fibronectine dérive du latin : les mots « fibra » et « nectere » signifient « fibre » et « fixer » respectivement (Xu and Mosher, 2011). Des données portant sur sa structure primaire ont mis en évidence la présence de séquences d'acides aminés hautement conservées entre plusieurs espèces ce qui fait d'elle une protéine ubiquitaire, présente chez tous les vertébrés. La fibronectine constitue une composante principale de la matrice extracellulaire puisqu'elle est impliquée dans des processus biologiques vitaux tels que l'adhésion cellulaire, la migration, homéostasie, l'organisation du cytosquelette. Elle est exprimée par plusieurs types cellulaires embryonnaires et adultes. La forme soluble de la FN circule dans le sang alors que la forme cellulaire est assemblée par les cellules. Elle est composée par deux sous unités similaires mais présentant des différences entre elles (Kornblihtt et al., 1985; Mao and Schwarzbauer, 2005).

II.5.2 Caractérisation morphologique de la fibronectine

L'observation par microscopie électronique des fragments de fibronectine montre une population homogène de longs brins souples bien séparés qui peuvent être identifiés clairement comme correspondant à des molécules individuelles de fibronectine (Figure 7a). Chaque brin de fibronectine possède une morphologie en « v » (Erickson et al., 1981) (Figure 7b).

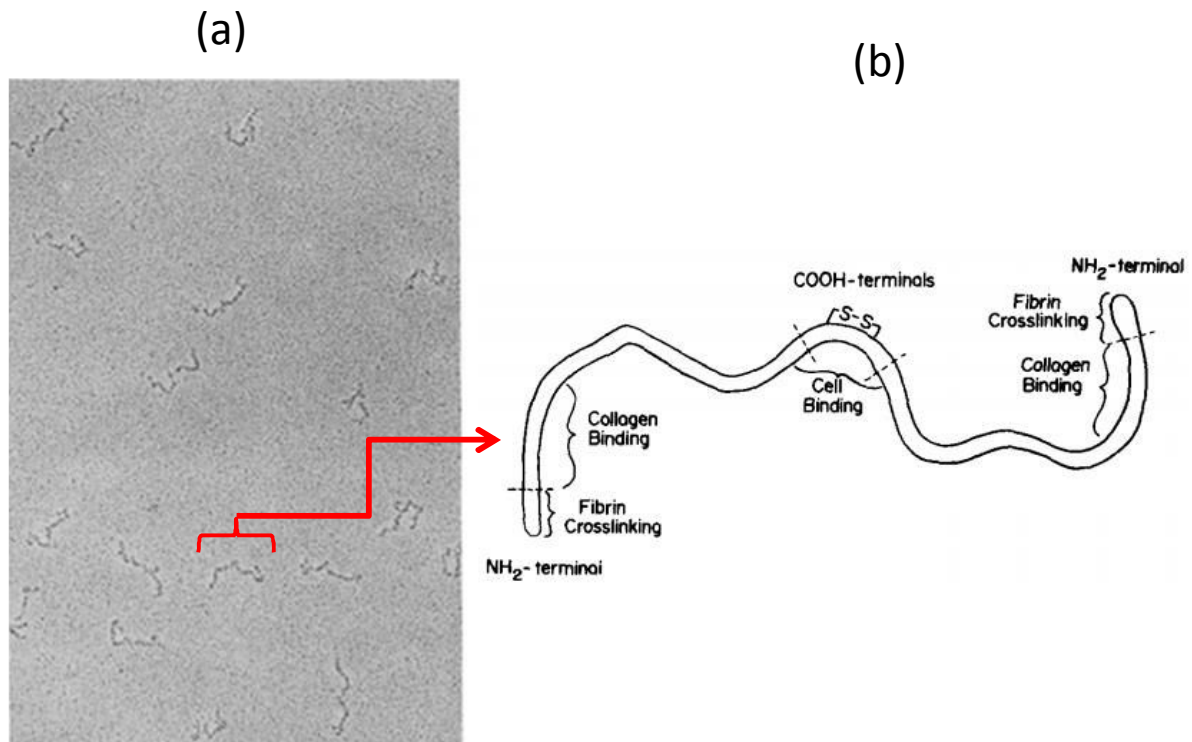


Figure 7: Micrographie de molécules natives de fibronectine (a) et schéma représentatif d'une molécule de fibronectine (b) (Erickson et al., 1981).

II.5.3 Organisation du gène de la fibronectine

Le gène de la FN entière code pour une séquence composée par trois chaînes d'acides nucléiques reliées entre elles: F1 et F2 codée chacune par un exon et F3 codée par au moins deux exons. On peut admettre que le gène de la FN soit le résultat d'une fusion et d'une amplification de trois séquences primitives lors du processus de l'évolution (Vibe-Pedersen et al., 1984). L'expression de la fibronectine est régulée à différents niveaux : la transcription, l'épissage alternatif et la sécrétion protéique.

La région promotrice a été séquencée et a montré la présence de séquences consensus correspondant à des éléments de régulation. La transcription s'opère sous le contrôle du SRE (Serum response element) et de l'AMPc (Schwarzbauer, 1991). Elle est stimulée en présence du transforming growth factor (TGF), de l'endothelial growth factor (EGF), des glucocorticoïdes et les hormones thyroïdiennes et inhibée par les œstrogènes et la transformation oncogénique (Romberger, 1997).

Le gène de la FN est transcrit en un ARN pré-messager subissant l'épissage alternatif qui diffère selon le type cellulaire. Ce processus se réalise en trois différentes positions qui sont les extra domaines EDA et EDB et la région de variabilité (V) ; occupant les espaces entre FNIII11-12, FNIII 7-8 et FNIII 14-15 respectivement (Pankov and Yamada, 2002).

Ainsi, cinq différents types d'ARN messagers matures peuvent être générés suite à l'épissage alternatif (Schwarzbauer, 1991). Il en résulte jusqu'à vingt isoformes pouvant être obtenues suite à la transcription de la FN dans la mesure où les permutations entre les sites d'épissage sont possibles (Kornblihtt et al., 1996). Ces isoformes présentent des longueurs de séquence différentes et ceci est fortement corrélé à la fonction pour laquelle elles codent. Des études ont montré la présence des extra domaines dans les ARNm codant pour les fibroblastes (siège de production de la FN cellulaire fortement impliquée dans les processus d'adhésion, de prolifération, de croissance...). Ces mêmes domaines sont absents dans les ARNm du foie (siège de production de la FN du plasma) (To and Midwood, 2011). Les ED permettent de prolonger la distance de part et d'autre du domaine de fixation cellulaire et par conséquent améliorer ses propriétés adhésives (Pankov and Yamada, 2002).

II.5.4 Formes de la fibronectine

La FN est synthétisée sous deux formes structurellement et fonctionnellement similaires. Elles présentent toutes les deux des similitudes au niveau de la composition en acides aminés, des structures secondaire et tertiaire, des types et de l'organisation des domaines et dans la structure des carbohydrates. Sur le plan de la bioactivité, il est difficile de faire la distinction comme dans certains essais d'opsonisation ou d'adhésion avec des substrats. Toutes fois les différences résident au niveau de la solubilité, de la structure primaire, de la composition en domaines et certains rôles biologiques où la FN cellulaire apparaît plus active dans des processus de contrôle de la morphologie et de la transformation cellulaire (Hynes and Yamada, 1982). Certains de ces points sont mis en évidence dans la figure 8 et le tableau V.

Tableau V: Fonctions de la fibronectine du plasma et de la fibronectine cellulaire au cours du processus de cicatrisation des plaies (To and Midwood, 2011).

Fibronectine du plasma	Fibronectine cellulaire
Evènements de réparation précoce	Evènements de réparation tardive
Stabilisation de caillot de fibrine	Adhésion cellulaire
Adhésion des plaquettes	Étalement cellulaire
Étalement des plaquettes	Prolifération cellulaire
Agrégation des plaquettes	migration cellulaire
	organisation tissulaire
	assemblage de la matrice extracellulaire

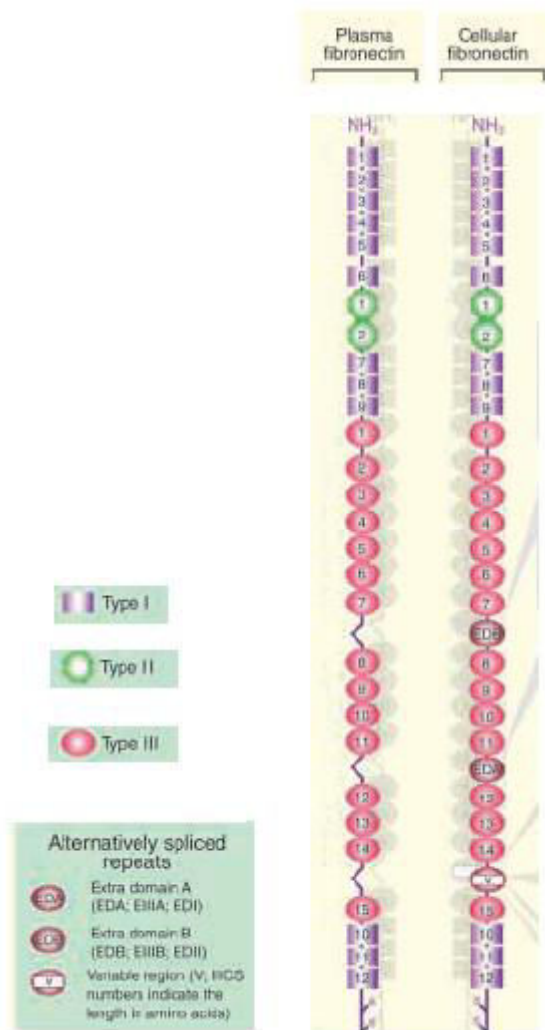


Figure 8: Comparaison des structures de la fibronectine cellulaire et du plasma (Pankov and Yamada, 2002).

II.5.4.1 La fibronectine plasmatique

C'est la forme soluble, inactive et compacte circulant dans le plasma à une concentration de 300-400 µg/ml. Elle est sécrétée par les hépatocytes. Les extra domaines A et B sont absents et la région de variabilité est présente uniquement sur une seule unité de la FN soluble (Bradshaw and Smith, 2014; Mao and Schwarzbauer, 2005; To and Midwood, 2011).

Elle a un rôle important dans la thrombose (Xu and Mosher, 2011) et intervient principalement dans la réparation des tissus et la survie neuronale suite à une ischémie cérébrale (Mao and Schwarzbauer, 2005).

II.5.4.2 La fibronectine cellulaire

C'est la forme insoluble, organisée en un réseau fibrillaire et sécrétée par plusieurs types cellulaires, principalement les fibroblastes, les cellules endothéliales, les chondrocytes, les cellules synoviales et les myocytes. Il s'agit d'un mélange d'isoformes résultant de l'épissage alternatif au niveau des extra domaines EIIIB, EIIIA et le domaine IIICS. Ces différentes isoformes sont associées à de nombreux processus physiologiques comme le remodelage, la réparation des tissus et la cicatrisation (Bradshaw and Smith, 2014; Mao and Schwarzbauer, 2005; To and Midwood, 2011). Le tableau montre les différences en termes de fonction biologique entre les deux formes, tandis que la figure montre les principales différences de structure entre les deux types de fibronectine.

II.5.5 Structure de la fibronectine

La FN est une glycoprotéine qui est caractérisée par une très haute flexibilité se traduisant par sa capacité à se compacter et à se déplier en fonction des conditions physiologiques de l'environnement local (Hynes and Yamada, 1982).

Elle se présente sous une forme dimérique composée de deux chaînes reliées par covalence entre elles par un pont disulfure au niveau de l'extrémité C-terminale (Figure 9). La protéine fait une taille totale d'environ 450 à 500 kDa (Bradshaw and Smith, 2014).

Chaque sous unité est constituée par trois types de domaine Type I, II et III reliés par de courtes régions flexibles et organisés en une chaîne linéaire d'unités répétitives d'acides aminés de ~ 40, 60 et 90 acides aminés respectivement (Figure 9). Ces modules ont été retrouvés dans d'autres protéines que la FN spécialement le domaine III qui est le plus ubiquitaire.

Ce dernier est présent à raison de ~ 2% dans les protéines animales et occasionnellement chez les plantes. Cette structure multimodulaire de la FN lui confère sa flexibilité (Mao and Schwarzbauer, 2005).

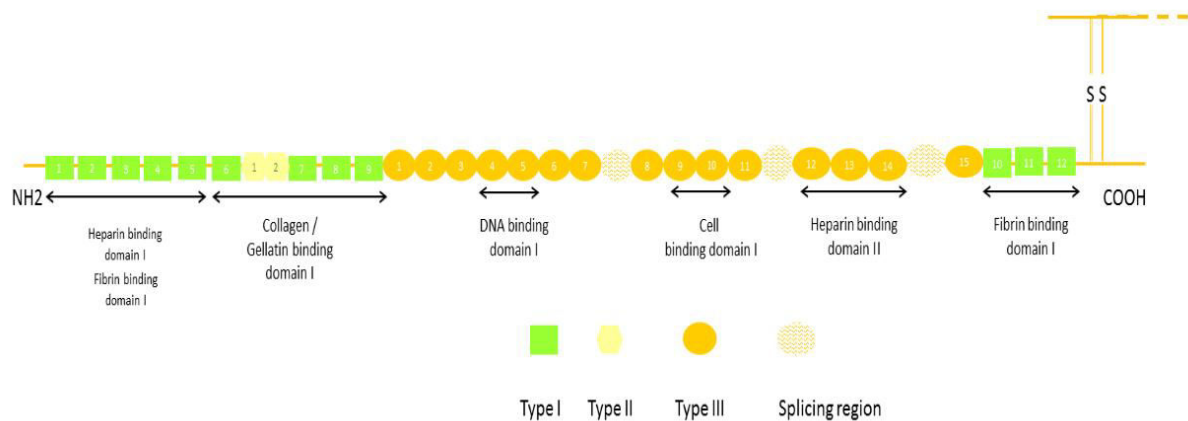


Figure 9: Domaines composant la FN

II.5.5.1 Unités structurales de la fibronectine

Le type I de la fibronectine est constitué par un enchaînement de 12 modules distribués sur les parties N et C terminal de la protéine (figure 10 a). Deux modules seulement composent le type II. Ces deux types contiennent chacun quatre cystéines donnant lieu à deux ponts disulfure nécessaires à la stabilité structurale (figure 10 b).

Le type III représente 90% de la séquence entière et a été identifié dans 67 protéines (Xu and Mosher, 2011). Il est composé par 17 modules dont 15 sont exprimés d'une manière constitutive et deux sont le résultat de l'épissage alternatif. Ce type présente au niveau des résidus III-7 et III15 une cystéine non apparié (figure 10 c). Il est dépourvu de pont disulfure intradomaine ce qui fait que cette structure influence l'extensibilité et la fonctionnalité de la FN. (Bradshaw and Smith, 2014; Mao and Schwarzbauer, 2005).

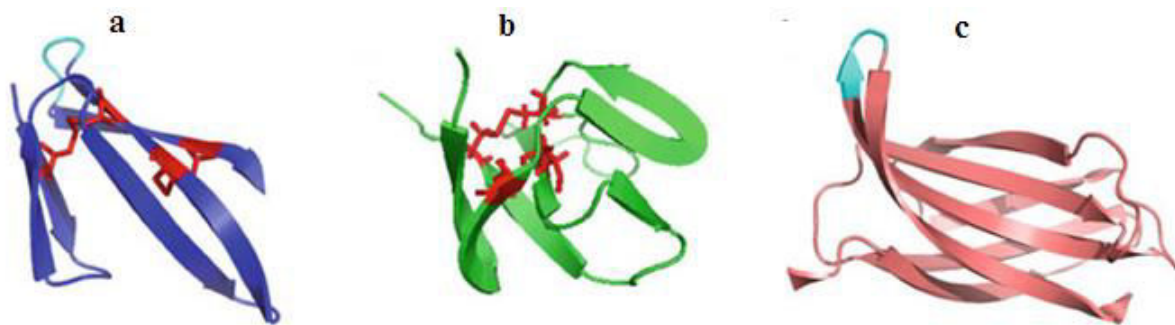


Figure 10: Modélisation des structures tridimensionnelles des trois domaines de la FN

(a) Structure du domaine I-5. Les résidus cystéine et les ponts disulfures sont indiqués en rouge. (b) Structure du domaine II-2. Les résidus cystéine et les ponts disulfures sont indiqués en rouge. (c) Structure du domaine III-10 de la FN. Les résidus Arg-Gly-Asp (RGD) sont présentés en cyan (Xu and Mosher, 2011).

La structure à haute résolution du résidu 10 du type III de la fibronectine (figure 11), déterminée par cristallographie, a montré que les modules de ce dernier étaient composés de deux couches de feuillets β . Celles-ci sont agencées en trois feuillets β antiparallèles pour l'une et quatre brins antiparallèles pour l'autre reliés par une boucle flexible et renfermant la séquence de reconnaissance des cellules RGD (Dickinson et al., 1994).

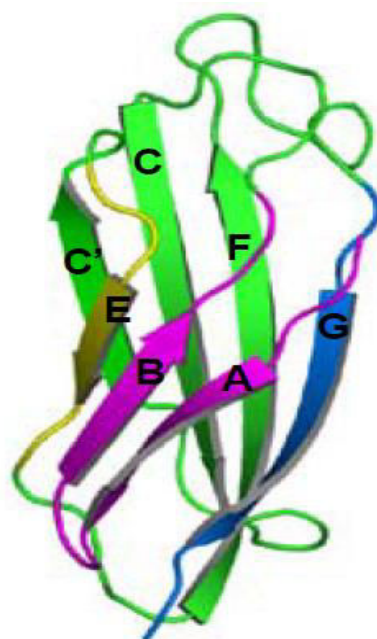


Figure 11: La structure du ruban du module III10 de la FN humaine.

A, B et E forment le premier feuillet C, C', F et G le deuxième (Dickinson et al., 1994)

II.5.5.2 La fibronectine : une protéine substrat pour les cellules

Fibronectine et ligands

La FN est organisée en un réseau très ordonné qui fait intervenir des domaines impliqués dans diverses activités d'adhésion en tant que ligands spécifiques. Ces domaines sont organisés en modules fonctionnels, présents sur toute la surface de la FN, et participant à l'interaction avec une multitude de partenaires. Ceux-ci incluent les récepteurs des surfaces cellulaires, le collagène, l'héparine, la fibrine et l'actine.

La FN a montré des capacités de liaison à *Staphylococcus aureus* mais pas à *Escherichia.Coli* ou *Mycobacterium butyricum* via son domaine N-Terminal. Cette interaction joue un rôle important dans le processus d'opsonisation de la bactérie par la glycoprotéine (Mosher and Furcht, 1981).

D'autre part, un peptide de 30 à 40Kda, localisé sur le domaine II et en partie sur le domaine I, fût un des premiers domaines à avoir été caractérisé comme étant responsable de la fixation du collagène et de la gélatine.

En outre, lors des premières étapes de cicatrisation des plaies, la liaison fibronectine-fibrine du sang peut être importante via ses sites localisés sur les parties N et C terminal.

De plus, deux régions de la FN localisées dans les modules I4-5 et III 12-14 ont montré de l'affinité à un glycosaminoglycane GAG largement caractérisé qui est l'héparine. Cette liaison est étroitement impliquée dans l'organisation structurale de la MEC.

L'interaction est sensible à la force ionique et au pH, mais relativement insensible à la température. Toutefois, cette affinité est plus importante dans le domaine III plus précisément III13 que dans le domaine I grâce à la présence d'une paire de résidus d'arginine RRAR essentiellement responsable de cette interaction et paraît nettement moins sensible à la concentration physiologique en calcium (Cardin et al., 1991; Hynes and Yamada, 1982; Schwarzbauer, 1991).

La FN peut également se fixer aux protéoglycanes. Cette liaison peut être réalisée par les chaînes latérales des glycosaminoglycanes mais, dans au moins un cas, par l'intermédiaire de la protéine core (Schwarzbauer, 1991). Le tableau VI résume les principales interactions de la FN.

Tableau VI: Ligands et rôles biologiques des domaines de la FN

(Hynes and Yamada, 1982; Mosher and Furcht, 1981; Potts and Campbell, 1996; Xu and Mosher, 2011)

Domaine	Ligands	Rôle
Domaine N-Terminal I4-5	Fibrine	Assemblage de la MEC
	Thrombospondine	
	Héparine	Interaction avec les bactéries
	Composé microbien de surface des bactéries Gram positif Staphylococcus aureus	
Domaine I6-9, II	Collagène gélatine	Résistance mécanique
Domaine III9-10	Intégrines	Attachement cellulaire
Domaine III12-14	Héparine	Migration cellulaire
	GAG	
Domaine C-Terminal	Fibrine	Attachement cellulaire
	Intégrines	Fibrillogenèse

Fibronectine et intégrines

Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques transmembranaires qui interviennent dans la médiation de l'adhésion cellulaire, à l'organisation du cytosquelette et à l'assemblage de la matrice extracellulaire (Magnusson and Mosher, 1998).

Un site a été identifié, au niveau de la fibronectine, comme étant responsable de l'adhésion cellulaire. Il s'agit du tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD) localisé uniquement sur le module 10 du domaine III de la FN (Figure 12).

L'alignement des séquences du type III avec le module 10 a montré une homologie optimale sur l'ensemble de la séquence sauf pour le cas de ce tripeptide.

Ce dernier est également présent dans d'autres protéines de la MEC (Kornblihtt et al., 1985; Mao and Schwarzbauer, 2005; To and Midwood, 2011).

D'autre part, il a été démontré qu'une séquence composée de 5 acides aminés PHSRN adjacente au RGD et localisée dans le domaine III9 intervient dans la modulation de l'adhésion cellulaire puisque cette dernière est réduite en son absence (Mao and Schwarzbauer, 2005).

FNIII10

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGN
SPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASS
KPISINYRT

FNIII9

GLDSPTGIDFSDITANSFTVHWIAPRATITGYRIRHHPEHFSG
RPREDRVPHSRNSITLTNLTPGTEYVVSIVALNGREESPLLIG
QQST

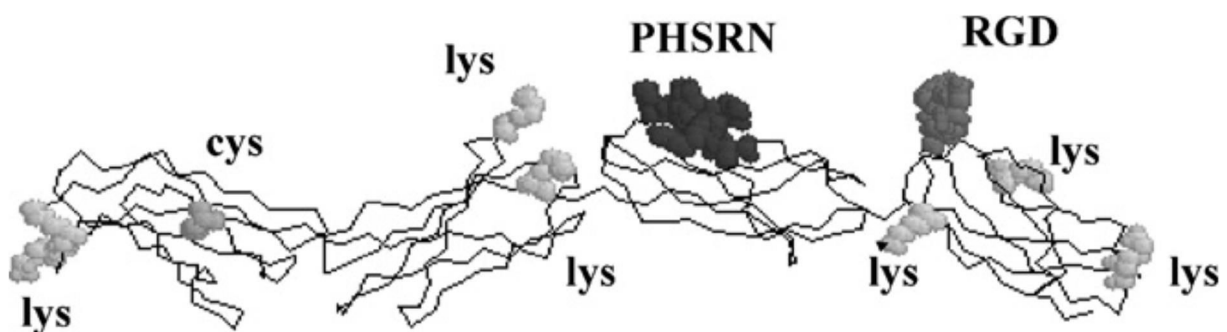


Figure 12: Séquences et modèles de la structure cristalline des modules 7-10 du domaine III de la fibronectine mettant en évidence les peptides PHSRN et le RGD (Cutler and García, 2003)

Lorsque ces sites (RGD et PHSRN) sont en présence des récepteurs cellulaires quatre cas de figure peuvent avoir lieu (représentés dans la figure 13): Le peptide peut reproduire l'activité

biologique de la protéine native en se fixant aux intégrines exposées à la surface cellulaire (Fig13.a).

Cette étape est responsable de la médiation directe de l'adhésion et de la migration cellulaire. De plus, ce peptide en présence cellulaire peut jouer le rôle d'inhibiteur compétitif à tout autre ligand adhésif capable de fixer les récepteurs d'intégrines (Fig13.b).

Enfin, il a été reporté que ces peptides participent au processus de signalisation des intégrines et par conséquent activent les interactions cellules-cellules (Fig.13c) (Yamada, 2000).

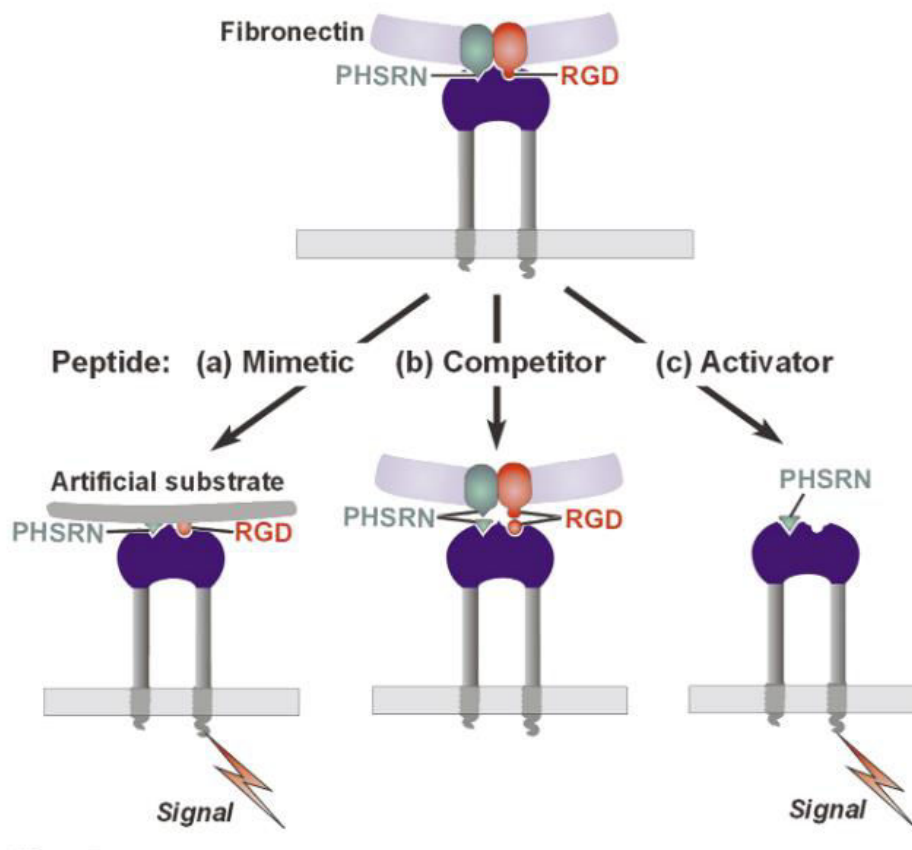


Figure 13: Mécanisme d'action d'un peptide contenant les séquences PHSRN et RGD en présence d'intégrines (Yamada, 2000).

Il est à noter que la forme soluble de la FN n'entre pas en compétition lors de l'attachement des cellules et n'exerce pas d'activité d'inhibition (Mosher and Furcht, 1981).

II.5.6 La fibronectine et ses rôles biologiques

La FN est un élément clé dans de nombreux processus cellulaires in vivo (Mao and Schwarzbauer, 2005). Elle joue un rôle important dans plusieurs mécanismes biologiques

comme la croissance et l'adhésion cellulaire grâce à ses fragments qui agissent comme des substrats spécifiques aux intégrines (Yamada, 2000).

Certaines études ont montré son implication dans le développement précoce, la différenciation et le contrôle de la morphologie de certaines lignées cellulaires. Chacune de ces fonctions citées entraîne des conséquences fonctionnelles sur la protéine (Kornblihtt et al., 1985; Mao and Schwarzbauer, 2005; Romberger, 1997).

Des études ont montré que l'interaction de la fibronectine avec les récepteurs des intégrines constitue une étape fondamentale au processus d'assemblage de la MEC (Romberger, 1997). L'utilisation d'anticorps dirigés contre le domaine de fixation cellulaire incluant le RGD inhibe la fibrillogenèse. Des tests d'adhésion *in vitro* ont montré l'implication de la région I1-5 du domaine N terminal de la FN dans le processus de l'assemblage de la MEC (Mao and Schwarzbauer, 2005). Ce dernier nécessite une interaction entre le cytosquelette et la FN. Cette liaison s'établit grâce aux intégrines. En effet, ces dernières permettent la fixation de la FN au cytosquelette d'actine puisque d'une part, elles fixent la FN principalement via les récepteurs $\alpha 5 \beta 1$ et de l'autre elles interagissent avec les protéines du cytosquelette via leurs domaines cytoplasmiques. Les récepteurs $\alpha v \beta 3$ ont également montré leur rôle dans le support de l'assemblage des courtes fibrilles de la FN (Kinsey et al., 2008). La fixation de la FN sur les intégrines contribue à son changement conformationnel puisqu'elle se déplie pour exposer ses divers sites cryptiques (Figure 14) ; ce qui favorise l'interaction FN-FN (Mao and Schwarzbauer, 2005).

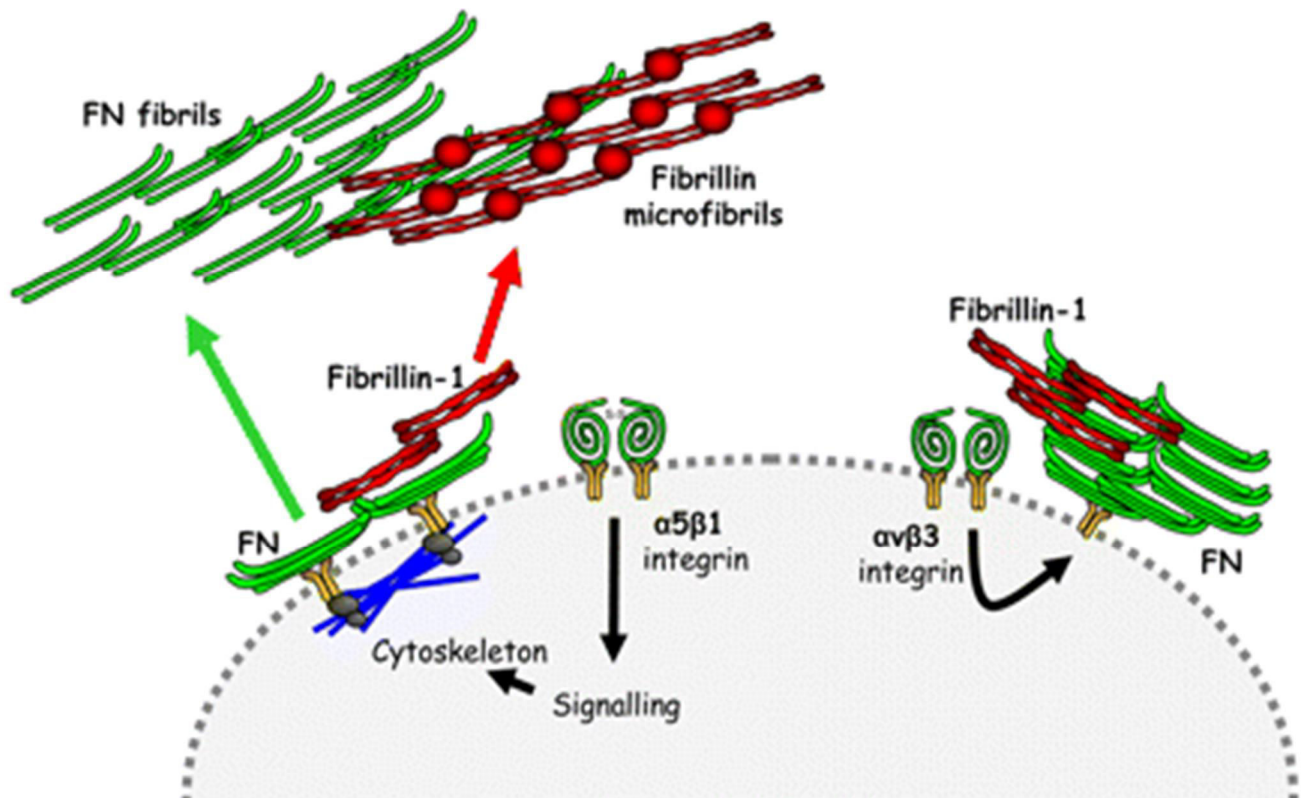


Figure 14: Schéma représentatif de l'interaction Fibronectine-intégrines et formation de réseau fibrillaire d'après (Kinsey et al., 2008).

Tout au long de la surface de la FN, existent des sites de fixation à d'autres fibronectines d'affinité différente. Cette propriété permet à la glycoprotéine de former un réseau fibrillaire très complexe désigné sous le nom de super-fibronectine.

Ce multimère intervient lors des processus de cicatrisation des plaies et favorise l'adhésion cellulaire (Romberger, 1997). Les domaines III1-2 sont importants dans la formation d'une matrice insoluble et stable. D'autres interactions ont également lieu entre III2-3 et III12-14 ou III1 et III7 (Mao and Schwarzbauer, 2005).

La fibronectine est aussi impliquée dans l'agrégation, l'étalement et la motilité et intervient également dans des processus physiologiques comme la l'angiogenèse (Mao and Schwarzbauer, 2005).

II.6 Méthodes d'obtention de la fibronectine

L'association de l'ingénierie des protéines et de la médecine régénérative a permis la conception et le design d'une nouvelle génération de matériaux dont les surfaces ont été fonctionnalisées par des biomolécules actives de la MEC. Plusieurs méthodes ont été développées pour l'obtention de ces dernières.

II.6.1 Extraction et purification de la fibronectine à partir de plasma

Le plasma humain ou animal renferme des protéines d'intérêt thérapeutique, notamment la fibronectine. Celle-ci peut être isolée sélectivement par une étape de chromatographie permettant la séparation protéique d'une fraction spécifique du plasma en une seule étape. L'objectif de cette séparation est de disposer d'une préparation protéique pure destinée à l'injection sous-cutanée chez des patients dans une perspective d'application thérapeutique. Des transfusions de fibronectine cryoprécipité ont été opérées dans le but de traiter des patients souffrant d'un trauma, d'une septicémie, ou de brûlures (Clarke and Blajchman, 2012).

Ainsi, les protéines isolées du plasma doivent être exemptes de toutes traces de facteurs immunogènes (protéines ou anticorps), ce qui requiert des systèmes de purification très sélectifs. Le procédé de séparation de la fibronectine du reste des protéines du plasma se base sur la cryoprécipitation du plasma déjà pré-purifié (précipitation au gel d'alumine et/ou à basse température) puis sa resolubilisation dans l'eau suivie d'une séparation chromatographique via une résine échangeuse d'anions du type DEAE. La matrice est dotée de propriétés de porosité et d'hydrophobicité et consiste en un gel macro réticulé responsable de la rétention du complexe facteur VIII-facteur von Willebrand et de la fibronectine (Burnouf and Burnouf, 2004).

Ainsi, les différentes autres protéines composant le plasma peuvent être récupérées sélectivement selon un gradient croissant de force ionique du tampon d'élution.

La fibronectine et le facteur VIII-facteur von Willebrand ont deux poids moléculaires différents d'où elle est séparée de l'éluat contenant le facteur VIII-facteur von Willebrand par tamisage moléculaire via une colonne de Séphacryl® S-400 (R) (Burnouf and Burnouf, 2004).

La sélection des donneurs s'opère suivant un plan d'analyse et de contrôle rigoureux, néanmoins, le risque de transmission d'agents pathogènes pouvant aller du léger au grave voir même mortel n'est pas à écarter. Nous citerons dans le tableau VII certaines complications.

Tableau 1: Certaines complications résultant de l'adjonction de composés plasmatiques

(Clarke and Blajchman, 2012)

Réaction	Fréquence approximative	Signes et symptômes
Allergie	1 cas sur 100	Urticaire et érythème
Surcharge circulatoire post-transfusionnelle	1 cas sur 700	Tachycardie, tension veineuse élevée et hypertension
Réaction hypotensive isolée	-	Hypotension parfois accompagnée d'urticaire et de nausée
Réaction hémolytiques transfusionnelles immédiates	Rare	Etat de choc, frissons, fièvre, douleurs thoraciques et dorsales et saignements
Anaphylaxie	Rare	Hypotension, obstruction des voies respiratoires, anxiété et nausée
Contamination bactérienne	Très rare	Fièvre, frissons, hyperthermie, nausée, vomissements, diarrhée, hypotension, douleurs abdominales et musculaires
Maladie infectieuse	Risques résiduels d'infections virales	Signes et symptômes variant selon la maladie infectieuse

Ainsi, du fait des risques que présente la technique d'extraction et de purification des protéines du plasma, la recherche d'alternatives performantes a amené au développement de nouvelles méthodes parallèles dont la technologie recombinante.

II.6.2 Production de la fibronectine recombinante

La synthèse des matrices mimétiques fait intervenir la technologie de l'ADN recombinant pour le design et la production de fragment recombinant d'intérêt codant pour plusieurs fonctions recherchées nécessaires au processus de l'intégration de l'implant.

Pour comprendre la technologie recombinante et l'intérêt de son utilisation, il est nécessaire de se plonger dans les mécanismes fondamentaux qui la régissent.

II.6.2.1 La technologie recombinante

Le génie génétique représente un excellent outil pour la production et la modification de molécules qui requièrent des étapes complexes par voie chimique. Il permet également de remplacer une protéine qui est déficiente ou anormale, de personnaliser des protéines déjà existantes interférant avec un organisme ou à en créer de nouvelles (fragment, domaine ou protéine entière) pour des applications cliniques spécifiques (Carter, 2011).

Les protéines thérapeutiques synthétisées par ingénierie des protéines ont vu le jour depuis le début des années 1980 comme l'hormone de croissance humaine, l'interféron- α , l'érythropoïétine...)(Carter, 2011). La production de protéines recombinantes dans les secteurs pharmaceutiques et médicaux offre plusieurs avantages à différents niveaux:

- Production, elle garantit la production de quantités importantes de protéines selon le système d'expression choisi
- Sécurité : puisqu'elle présente une alternative plus sécurisante en regard à d'autres procédés d'obtention de molécules issues de sources naturelles cités précédemment
- Economique, la fibronectine humaine commerciale reste relativement chère (Hsu et al., 2004)(1mg- 215 €).

Le procédé biotechnologique utilisé pour la synthèse de protéines recombinantes fait intervenir des acteurs clés :

- un ADN matrice qui contient la partie de la séquence d'intérêt à cloner
- un vecteur d'expression permettant de véhiculer la séquence d'intérêt codant pour la protéine recherchée,
- un organisme hôte qui synthétise la protéine,
- un procédé de production, d'extraction, de séparation et de purification de la protéine recombinante,
- une phase de caractérisation biologique de la protéine recombinante

II.6.2.2 Systèmes d'expression utilisés dans la production de protéines recombinantes

La production des protéines d'intérêt thérapeutique et biotechnologique peut être réalisée dans différents organismes hôtes tels que les bactéries, les levures, les champignons, les cellules végétales et d'insectes, les cellules de mammifères, animaux transgéniques, etc.

Le choix du système d'expression adéquat est une étape déterminante puisqu'elle dépend de plusieurs paramètres : la nature de la protéine d'intérêt, son origine, l'application biologique, la quantité de protéines requise et surtout du temps et du coût de fabrication dans une perspective de transposition d'échelle. Dans le paragraphe suivant nous allons détailler les différents systèmes utilisés pour l'expression des protéines recombinantes.

- **Systèmes d'expression procaryotes**

La première protéine hétérologue à avoir été produite pour un usage thérapeutique fût l'insuline humaine (Humulin®) créée par Genentech et approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 1982 (Goeddel et al., 1979) dans *Escherichia coli*. Ce système a été largement documenté et offre plusieurs avantages. Le tableau VIII résume les principaux avantages et inconvénients de l'utilisation d'*E.Coli* comme système hôte.

Tableau VIII: Avantages et inconvénients de la production de protéines recombinantes dans différents compartiments d'*E.Coli* (Choi et al., 2006)

	Avantages	Inconvénients
Production cytosolique	Taux d'expression élevé Construction plasmidique simple Corps d'inclusion (facilité de purification, protection contre les protéases et non toxicité des protéines produites)	Purification complexe Formation incorrecte des ponts disulfures (dénaturation agressive et étapes de refolding complexes)
Sécrétion	Purification simple Repliement correct Production sous forme soluble Prévention contre la protéolyse	Mauvais clivage de la séquence signal Lyse cellulaire
Excrétion	Purification simple Repliement correct Production sous forme soluble Prévention contre la protéolyse	Lyse cellulaire Excrétion pas ou peu effective Taux d'expression faible

D'autres systèmes procaryotes ont été utilisés pour la production des protéines hétérologues à grande échelle notamment *Bacillus subtilis* dont le génotype et la physiologie ont été

caractérisés. Ce système est principalement exploité pour sa grande capacité à sécréter les protéines directement dans le milieu de culture ce qui réduit le temps et le coût liés à l'étape d'extraction. Cependant, il a été rapporté que le taux d'expression était plutôt faible (Vavrova et al., 2010)

- **Systèmes d'expression eucaryotes et organismes transgéniques**

Les champignons filamenteux et les levures font partie des hôtes utilisés pour la production des protéines de haut poids moléculaire. Ils possèdent des systèmes enzymatiques capables de réaliser les modifications post-traductionnelles. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* et *Kluyveromyces lactis* sont les principaux systèmes utilisés. *Saccharomyces cerevisiae* fût l'hôte utilisé pour la production du premier vaccin humain de l'antigène de surface de l'hépatite B (Idris et al., 2010). Le tableau IX résume les principaux avantages et inconvénients de la levure.

Tableau IX: Avantages et inconvénients de la levure comme système d'expression (Porro et al., 2005)

Avantages	Inconvénients
Absence de risque pour l'homme ou l'environnement	Quelques différences dans les modifications post-traductionnelles
Large utilisation dans les procédés biotechnologiques	Faible niveau d'expression
Procédé de culture maîtrisé	
Modifications Post-traductionnelles	

Les cellules de mammifères ont été également utilisées pour la production de protéines hétérologues notamment les anticorps monoclonaux (Jiang et al., 2006). Ce système présente l'avantage de permettre la culture en masse et de préserver l'activité biologique de la protéine. Parmi les plus utilisés, les cellules ovariennes de Hamster (CHO) (Ventini et al., 2010).

La culture de cellules d'insectes, grâce au système d'expression du baculovirus, est communément utilisée. Elle offre l'avantage de réaliser toutes les opérations de maturation des protéines. Cependant, elle requière une oxygénation élevée et reste sensible aux forces de cisaillement (Fan et al., 2010).

Les cellules végétales constituent aussi un système performant pour la culture des protéines de haut poids moléculaire garantissant un coût de production réduit. Elles sont également capables d'effectuer les modifications post-traductionnelles.

Les plantes transgéniques ont été d'excellents hôtes pour la production de protéines thérapeutiques comme l'interféron (Edelbaum et al., 1992) et l'interleukine (Gutiérrez-Ortega et al., 2005). L'albumine humaine a été produite dans la pomme de terre et le tabac (Farran et al., 2002).

La technologie recombinante a fait également appel aux animaux transgéniques (souris, lapin, cochon, brebis, vache, chèvre, etc.). Le facteur VIII de la coagulation a été produit chez le cochon (Paleyanda et al., 1997). Ces derniers combinent à la fois les niveaux d'expression et les modifications post-traductionnelles rencontrés dans les systèmes bactériens et en culture cellulaire eucaryote respectivement.

Cette alternative reste cependant, controversée du fait de l'existence de risques sur la santé de l'animal et la contamination du produit par des virus ou d'autres agents pathogènes provenant de l'hôte. Le tableau X résume quelques caractéristiques des systèmes les plus utilisés.

Tableau X: Systèmes les plus couramment utilisés et quelques caractéristiques
(Demain and Vaishnav, 2009)

Caractéristiques de la protéine	Bactérie	Levure	Cellules de mammifères
Concentration	+++	+++	+++
Poids moléculaire	-	-	-
Ponts dissulfures	Limité	Non limité	Non limité
Sécrétion	-	+/-	+
Etat d'agrégation	Corps d'inclusion	Native	Native
Repliement	-	+	+
Glycosylation	Non	Possible	Possible
Contamination	Non	Non	Possible

II.6.2.3 Limites de la technologie recombinante

Bien qu'elle présente une alternative attrayante pour la production des biomolécules à haute valeur ajoutée, la technologie recombinante est limitée par certains paramètres : les faibles taux d'expression des systèmes utilisés et l'agrégation des protéines sous forme de corps d'inclusion inactifs.

- **Taux d'expression des protéines recombinantes**

Le système d'expression le plus productif est *E. coli*, bien qu'il présente des niveaux d'expression parfois insuffisants dans une perspective de transposition à grande échelle.

Un fragment recombinant de la fibronectine humaine a été exprimé dans *E. coli* et n'a représenté que 20% approximativement de la totalité des protéines cellulaires. Le niveau d'expression n'a pas dépassé les 5% des protéines totales en utilisant *Saccharomyces cerevisiae* (Kimizuka et al., 1991).

Dans une optique d'optimisation du taux d'expression des protéines hétérologues dans *E. coli*, des stratégies peuvent être adoptées.

Il s'agit dans un premier temps, de réaliser la production de la protéine d'intérêt en fusion avec d'autres partenaires de faible poids moléculaire et hautement exprimées chez *E. coli*. Ces derniers, permettent dans certains cas d'améliorer l'expression de la protéine en question par exemple le cytochrome b5 (Mitra et al. 2005). Une autre approche, toujours dans une optique d'optimisation de l'expression protéique, consiste en la culture à haute densité cellulaire (HCDC) par le biais du fed-batch. Elle permet la réduction du volume réactionnel, le coût de production et l'augmentation de la biomasse et par conséquent de la production en protéine (Matsui et al., 2008).

- **Formation de corps d'inclusion**

La production de protéines hétérologues dans *E. coli* peut s'accompagner dans la plupart des cas de leur agrégation en granules cytoplasmiques ou de corps d'inclusion insolubles (Gnoth et al., 2008). Sous cette forme, les protéines perdent leur configuration tridimensionnelle et deviennent par conséquent inactives.

C'est dans ce contexte, que des solutions visant à optimiser le procédé de culture ont été proposées. Il a été constaté que la température de culture constitue un paramètre clé qui participe visiblement à la réduction des corps d'inclusion (Hoffmann and Rinas, 2004).

En effet, Hoffmann et al (2004) ont montré que la totalité de la production protéique à 37 °C, était obtenue sous forme de corps d'inclusion, alors qu'en abaissant la température à 30°C, 50 mg de protéines recombinantes étaient obtenus sous forme soluble par gramme de cellules.

D'autre part, le type de milieu de culture influe sur l'expression des protéines hétérologues puisqu'il fournit aux cellules une physiologie favorable ou non à la formation de protéines solubles. Il a été démontré que la culture en milieu complexe de type LB suivie d'une induction dans un milieu synthétique a permis la réduction de la formation des corps d'inclusion (Hoffmann and Rinas, 2004).

De plus, lors de la phase d'induction de la culture, il est nécessaire de déterminer la concentration en inducteur afin de contrôler l'expression des protéines hétérologues. En effet, dans le cadre de l'optimisation d'une forme recombinante de la TEV protéase, nous avons montré dans nos précédents travaux, que la diminution de la concentration de l'inducteur : IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) a favorisé l'expression de la protéine d'intérêt dans la phase soluble (Miladi et al., 2011).

Par ailleurs, la solubilisation des corps d'inclusion insolubles et inactifs est possible grâce à l'utilisation d'agents dénaturants comme l'urée ou la guanidine-Hydrochloride. Ces agents permettent d'ouvrir les ponts disulfures qui lient les agrégats. Bien que l'étape de dénaturation soit simple et aboutit généralement à la solubilisation quasi totale des corps d'inclusion, elle reste néanmoins drastique ; d'où la nécessité d'une étape de renaturation.

L'étape de renaturation des corps d'inclusion solubilisés est déterminante pour le bon repliement et l'établissement de la structure tridimensionnelle des protéines. Cependant, elle demeure très complexe et requiert de longues étapes de dialyse aboutissant à l'obtention de faibles rendements surtout pour le cas des protéines de poids moléculaires élevés (Plesniak et al., 2011).

L'expression des protéines sous forme d'agrégats peut se révéler avantageuse. Du fait qu'ils soient denses, la récupération des corps d'inclusion est facilement réalisable par simple centrifugation à faible vitesse (500-1000 g). Cette étape réduit considérablement la contamination par des débris cellulaires et protège les agrégats contre la protéolyse (Takashi, 1995).

Enfin, la solubilité des protéines peut être améliorée en agissant sur la construction et ce en faisant appel à la technologie de fusion.

- **Rendement, qualité et coût de purification des protéines recombinantes**

Dans le cadre de la production de protéines recombinantes à visée thérapeutique, il est nécessaire que les protéines purifiées présentent un degré de pureté élevé, un bon rendement et un coût réduit.

Les techniques classiques de purification des protéines consistent en une succession d'étapes comprenant la précipitation, la chromatographie échangeuse d'ions, le tamisage moléculaire, etc. Ces étapes nécessitent beaucoup de temps et entraînent des pertes de la protéine purifiée.

La purification par chromatographie d'affinité par le biais des tags d'affinité a permis la réduction des étapes à une seule permettant ainsi de raccourcir le temps et de minimiser les pertes du produit purifié. Cependant, le coût reste élevé et l'extrait protéique présente parfois des contaminants. Chaque tag de purification offre un degré de pureté, un rendement de purification et présente un coût différent (Tableau XI). Il est donc possible d'en associer plusieurs dans un seul système sous forme d'un multi tag fusionné avec la protéine d'intérêt. Cette technique a pour but d'optimiser le degré de pureté pouvant atteindre les 98 % et de maximiser la quantité de protéines récupérées (Lichty et al., 2005).

Tableau XI: Comparaison entre différents tag d'affinité (Lichty et al., 2005)

Tag	Taille (aa)	Source	Capacité	Coût	Coût /10 mg
MBP	396	Biolabs	3 mg/ml	\$105/10 ml	\$12
HIS	6	Clontech /	5–14 mg/ml	\$220/25 ml	\$18
		Qiagen	5–10 mg/ml	\$257/25 ml	\$21
GST	218	Amersham	10 mg/ml	\$396/25 ml	\$36
Strep II	8	IBA	50–100	\$1100/25 ml	\$293
			nmol/ml		
FLAG	8	Sigma	0.6 mg/ml	\$1568/25 ml	\$1045

II.7 Technologie de fusion

La technologie de fusion se base sur le clonage de la protéine d'intérêt avec un ou plusieurs partenaires désignés Tags. Ces derniers sont de courts motifs d'acides aminés insérés à l'extrémité N- ou C- terminale de la protéine d'intérêt. Ils sont très utilisés en biologie moléculaire dans la purification de protéines recombinantes à partir de mélanges complexes.

D'autre part, les tags tels que le cytochrome b5, la protéine MBP, Nus et SUMO interviennent dans l'amélioration du taux d'expression et de la solubilité de la protéine d'intérêt en réduisant la formation des corps d'inclusion (Butt et al., 2005; Mitra et al., 2005).

II.7.1 Les Tags de fusion

II.7.1.1 Tags d'affinité

Les tags d'affinité ont été largement utilisés dans la purification de protéines recombinantes. La facilité et la rapidité de l'étape de purification qu'offrent ces marqueurs ont contribué à réduire considérablement les étapes de séparation en une seule. Le degré final de purification est très élevé et atteint les 90 à 99 % avec un bon rendement de protéines purifiées (Terpe, 2003). Plusieurs motifs ont été développés, les plus utilisés sont présentés dans le tableau XII.

Tableau XII: Séquences et tailles de quelques tags d'affinité (Terpe, 2003)

Tag	Résidus	Séquence	Taille (KDa)
Poly-Arg	5-6	RRRRR	0,80
Poly-His	2-10	HHHHHH	0,84
FLAG	8	DYKDDDDK	1,01
Streptag II	8	WSHPQFEK	1,06
S-	15	KETAAAKFERQHMDs	1,75
HAT-	19	KDHLIHNvHKEFHAAHNK	2,31
3x FLAG	22	DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK	2,73
SBP	38	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP	4,03
GST	211	Protéine	26,00
MBP	396	Protéine	40,00

La technologie de fusion fait intervenir plusieurs motifs de purification présentant une forte affinité à une matrice spécifique. L'interaction tag-matrice se déroule suivant différents mécanismes:

- Ligand- récepteur telle que la streptavidine et ses dérivés capables de reconnaître une séquence peptidique spécifique qui est le SBP tag (Terpe, 2003).
- Enzyme-substrat, par exemple le site de clivage de l'entérokinase, ou de la TEV protéase.

- Polyhistidine-ions métalliques : ce système utilise le tag His chargé négativement qui se fixe aux ions nickel ou cobalt immobilisés.
- Anticorps-antigène : Ce système offre une purification optimale, on peut citer le FLAG-tag (Keefe et al., 2001).

Les tags d'affinité les plus utilisés, leurs matrices et conditions d'élution sont représentés dans le tableau XIII.

Tableau XIII: Matrices et conditions d'élution de quelques tags d'affinité d'après (Terpe, 2003)

Tag d'affinité	Matrice	Condition d'élution
Poly-Arg	Résine échangeuse de cation (DEAE)	Gradient de NaCl de 0 à 400 mM à pH >8,0
Poly-His	Ni ²⁺ -NTA, Co ²⁺ -CMA (Talon)	20-250 mM d'Imidazole ou pH bas
FLAG	Anticorps monoclonal Anti-FLAG	pH 3,0 ou 2-5 mM EDTA
Streptag II	Strep-Tactin (streptavidine modifiée)	2,5 mM desthiobiotine
Cellulose-binding domain	Cellulose	150 mM imidazole ou pH bas
SBP	Streptavidine	2 mM Biotine
Glutathione S-transférase	Glutathion	5 – 10 mM glutathion réduit
Maltose-binding protein	Amylose	10 mM maltose

✓ Tag polyhistidine

La purification des protéines recombinantes fait souvent appel à l'utilisation du tag polyhistidine qui a été décrite pour la première fois en 1987 (Hochuli et al., 1987). Le tag polyhistidine est communément inséré du côté N ou C terminal des protéines d'intérêt (Bornhorst and Falke, 2000).

Il consiste en une répétition de 6 à 10 résidus histidine qui est l'acide aminé offrant la plus forte interaction avec les ions métalliques. A pH neutre ou légèrement alcalin les peptides présentant une succession de résidus histidine peuvent se lier efficacement aux ions Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} ou Zn^{2+} immobilisés sur des matrices IMAC (immobilized metal ions affinity chromatography) (Terpe, 2003).

Plusieurs types d'agents chélateurs sont utilisés citons le Ni-NTA (composé des ions Ni^{2+} couplés par l'acide nitrilotriacétique (NTA) à l'agarose ou à la silice) et le TALON (composé des ions Co^{2+} fixés sur le carboxyméthylaspartate (CMA) et couplé à un support de résine solide).

Après l'étape de fixation, les protéines d'intérêt subissent une succession de lavage de la matrice afin d'éliminer toute trace de contaminant avant d'être éluées par l'ajout d'une solution d'imidazole.

Plusieurs travaux de recherche visant la production recombinante de la fibronectine humaine ou de ses fragments ont décrit l'utilisation du tag poly-His (Christie, 2002; Elloumi et al., 2009; Kang and Jang, 2009). Ce dernier est facilement combiné avec d'autres tags et interfère peu avec leurs fonctions. Cependant, l'utilisation du tag polyhistidine peut induire des liaisons non spécifiques à d'autres protéines qui ont tendance à contenir des résidus histidines consécutifs (Bornhorst and Falke, 2000). De plus, l'imidazole utilisé pour l'élution induit souvent la formation d'agrégats protéiques ce qui peut influencer les études de compétition et de cristallographie (Hefti et al., 2001).

✓ **Tag SBP (Streptavidin Binding Peptide)**

Le tag SBP est composé d'une succession de 38 acides aminés capables de se lier spécifiquement à la streptavidine avec une forte affinité (une constante d'équilibre de dissociation égale à 2,5 nM). Les protéines fusionnées au tag SBP sont purifiées sur une colonne de streptavidine ou de ses dérivés et les conditions d'élution sont très douces (2 mM de biotine) (Keefe et al., 2001).

La fixation du tag SBP à la streptavidine se déroule suivant un mécanisme particulier. La streptavidine est un tétramère capable de fixer deux peptides SBP. Sur les 38 acides aminés formant le tag SBP, seulement 25aa (résidus de 11 à 35 colorés dans la Figure 15) participent à la liaison avec les sous unités de la streptavidine.

En effet, ce segment est subdivisé en trois régions principales dont le premier « GHVVEG » et le dernier « EHHPQG » constituent les sites de fixation du SBP à la streptavidine. Chacun d'entre eux fixe deux unités diamétrale de la streptavidine par exemple (A / B ou C / D) (figure 15).

La région constituée par les 11 acides aminés du centre possède une structure en hélice et joue le rôle d'un espaceur permettant aux deux sites de se fixer dans les poches de la streptavidine (Wu and Wong, 2013).

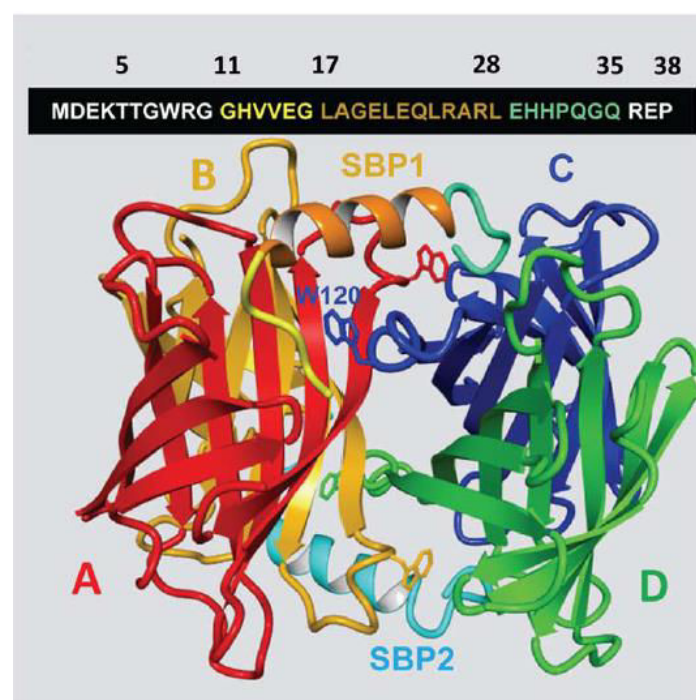


Figure 15: mécanisme de liaison des deux peptides formant le SBP aux unités de la streptavidine (Wu and Wong, 2013). Les résidus N-et C-terminaux du tag SBP impliqués dans la liaison avec la streptavidine sont colorés en bleu, jaune et vert. L'espaceur reliant les deux peptides est représenté en marron. Les quatre sous-unités de la streptavidine sont représentées comme suit : couleur rouge (sous-unité A), couleur orange (sous-unité B), couleur bleue (sous-unité C) et couleur verte (sous-unité D).

II.7.1.2 Les Tags de solubilité

Les tags de solubilité peuvent être de courts peptides ou des séquences protéiques plus larges utilisés pour améliorer la solubilité des protéines ayant tendance à s'agréger. La maltose binding protein (MBP) et la thioredoxine (TRX) sont les partenaires de solubilité les plus communément utilisés dans la production de protéines correctement repliées et biologiquement

actives. La MBP peut servir également de tag d'affinité sans avoir recours à un autre partenaire de fusion.

✓ **Maltose Binding Protein (MBP)**

C'est une protéine de grande taille moléculaire (43 kDa) sécrétée par *E. coli* et qui présente des niveaux d'expression élevés garantissant la solubilité de ces partenaires de fusion (Dyson et al., 2004).

Plusieurs vecteurs commerciaux contenant la MBP sont disponibles pour l'expression des protéines d'intérêt dans le cytoplasmique et le périplasme.

✓ **Gluthation S Transférase (GST)**

La GST est une protéine de petite taille (26kda) et très utilisée dans la purification des protéines recombinantes. Il a été montré que la GST est impliquée également dans l'amélioration de la solubilité lorsqu'elle est insérée du côté N-Terminal de la protéine d'intérêt (Kim and Lee, 2008). Cette protéine présente l'avantage de pouvoir être détectée grâce à un dosage colorimétrique en présence de son substrat 1-chloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB) et permet ainsi un traçage durant le repliement et la purification (Habig et al., 1974).

✓ **Thioredoxine (TRX)**

La thioredoxine est une protéine dont est extrait un fragment intracellulaire de 12-kDa présent chez *E. coli*. Il est thermostable, facilement soluble et surexprimé (LaVallie et al., 1993). La TRX s'accumule sur les sites d'adhésion de la membrane cytoplasmique permettant ainsi une simple récupération des protéines de fusion par choc osmotique ce qui facilite l'étape de purification (Bayer et al., 1987). Il a été rapporté que l'efficacité de purification par le biais du tag TRX est meilleure lorsque ce dernier est inséré du côté N-terminale de la protéine cible (Dyson et al., 2004).

✓ **N-utilizing substance A (NusA tag)**

Il s'agit d'une protéine dont la chaîne est composée de 495 aa. Elle présente un bon potentiel de solubilité dans le cadre de la production de protéine hétérologue dans *E. coli*. Cette protéine utilisée comme tag de solubilité, a montré des résultats similaires, voire meilleurs que ceux obtenus en utilisant le tag MBP, toutefois, ceci reste dépendant de la protéine à solubiliser (Davis et al., 1999).

D'autres tags sont aussi utilisés comme le DsbA (bacterial disulfide BOND oxidoreductase) (Collins-Racie et al., 1995) et SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier)(Panavas et al., 2009) ont été cloné comme partenaire de fusion permettant l'expression des protéines d'intérêt sous forme soluble.

II.7.1.3 Tags de coloration

Il est vrai que les tags d'affinité ont contribué à faciliter l'étape de purification mais ils ne nous renseignent pas sur les étapes d'expression et de purification à des stades précoces. En effet, le contrôle de ces étapes est essentiel pour le gain du temps et présente des répercussions sur le coût de production.

C'est ainsi que des technologies de fusion ont fait appel à des peptides capables de se colorer une fois exprimés afin de détecter la présence de la protéine d'intérêt (partenaire de fusion). A cet effet, une large gamme de marqueurs de coloration a été utilisée pour le suivi de la production et de la purification des protéines recombinantes. Nous allons en détailler les plus utilisés.

✓ Domaine de fixation de l'hème du cytochrome b5

Le cytochrome b5 est un composant intégral des membranes localisé au niveau du réticulum endoplasmique des plantes supérieures, des animaux et des champignons. Il joue un rôle important dans le transport des électrons. Il se présente sous forme d'une chaîne peptidique de 16700 Da composée de deux domaines indépendants et codants pour des fonctions différentes:

Le domaine en N-terminal composé d'une centaine d'acides aminés constitue la région hydrophile responsable de la fixation de l'hème (figure 16).

Le domaine en C-terminal composé d'environ trente acides aminés est hydrophobe responsable de l'ancrage de la protéine à la surface cytoplasmique de la membrane du réticulum endoplasmique (Napier et al., 1995; Ozols and Gerard, 1977).

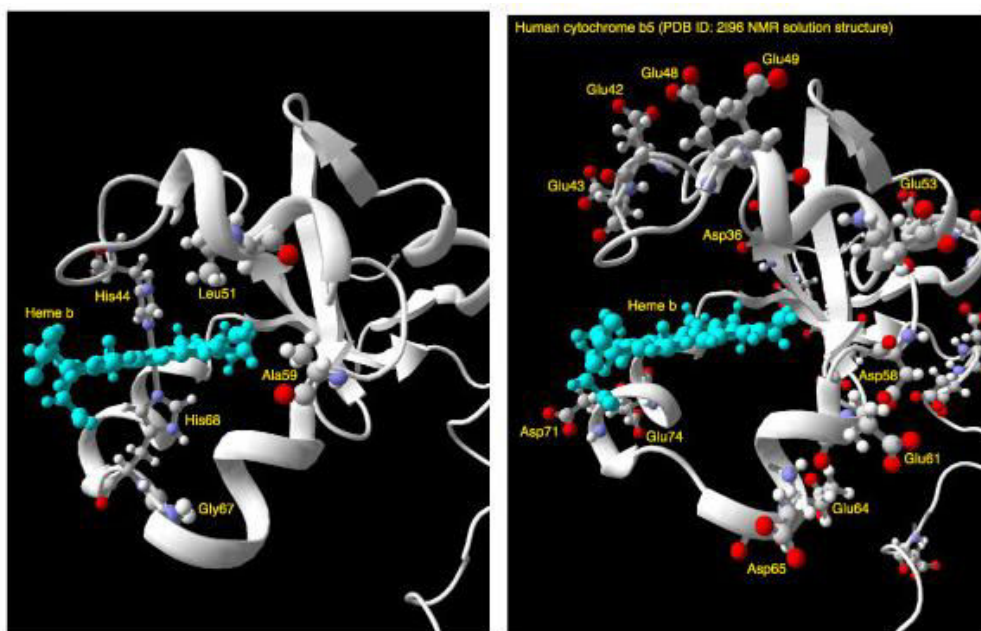


Figure 16: Structure RMN du cytochrome b5 humain

[PDB code: [2I96](#) model 1] Structure tertiaire du cytochrome b5 humain et du domaine de fixation de l'hème (coloré en bleu) (Tomomi et al., 2010).

Le cytochrome peut être exprimé sous deux formes. Une forme apoprotéique incolore et une forme holoprotéique qui acquiert une coloration rouge suite à la fixation du co-facteur « hème ». La petite taille moléculaire et le caractère coloré du cytochrome b5 en font un partenaire idéal pour le contrôle et le suivi de l'expression et de la purification des protéines d'intérêt.

Dans le but de visualiser les étapes d'expression et de purification des protéines d'intérêt à l'œil nu, le domaine de fixation de l'hème du cytochrome b5 a été fusionné avec la Glutathion-S-Transférase (GST) (Finn et al., 2005) et à une cassette multifonctionnelle d'expression (10 His-SBP) (Miladi et al., 2013). Les résultats ont montré la contribution du cytb5 dans le suivi de l'expression et la détection précoce de la protéine d'intérêt pendant la collecte des culots bactériens et l'extraction (figure 17 A et B). Cette approche a permis d'accélérer l'étape de screening des clones produisant la protéine d'intérêt sous forme soluble (figure 17 C) et de suivre l'étape de purification de la protéine (figure 17 D).

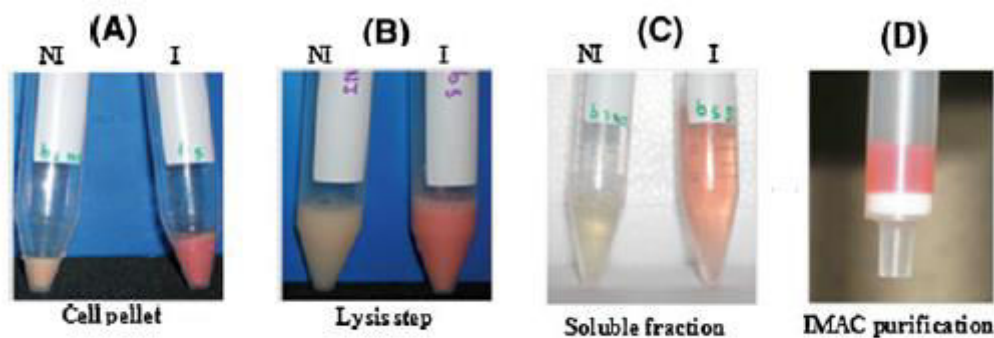


Figure 17: Suivi en temps réel des étapes d'expression, extraction et purification de protéines recombinantes fusionnées au Cytochrome b5 (Miladi et al., 2013).

✓ **Domaine FMN (Flavine mononucléotide) du cytochrome p450**

Le domaine de fixation de la flavoprotéine qui fait partie de la CPR (cytochrome p450 réductase) possède un faible poids moléculaire 21KDa et joue le rôle de co-facteur intervenant dans le transport d'électrons. Il a été cloné en fusion avec la GST (Figure 18 à gauche) et présente un grand intérêt dans le suivi de l'expression et de la purification des protéines recombinantes du fait qu'il se colore en jaune en se fixant à la flavoprotéine (figure 18 à droite). De plus, ce domaine a montré des taux d'expression dans *E.coli* de l'ordre de 30-40 mg/L (Finn et al., 2005).

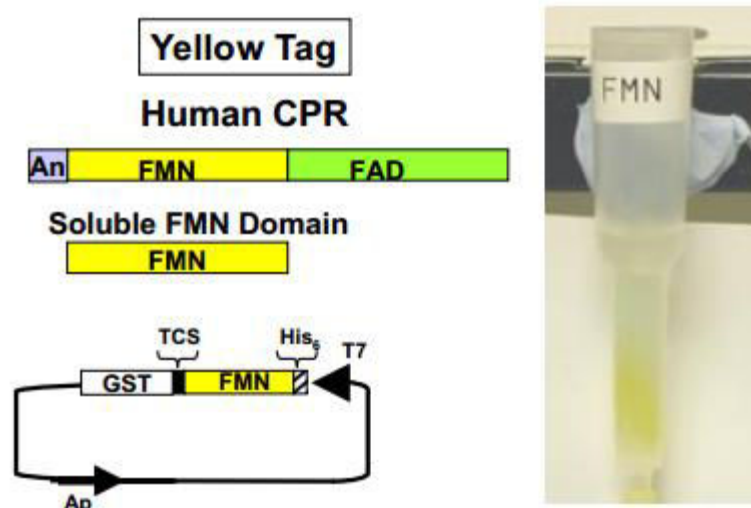


Figure 18: Suivi de l'expression protéique de la GST avec le Tag FMN. (De gauche à droite) Clonage du domaine de la FMN en fusion avec la GST. Traçage en temps réel de la purification de la protéine de fusion GST-FMN sur colonne

Ce domaine reste tout de même moins sensible et moins stable que le cytochrome b5. En effet, durant tout le processus de purification il a été montré que le cytochrome garde sa coloration rouge contrairement au FMN Tag dont la couleur varie à cause des changements redox (Finn et al., 2005).

✓ **La protéine GFP (Green Fluorescent Protein)**

La GFP a été identifiée et isolée pour la première fois en 1962 par Shimomura à partir de la méduse bioluminescente *Aequorea victoria*, rencontrée sur les côtes ouest de l'Amérique du Nord (Shimomura et al., 1962). La famille des GFP est composée de sept classes distinctes en fonction de la composition de ces chromophores (Tsien, 1998).

La protéine de 30 KDa a la particularité d'émettre une fluorescence à 509 nm et d'absorber dans l'UV à 395 nm ainsi que dans la lumière visible à 470 nm. En plus de son autofluorescence, elle possède grande stabilité et peut être détectée *in vivo*. C'est ce qui a fait d'elle un excellent candidat dans le traçage de l'expression génique et la localisation de protéines *in vivo* et *in situ* (Kain et al., 1995), dans le développement de bioprocédés de contrôle de la production de la CAT (chloramphénicol acétyl transférase). Il a été montré dans cette étude que la GFP peut être détectée avec une meilleure sensibilité que celle de la méthode enzymatique de quantification (Albano et al., 1998).

D'autres travaux ont exploité le signal fluorescent de la GFP pour mettre au point des procédés rapides de détection du taux d'expression indicatif des protéines et ce en développant des plaques de lecture traitant les suspensions bactériennes par fluorescence (Rücker et al., 2001).

L'utilisation de la GFP comme partenaire de fusion nécessite une source d'excitation externe afin d'être visible, contrairement à d'autres protéines chromogènes de fusion comme le cyt b5 (Arnau et al., 2006). La GFP requiert une concentration seuil pour être détectée dans le bioréacteur or son expression peut être insuffisante. Ses faibles niveaux de sensibilité sont étroitement liés à un faible taux d'amplification d'où l'utilisation supplémentaire de promoteurs forts pour sa détection (Tsien, 1998). Le tableau XIV résume les principaux facteurs affectant la détection de la GFP.

Tableau XIV: Facteurs affectant la détection de la GFP d'après (Tsien, 1998)

Facteurs	Paramètres
Quantité totale de la GFP	Nombre de copies du gène, durée de l'expression Force du promoteur utilisé lors de la traduction Efficacité de la traduction Efficacité de la formation post-traductionnelle du fluorophore
Protéines solubles / Corps d'inclusion	Disponibilité des chaperonnes Temps et température de culture, disponibilité de l'oxygène
Propriétés moléculaires de la GFP mature	Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission Coefficient d'extinction
Compétition avec des bruits de fond	Autofluorescence des cellules / milieu Qualité des filtres d'excitation et d'émission Sensibilité des photodétecteurs

II.7.2 Fibronectine et technologie de fusion

La diversité des tags utilisés comme partenaires de fusion et les fonctions qu'ils apportent ont visiblement contribué à l'optimisation des procédés de production des protéines recombinantes au niveau de la rapidité des étapes de détection, du criblage, de la purification...

Dans le cadre de la production de la fibronectine, un certain nombre de ses fragments a été produit en utilisant la technologie de fusion et ce pour diverses applications. Un bref aperçu ci-dessous dans le tableau XV décrit les exemples de fragments recombinants de FN et leurs partenaires de fusion.

Tableau XV: Exemples de fragments de fibronectine produits par génie génétique chez E.Coli

Fragment	Fonction	Taille	Système d'expression	Tag de fusion/ Utilité	Référence
FNIII7-10	Adhésion cellulaire	39 kD	E. coli		(Cutler and García, 2003)
FNIII8-10	Adhésion cellulaire	55 kD	E. Coli	GST / Purification	(Roy et al., 2010)
FNIII9-10	Adhésion cellulaire	72 kD	E.coli	GST/ Purification	(Mardon and Grant, 1994)
FNIII7-10	Adhésion cellulaire	75kD	E.coli	CDH (cadherine)/ Promotion de l'adhésion cellulaire	(Zhang et al., 2010)
FNIII10	Adhésion cellulaire	55 kD	E.coli	KGF (keratinocyte growth factor) Facteur de croissance	(Kang and Jang, 2009)
FNII2	Fixation du collagène	20 kD	E.coli	thioredoxin (trxA) / Solubilité 6 His/ purification	(Peisley and Gooley, 2007)
FNIII12-14	Fixation de l'héparine	33kD	E.coli	6 His/ purification	(Kimizuka et al., 1991)

II.7.3 Clivage des protéines de fusion

La technologie de fusion des protéines avec les tags chromogènes, de solubilité, et d'affinité a participé à l'optimisation des procédés de production recombinante en simplifiant la purification et / ou en améliorant la solubilité des protéines. Cependant, il est nécessaire d'éliminer les partenaires de fusion à la fin du procédé, dans le but de récupérer la protéine d'intérêt sous sa forme native et pure.

L'intérêt de cette étape est de supprimer les interférences que peuvent engendrer les tags avec la structure de la protéine (dans le cadre des études structurales de cristallographie) ou avec son activité biologique (dans le cadre d'applications thérapeutiques) et de réduire les risques immunogènes (Fong et al., 2010; Hedhammar et al., 2006; Waugh, 2005). A cet effet, plusieurs méthodes ont été développées pour la réalisation du clivage des protéines de fusion dont les détails sont décrits ci après.

II.7.3.1 Le clivage chimique

La méthode de clivage chimique fait appel à plusieurs réactifs dont principalement le bromure de cyanogène, l'hydroxylamine et l'acide formique couramment utilisés dans la production de quelques peptides hydrophobes. Ces derniers sont capables de couper un à deux résidus aminés dans une séquence donnée. Ce qui implique l'insertion de ces acides aminés entre les deux partenaires de fusion (Li, 2011). Alors que l'hydroxylamine et l'acide formique coupent respectivement les résidus asparagine/glycine et aspartate/proline, le bromure de cyanogène coupe au niveau de l'extrémité C-terminale des méthionines (Hu et al., 2008).

Le clivage chimique constitue une alternative peu coûteuse, mais il présente un certain nombre d'inconvénients. En effet, il s'opère dans des conditions dénaturantes et agressives entraînant la dénaturation de la protéine d'intérêt et par conséquent altérant sa fonction biologique (Li, 2011).

De plus, le mécanisme de reconnaissance de ces réactifs chimiques est peu spécifique puisqu'il est limité à un acide aminé ou deux pouvant être présent au sein même de la chaîne du peptide d'intérêt. D'où les risques de clivage non spécifique et la fragmentation de la protéine d'intérêt. De plus, des étapes de purification supplémentaires sont requises pour isoler la protéine d'intérêt du mix réactionnel (Hu et al., 2008; Li, 2011).

II.7.3.2 L'auto-clivage

L'auto-clivage se base sur la présence de tags d'auto clivage présents dans la protéine de fusion et dont les modules protéiques possèdent une activité protéolytique. Les partenaires de fusion qui les contiennent peuvent subir un auto clivage spécifique du site, déclenché par un composé de faible poids moléculaire ou par un changement de conformation (Li, 2011).

Les intéines sont des fragments peptidiques internes dans le produit de traduction capables d'une activité auto-lytique à travers laquelle ils sont libérés de la protéine dans laquelle ils sont insérés, lors de l'épissage protéique. Les polypeptides qui les encadrent (extéines) se réunissent pour former la protéine finale (Perler et al., 1994).

C'est ainsi que l'idée de leur application dans le clivage des protéines de fusion a été exploitée en réalisant préalablement des mutations au niveau de leur extrémité N ou C-terminale afin d'atténuer le potentiel de ligation et de contrôler l'étape de clivage (Sharma et al., 2006).

II.7.3.3 Le clivage enzymatique

Le clivage enzymatique est utilisé en tant qu'alternative à la voie chimique et à l'autoclivage puisqu'il s'opère dans des conditions douces à haute spécificité. Plusieurs vecteurs de clonage commercialisés sont dotés d'un site de clivage spécifique permettant l'élimination du tag utilisé. Deux types d'enzymes sont utilisés pour ce type de clivage: les exopeptidases et des endopeptidases.

✓ Clivage par les exopeptidases

Les exopeptidases sont des enzymes qui hydrolysent les séquences peptidiques à leurs extrémités libres (carboxy et aminopeptidases). Ces enzymes présentent l'avantage de couper avec une haute spécificité dans des conditions non dénaturantes en absence de toute toxicité chimique. De plus, le clivage par le biais des exopeptidases requiert de faibles quantités d'enzyme (Hu et al., 2008).

Ces enzymes peuvent provenir de sources animales ou par technologie recombinante. Le choix de cette voie constitue une alternative à la source naturelle puisqu'elle permet l'obtention en grande quantité d'enzymes en l'absence de contaminants pouvant être présents dans les peptidases extraites d'animaux (Raksakulthai and Haard, 2003).

Parmi les exopeptidases les plus utilisées, la DAPase (dipeptidyl aminopeptidase) d'origine murine synthétisée dans les cellules d'insectes (Kuo and Chase, 2011). Elle est connue pour être l'exopeptidase la plus rapide. Elle clive au niveau de l'extrémité amino terminal (Kuo and Chase, 2011).

✓ Clivage par les endoprotéases

Les endoprotéases, contrairement aux exopeptidases, sont capables de couper à l'intérieur des séquences protéiques au niveau de leurs sites protéolytiques. Le clivage enzymatique des protéines de fusion via les endoprotéases spécifiques est sans doute la méthode la plus répandue pour l'élimination des tags de fusion. Cette méthode, illustrée dans la figure 19, consiste en l'insertion entre la protéine d'intérêt et le partenaire de fusion, d'un site spécifique à une protéase donnée. Une fois l'endopeptidase mise en contact avec la protéine de fusion, elle reconnaît spécifiquement son site et l'hydrolyse (Jennya et al., 2003).

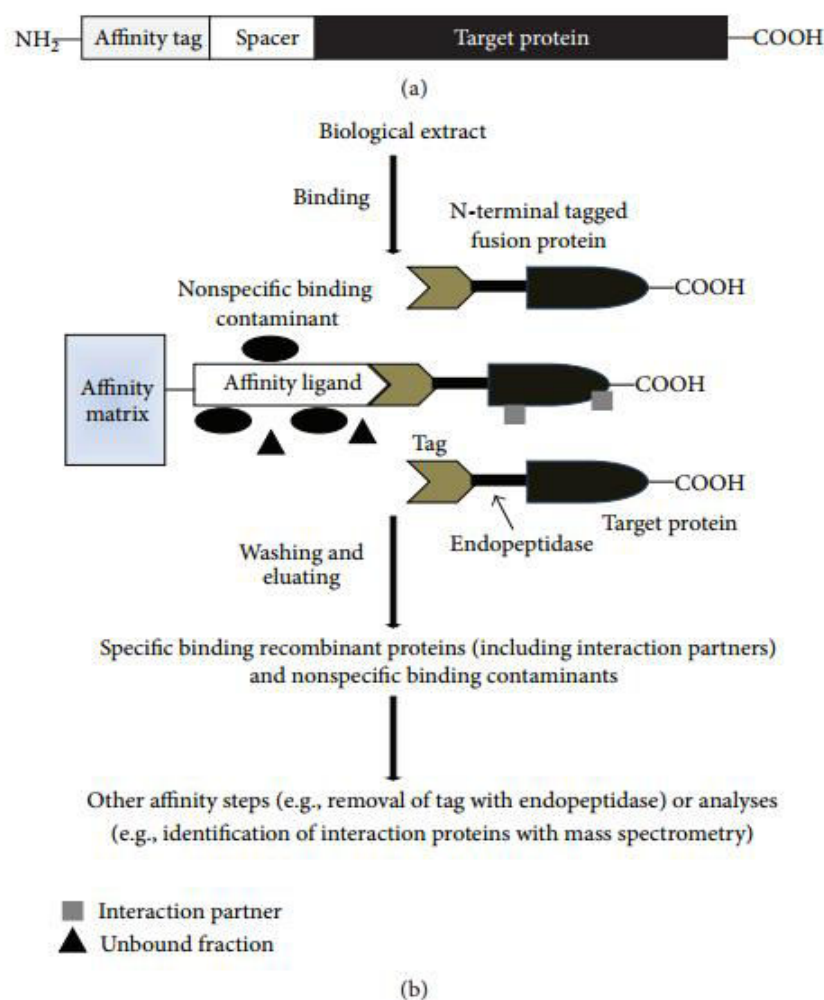


Figure 19: Technologie de fusion d'une protéine d'intérêt et sa purification. (a) Représentation schématique d'une protéine de fusion taguée à son extrémité N-Terminale. Un espaceur a été inséré entre les deux partenaires de fusion. Il s'agit d'un site de clivage d'une endopeptidase. (b) Principe de purification d'une protéine de fusion et de l'élimination du tag (Zhao et al., 2013).

Bien que les endopeptidases requièrent des incubation qui risquent d'engendrer des coupures secondaires dans la protéine (Esposito and Chatterjee, 2006), elles présentent néanmoins plusieurs propriétés avantageuses par rapport aux exopeptidases et aux tags d'auto-clivage. En effet, elles requièrent des conditions réactionnelles douces et agissent spécifiquement sur les tags de différentes tailles avec une rapidité comparable à celle de la DAPase (Zhao et al., 2013).

Plusieurs endoprotéases telles que le facteur Xa (Jennya et al., 2003), la thrombine (Malhotra 2009), la tev protéase (Miladi et al., 2011) et l'entérokinase (Collins-Racie et al., 1995) sont utilisées pour le clivage de protéines de fusion. Le choix de l'enzyme dépend de l'application souhaitée. Par exemple, dans le cadre d'une application à visée thérapeutique il est fortement recommandé d'utiliser des protéases qui, pendant le clivage, ne laissent pas de résidus aminés susceptibles d'induire des risques immunogènes (Kubitzki et al., 2008). Les avantages et les inconvénients de chaque système sont présentés en détail ci après.

✓ Le facteur Xa

Le facteur Xa fait partie des protéases les plus utilisés pour le clivage des protéines de fusion. C'est une sérine-protéase de type trypsine qui agit au niveau des liaisons peptidiques du côté carboxylique. Il a une préférence pour les liaisons peptidiques dans lesquelles la fonction carboxyle est fournie par un résidu d'arginine. La séquence qui constitue le site de reconnaissance par le facteur Xa est généralement le peptide « IEGR ». Parmi les inconvénients liés à l'utilisation du facteur Xa on peut citer le clivage non spécifique (Jennya et al., 2003).

✓ La thrombine

La thrombine est une sérine protéase impliquée dans la catalyse du clivage du fibrinogène pour le transformer en fibrine (Jennya et al., 2003). Elle est souvent utilisée grâce à sa disponibilité, son faible coût et à son activité élevée à différentes conditions (Charlton and Zachariou, 2011; Fong et al., 2010; Malhotra, 2009). Cependant, la thrombine n'est pas très spécifique puisqu'elle peut aussi cliver des séquences plus courtes.

✓ La TEV protéase

Il s'agit de la « tobacco etch virus » fréquemment utilisée dans le clivage de protéines recombinantes de fusion en raison de son efficacité et de sa spécificité élevée.

Elle coupe au niveau du site ENLYFQ / G. L'avantage de l'utilisation de la TEV est la facilité de sa production en grandes quantités et sous forme soluble (Miladi et al., 2011).

✓ L'entérokinase

L'entérokinase est une sérine protéase qui clive le trypsinogène, dans la muqueuse duodénale, au niveau du site (D-D-D-D-K↓), pour le transformer en trypsine responsable de l'initiation de la digestion protéolytique chez les mammifères (Kubitzki et al., 2008).

Le choix de cette protéase comme agent de clivage des protéines de fusion réside dans sa spécificité à couper la protéine de fusion sans générer de résidu aminé supplémentaire contrairement à la TEV, sa grande résistance aux dénaturants et aux détergents, sa courte durée d'incubation et sa capacité à être active dans des intervalles de pH allant de 4,5 à 9,5 et de températures allant de 4 à 45°C (Collins-Racie et al., 1995).

MATERIELS & METHODES

III. MATERIELS & METHODES

III.1 Matériel biologique

III.1.1 Vecteurs bactériens

III.1.1.1 Vecteur pFN 103

Le vecteur pFN 103 (fourni par l'institut Curie) contient la séquence entière codant pour de la fibronectine humaine.

III.1.1.2 Vecteur de clonage pCR®2.1- TA Cloning ® Kit

Le plasmide pCR®2.1 (Invitrogen) est utilisé pour les étapes de sous-clonage de l'insert FNIII9-10 (Annexe). Le TA Cloning ® Kit de PCR ® 2.1 fournit un moyen rapide pour la stratégie de clonage et ce en permettant en une seule étape l'insertion directe d'un produit PCR dans un vecteur plasmidique. Dans ce modèle (figure 20), la Taq polymérase possède une activité qui ajoute un seul désoxyadénosine (A) aux extrémités 3' des produits de PCR. Le vecteur linéarisé fourni dans ce kit, dispose de résidus simples 3' désoxythimidines (T). Cela permet aux inserts de PCR de se lier de manière efficace au le vecteur.

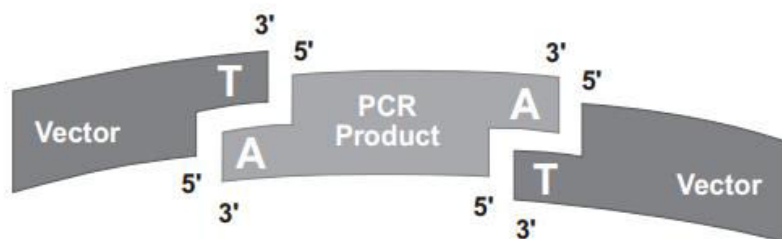


Figure 20: Schéma représentatif du principe du TA cloning

(Adapté du manuel de l'utilisateur Life technologies)

III.1.1.3 Vecteur pEBI

Nous avons modifié le plasmide pET15b par l'insertion d'une cassette multitags CMAT : colored multi affinity tags (contenant deux tags de purification HIS et SBP et un marqueur de coloration le cytochrome b5). Le nouveau vecteur d'expression obtenu est appelé pEBI (figure21). Il est utilisé pour l'expression de la cassette multitags en fusion avec la FNIII9-10. Ce vecteur d'expression possède une origine de répllication E. coli et le gène de résistance à l'ampicilline.

Il permet, sous le contrôle du promoteur du bactériophage T7, l'expression de protéines d'intérêt dans notre cas la fibronectine avec une queue poly-histidine à son extrémité N terminale. Ce promoteur est activé par l'ARN polymérase T7 dont le gène est présent dans le chromosome bactérien des souches d'*E.coli* telles que BL21, BL21 (DE3) ou BL21(DE3) pLysS et dont l'expression est sous le contrôle du promoteur lacUV5, inductible par l'IPTG.

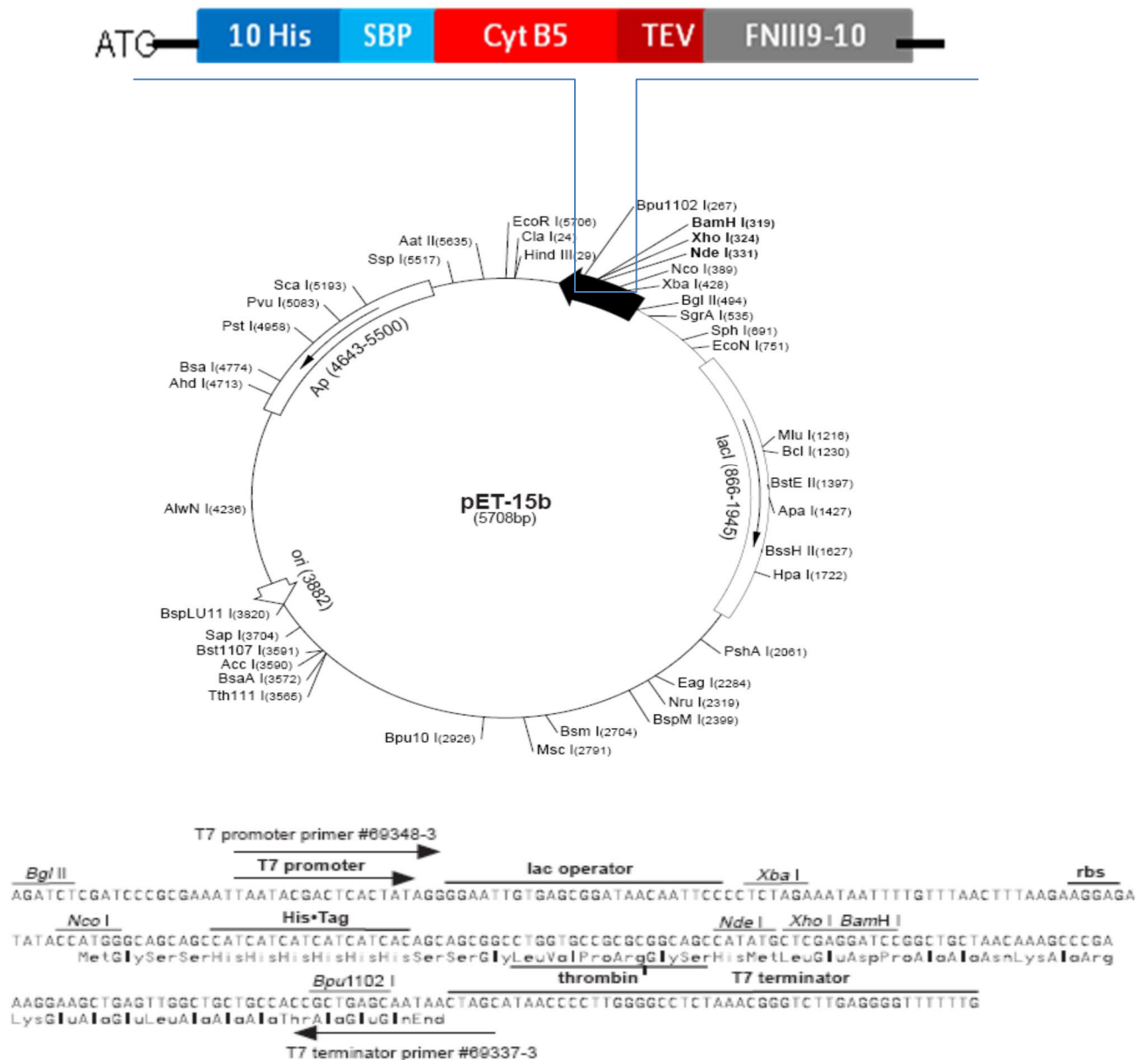


Figure 21: Carte de restriction du vecteur pET 15b modifié

III.1.2 Souches bactériennes

III.1.2.1 *E.coli* TOP 10F⁺

Les bactéries *Escherichia coli* de souche TOP 10F⁺ (Invitrogen) sont utilisées pour le clonage. Elles sont de phénotype F⁺(lacIq Tn10 (TetR) mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) Ø80lacZ M15 lacX74 recA1 deoR araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG. Ces bactéries offrent l'avantage de sélectionner les colonies après la transformation grâce à la coloration blanc / bleu (pour les plasmides comportant le gène Lac Z).

III.1.2.2 *E.coli* BL21 (DE3) pLysS / système pET

Le système pET est basé sur la sélectivité et l'efficacité de l'enzyme ARN polymérase du bactériophage T7. C'est un système très performant pour le contrôle de l'expression des protéines recombinantes chez *E.coli*. Il (Figure 22).

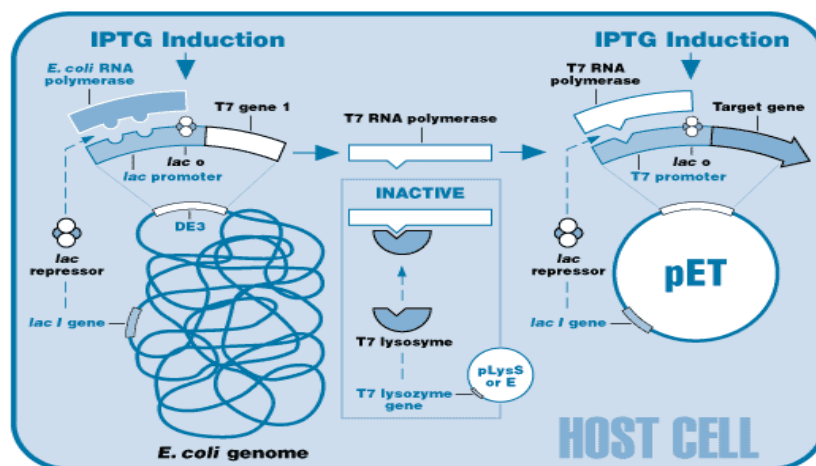


Figure 22: Les éléments de contrôle du système pET

Le promoteur T7 présent dans les vecteurs pET est inductible par l'IPTG. Il régule l'expression de la protéine hétérologue.

Les différentes souches d'*E.coli* utilisées contiennent le prophage λ DE3 dont l'un des gènes code pour l'ARN polymérase du bactériophage T7. Ce gène est sous le contrôle du promoteur lacUV5 inductible par l'IPTG.

La souche d'expression BL21 (DE3) pLysS utilisée dans ce travail possède aussi le plasmide pLysS qui code pour une protéine bifonctionnelle, le lysozyme. Cette protéine se lie à l'ARN polymérase et inhibe la transcription.

Ainsi, le plasmide pLysS stabilise la présence du plasmide d'expression dans la bactérie car la quantité de protéines produite est plus faible, ce qui est intéressant dans le cas où la protéine est toxique pour la bactérie.

III.1.2.3 *E.coli* KRX

La souche *E.coli* KRX (Promega) est une souche de clonage mais aussi d'expression. Elle dérive de *E.coli* K12. Cette souche intègre le gène qui code pour la T7 ARN polymérase contrôlé par un promoteur inductible par le rhamnose. De plus, KRX permet la sélection blanc / bleu des transformants. Le génotype de KRX est : [F', traD36, Δ ompP, proA+B+, lacIq, Δ (lacZ)M15] Δ ompT, endA1, recA1, gyrA96 (Nalr), thi-1, hsdR17(rk-, mk+), e14- (McrA-), relA1, supE44, Δ (lac-proAB), Δ (rhaBAD)::T7 RNA polymérase.

III.2 Méthodes

III.2.1 Méthodes de biologie moléculaire utilisées

III.2.1.1 Extraction plasmidique

L'extraction des plasmides est réalisée avec le kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen. Le principe se base sur la lyse alcaline des bactéries.

A partir d'une colonie isolée, nous inoculons 5 mL de milieu LB liquide (Annexe) contenant l'antibiotique de sélection. Après une incubation de 16 h à 37°C sous agitation, nous centrifugeons à 4000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le culot bactérien obtenu est resuspendu dans 250 μ L de tampon 1 (50 mM Tris-HCl, PH 8 ; 10 mM EDTA ; 100 μ g/mL RNase A) et transféré dans un microtube. La lyse est réalisée par l'ajout de 250 μ L de la solution 2 (200 mM NaOH ; 1% SDS). Le SDS solubilise les phospholipides et les composants protéiques de la membrane tandis que les conditions alcalines dénaturent l'ADN chromosomique et plasmidique ainsi que les protéines. Quand la solution devient visqueuse, nous ajoutons 350 μ L du tampon 3 (3 M potassium acétate, PH 5,5) et immédiatement nous mélangeons par inversion du tube 4 à 6 fois.

La forte concentration en sels entraîne la précipitation de protéines dénaturées, de l'ADN chromosomique, des débris cellulaires et du SDS, tandis que l'ADN plasmidique se renature correctement. Après une centrifugation à 13000 rpm pendant 10 minutes, le surnageant est transféré dans une colonne Qiaprep et centrifugé 1 minute à 13000 rpm. L'ADN plasmidique est lavé et le filtrat éliminé chaque fois par centrifugation 1 minute à 13000 rpm.

Enfin, avant l'élution nous centrifugeons une dernière fois pour éliminer les résidus du tampon de lavage et nous éluons avec 30 à 50 µL du tampon EB (10 mM Tris HCl, pH 8,5).

III.2.1.2 Contrôle spectrophotométrique de la qualité des extractions d'ADN

Dans le but de déterminer la concentration et d'évaluer la pureté des préparations d'ADN, celles-ci sont analysées par spectrophotométrie. La qualité de la préparation est déterminée par le rapport de pureté R (DO 260 nm / DO 280 nm). Le spectre d'absorption des acides nucléiques dans l'UV montre un pic vers 260 nm tandis que celui des protéines est vers 280 nm. La préparation est considérée pure pour un R compris entre 1,8 et 2. Les concentrations en ADN sont calculées selon la loi de Beer Lambert :

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l$$

A : absorbance à 260 nm

ε : coefficient d'extinction molaire en mL µg⁻¹ cm⁻¹

l : longueur de la cuve en cm

C : concentration en acide nucléique dans la cuve en µg/mL

Sachant qu'une unité de densité optique (DO) correspond à une concentration de 50 µg/mL d'ADN, nous pouvons déterminer la concentration en acides nucléiques dans la préparation.

$$[\text{ADN}] = \text{DO}_{260} \cdot 50 \cdot \text{facteur de dilution}$$

III.2.1.3 Electrophorèse sur gel d'agarose

Les électrophorèses d'ADN sont réalisées sur gels d'agarose à des concentrations variables en fonction de la taille du fragment à visualiser. Le principe de cette méthode repose sur le fait que les molécules d'ADN se comportent comme des poly-acides dont la charge à pH 8 est négative. Elles migrent alors lorsqu'un champ électrique est appliqué, de la cathode (-) à l'anode (+). L'agarose est dissout dans 80 mL de tampon TAE 1x (Tris acétate EDTA) puis fondu au micro-onde. Après refroidissement jusqu'à environ 50°C, l'agent intercalant (cybersafe lifetechnologies) est ajouté à une concentration finale de 1x et le gel est coulé dans le support contenant le peigne. Après solidification, le peigne est retiré et le gel est placé dans la cuve d'électrophorèse pour la migration. L'agent intercalant de l'ADN fluoresce suite à une excitation par des rayons UV. Il permet donc de détecter au moyen d'une plaque UV la présence d'ADN. Les échantillons à analyser sont préparés en ajoutant le tampon de charge. L'ensemble

est homogénéisé et déposé dans les puits. La migration s'effectue à 80 V pendant environ 1 heure. Afin de déterminer la taille de l'ADN, il est nécessaire de faire migrer en même temps que les échantillons un marqueur de taille. Nous avons utilisé λ /HindIII (Promega) et 1 Kb DNA Ladder (Promega).

III.2.1.4 Purification de fragments d'ADN à partir du gel

La purification d'ADN à partir du gel est une technique commune pour isoler des fragments spécifiques à partir d'un mélange réactionnel. Dans notre travail, cette étape est réalisée avec Perfectprep Gel Cleanup Sample Kit (Eppendorf).

La portion du gel contenant la bande d'intérêt est mise en contact avec trois volumes de tampon de fixation, et ensuite incubée 10 minutes à 50°C.

À la dissolution complète du gel, nous ajoutons un volume d'isopropanol et nous mélangeons par inversion. La solution d'ADN à purifier est ensuite chargée dans une colonne. Après centrifugation à 12000 rpm pendant une minute, l'ADN est retenu et les contaminants sont élués. La colonne est ensuite lavée avec 750 μ L de tampon d'élution afin d'éliminer toutes impuretés et l'ADN pur est élué avec 30 μ L de tampon d'élution.

III.2.1.5 Amplification par PCR

Cette technique consiste à amplifier une région donnée à l'aide d'un couple d'amorces encadrant cette région. Un cycle de PCR est composé de trois étapes caractérisées par leur température :

- ✓ La dénaturation de la matrice double brin à une température de 94-95°C
- ✓ L'hybridation des amorces à la matrice. La température est fonction de la composition nucléotidique des amorces. Elle est calculée par la formule : $T_a = [2(A+T) + 4(G+C)] - 10^\circ\text{C}$ où A, T, C et G représentent respectivement le nombre d'adénine, de thymidine, de cytosine et de guanine dans le primer. Le logiciel «Tm calculator» NEB est un moyen simple pour la calculer également.
- ✓ La polymérisation est effectuée par une enzyme thermorésistante extraite à l'origine de *Thermus aquaticus* et actuellement obtenue par génie génétique. Cette étape est effectuée à 72 °C.

Théoriquement au bout de n cycles, $2n$ brins sont obtenus, mais en pratique, ce rendement est inférieur en raison de l'épuisement des substrats. Nous obtenons $(1+R)^n$ où R est le rendement (en général estimé à 70 %). Les différentes amplifications par PCR sont réalisées selon le protocole suivant (Tableau XVI et XVII).

Tableau XVI: Milieu réactionnel PCR

Réactifs	Volume (μL)	Concentration finale
ADN matrice	V (100 à 200 ng)	2 à 4 ng/ μL
Tampon PCR (10x)	5	1x
MgCl ₂ (50 mM)	1,5	1,5 mM
dNTP (10 mM)	1	0,2 mM
Primer sens (100 ng/ μL)	1	2 ng/ μL
Primer antisens (100 ng/ μL)	1	2 ng/ μL
H ₂ O	qsp 50 μL	
DNA polymérase	1	

Tableau XVII: Programme PCR

Etape	Temps /T°
Dénaturation	1 min à 95°C
Hybridation	1 min à 58°C
Polymérisation	2 min à 72°C
Elongation finale	10 min à 72°C
Nombre de cycle	25

III.2.2 Stratégie de clonage de la fibronectine fusionnée à la cassette d'expression : CMAT-FNIII9-10

III.2.2.1 Préparation de l'insert FNIII9-10

La séquence codant le domaine III9-10 de la fibronectine est synthétisée à partir du vecteur pFN103 (figure 23) par PCR en utilisant deux couples d'amorce (tableau XVIII) contenant les sites de restrictions (soulignés dans le tableau)) PmlI / BlnI compatibles avec les sites de restriction du vecteur d'expression de destination pEBI. L'amplification est réalisée avec une Taq DNA polymérase (Invitrogen). Le produit de la réaction est analysé sur gel d'agarose 1%.

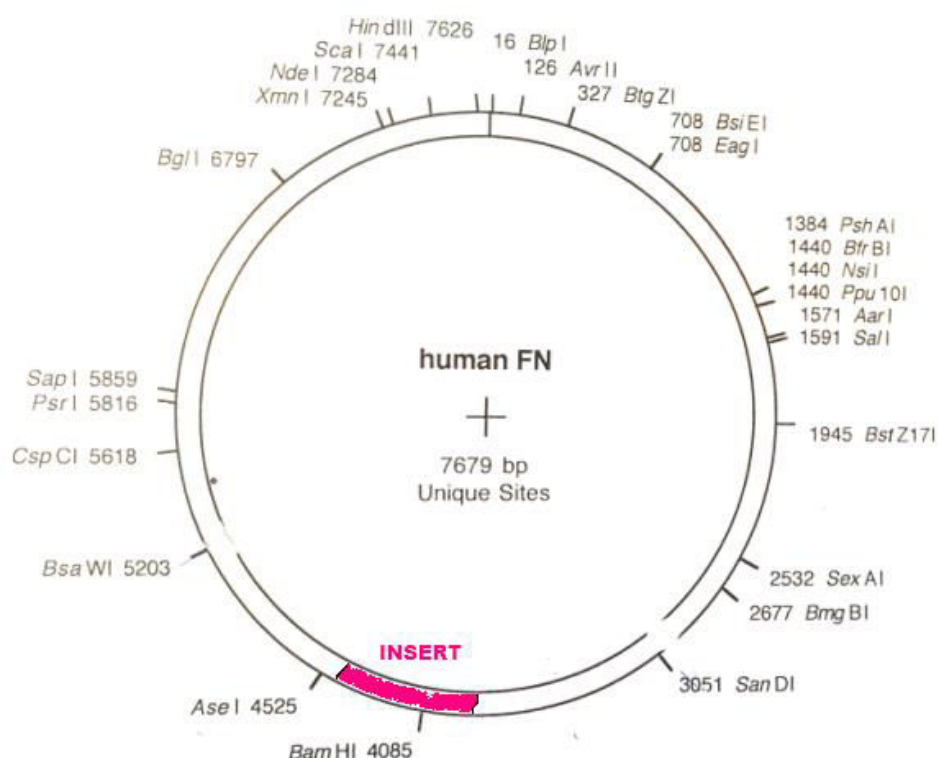


Figure 23: Plasmide pFN103 codant pour la fibronectine humaine

Tableau XVIII: Amorces utilisées pour la synthèse de l'insert

Nom de l'amorce	Site de restriction	Amorces	Tm
als	CACGTG	Sens TAGGTCTTGATTCCCCAACTGG	65°C
alas	GCTCAGC	Anti sens TTAATTGTTTCGGTAATTAATGGAAAT	61°C

III.2.2.2 Sous- clonage de l'insert dans le PCR2.1

Pour des inserts de taille comprise entre (400-700 bp) 2 µl du vecteur PCR2.1 sont incubés avec 5 µl d'inserts en présence d'une T4 DNA ligase du kit TA clonning (Invitrogen) pendant une nuit à 14°C. Deux rapports de ligation (plasmide / insert) sont testés. Le premier (1 :1) garantit la meilleure ligation, le second (1 : 3) est utilisé pour plus d'exactitude.

III.2.2.3 Transformation des bactéries compétentes par le produit de la ligation

La transformation des souches est réalisée par choc thermique. Le principe de cette méthode repose sur le fait que l'ADN, chargé négativement, est attiré par les cations divalents fixés sur la membrane. Le choc thermique qui fluidifie la membrane permet la pénétration de l'ADN.

Après avoir décongelé lentement les bactéries compétentes dans la glace, 2 µL de produit de ligation sont mis en contact avec celles-ci dans des tubes stériles et le mélange est incubé 30 minutes dans la glace. Les bactéries sont ensuite incubées pendant 90 secondes à 42°C puis placées dans la glace pendant 5 minutes. Après l'ajout de 500 µL de milieu de culture, les tubes sont incubés à 37°C pendant 45 minutes sous agitation. Nous procédons ensuite à une centrifugation de 2 minutes à 5000 rpm, nous éliminons le surnageant en laissant 100 µL dans lesquels le culot bactérien sera resuspendu.

Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur milieu LB-agar additionné de 100 µg/mL d'ampicilline, puis incubées à 37°C durant 16 heures.

III.2.2.4 Criblage des clones positifs

✓ Par coloration blanc / bleu

Le premier criblage des clones ayant intégré l'insert est réalisé par la méthode blanc / bleu. *E.coli* TOP 10F', mutante dans le gène lac Z (lac Z'), synthétise une β galactosidase incomplète ω (dépourvue d'une séquence appelée peptide α) et inactive. La séquence codant le peptide α est apportée par le plasmide. Pour les clones qui n'ont pas intégré l'insert, le peptide α restaure l'activité β galactosidase de la protéine mutante et la colonie sera bleue en présence du Xgal (substrat chromogénique de la β galactosidase). Par conséquent, les clones blancs sont positifs.

✓ **Par digestion enzymatique**

La validation de l'insertion de la séquence d'intérêt dans le vecteur PCR2.1 est réalisée par deux digestions enzymatiques. Un à deux microgrammes d'ADN sont digérés pendant quatre heures à 37°C avec l'endonucléase EcoRI correspondant à la digestion non spécifique. Celle-ci coupe de part et d'autre et à l'intérieur de l'insert. La même quantité d'ADN est digérée avec le couple PmlI / BlnI pendant trois heures à 37°C. Il s'agit de la digestion spécifique coupant de part et d'autre de l'insert. Les produits de digestion sont ensuite analysés par migration sur gel d'agarose et révélés sous UV.

✓ **Par PCR**

L'insertion de la séquence d'intérêt dans les vecteurs de clonage est analysée également par PCR. Cette méthode est rapide et permet le criblage d'un grand nombre de clones. Les amorces utilisées sont représentées dans le tableau 18.

✓ **Par séquençage**

Dans le but d'identifier et de valider la séquence d'intérêt à cloner, un séquençage selon la méthode Sanger Big Dye Terminator a été réalisé à partir du vecteur recombinant le fragment FNIII9-10. Cette méthode permet de fournir un alignement des nucléotides composant le fragment d'intérêt.

III.2.2.5 Elution de l'insert

Après la validation de la digestion et de la PCR par étude des fragments correspondant à l'insert sur gel d'agarose, l'introduction des inserts dans le vecteur d'expression peut s'opérer. Les vecteurs PCR2.1 recombinants sont digérés par les deux enzymes de restriction encadrant chaque extrémité des inserts. Chaque enzyme reconnaît un site spécifique et unique sur l'ADN bicaténaire. Les réactions de restriction sont effectuées sur dix microgrammes de plasmide. Les tampons des réactions sont donnés par le fournisseur (Biolabs) en solution concentrée 10x. La durée des réactions est variable et dépend des endonucléases de restriction utilisées.

La bande correspondante à l'insert FNIII9-10 est éluée à partir du gel d'agarose par Perfectprep Gel Cleanup Sample Kit, puis quantifiée.

III.2.2.6 Insertion de la cassette-FN dans les vecteurs d'expression

✓ Préparation de la cassette d'expression

La cassette de multi tags d'affinité (CMAT-FN) est extraite à partir du vecteur de sous-clonage (PCR2.1) validé. La bande correspondante à la cassette d'expression et récupérée à partir du gel d'agarose par Perfectprep Gel Cleanup Sample Kit est prête à être insérée dans le vecteur d'expression.

✓ Préparation du plasmide pEBI

Le plasmide pEBI (10 µg) digéré par le couple d'enzymes *SwaI* / *BlnI*, libère un bout cohésif et un bout franc. Le produit de la digestion est ensuite déposé sur gel d'agarose à 1 % et la bande correspondante au plasmide digéré est coupée à partir du gel et purifiée par le Perfectprep Gel Cleanup Sample Kit.

✓ Ligation et transformation

La ligation de la cassette dans le pEBI est réalisée dans les mêmes conditions que les ligations précédentes. La souche TOP 10F' est transformée par cinq microlitres de produit de ligation. A la fin de la transformation, les bactéries sont étalées sur boîtes LB agar-Ampicilline (100 µg/mL). Après 24 heures d'incubation à 37°C, le criblage des clones est réalisé par PCR et par digestion enzymatique au niveau des sites (*KpnI* / *BlnI*).

III.2.2.7 Identification et analyse de la séquence contenue dans le PFN103

Les constructions pEBI-insert sont séquencées par la méthode de Sanger. Cette technique permet de déterminer la séquence du fragment d'ADN étudiée grâce à l'incorporation de ddNTP marqués par des fluorochromes pendant l'amplification avec une seule amorce.

Une séquence d'ADN dans les deux sens (sens (5'-3') / anti sens (3'-5')) est ainsi obtenue. L'outil Reverse Complement (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) est utilisé pour la réversion complémentaire de la séquence d'ADN anti-sens et ce dans le but d'obtenir le sens (5'-3').

Ces deux séquences sont alors alignées entre elles via l'outil Multiple Sequence Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) dans le but de déterminer une séquence consensus via HIV sequence data base (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/consensus.html>).

Une fois le consensus obtenu, un alignement avec la base de donnée via NCBI blast tool est réalisé afin de trouver une correspondance à notre séquence.

Ces étapes nous permettent de confirmer que l'insert correspond à une partie de la fibronectine humaine. Plusieurs iso formes sont alors proposées. Celle qui présente le meilleur score de similarité est alors sélectionnée.

III.2.2.8 Transformation des bactéries d'expression : BL21pLysS, KRX

Au cours de cette dernière étape, le plasmide recombinant est extrait à partir d'un clone positif de TOP 10F' par le kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen. Ensuite, 50 ng de ce plasmide servent à la transformation par choc thermique des souches d'expression BL21 pLysS et KRX. Le criblage des transformants contenant le pEBI est réalisé cette fois par la détection de la couleur rouge pour les cultures induites.

III.2.3 Expression et purification de la cassette multitag et de la protéine de fusion

III.2.3.1 Production

Les bactéries recombinantes BL21pLysS et KRX sont cultivées à 37°C sous agitation à 225 rpm dans le milieu LB contenant l'antibiotique. L'inoculation est réalisée à partir d'une pré-culture (sur milieu LB). Pendant, la phase exponentielle, la D_{0600} atteint une valeur comprise entre 0.4-0.6. A cet instant, une concentration optimale de 0.3mM d'isopropyl- β -D-Thiogalacto-pyranoside (IPTG) est alors ajoutée pour l'induction de la culture (tableau XIX).

Tableau XIX: Conditions de culture et d'induction deKrx et BL21 (DE3) pLysS

Conditions	<i>E.coli</i> Krx	<i>E.coli</i> BL21 pLysS
Milieu	100 mL LB ; Ampicilline (100 μ g/mL)	100 mL LB ; Ampicilline (100 μ g/mL) ; chloramphénicol (34 μ g/mL)
Croissance	37°C ; 225 rpm	37°C ; 225 rpm
Induction	à DO 0,4-0,6 ; 0.3 mM IPTG + 0,1% rhamnose ; ON à 18°C	à Do 0,4-0,6 ; 0.3 mM IPTG ; ON à 18°C

III.2.3.2 Extraction des protéines recombinantes

Une centrifugation de la culture est réalisée à 4000 rpm pendant 15 min. Le culot est lavé avec du PBS (1x) puis resuspendu (dans 1/10ème du volume initial de culture) dans la solution d'extraction (Triton X100 à 0.5%, inhibiteur de protéases (Roche), PBS). L'extraction est réalisée par sonication six cycles par échantillon à 4°C. Une sonde est plongée dans le tube contenant les suspensions bactériennes.

Un cycle de sonication comprend 30 secondes de sonication et une minute de repos. Après centrifugation des extraits à 14000 rpm pendant 25 min, les surnageants sont récupérés (fraction soluble) et les culots sont resuspendus dans le même volume de PBS (1x) : (fraction insoluble). Ainsi, les échantillons obtenus sont concentrés 10 fois.

III.2.3.3 Solubilisation et renaturation des corps d'inclusion

Les corps d'inclusion sont récupérés par centrifugation de l'extrait bactérien. Les culots sont alors lavés trois fois dans une solution de lavage (NaH_2PO_4 50mM, NaCl 300mM, EDTA 1mM) puis resuspendus dans de l'eau MilliQ avant d'être centrifugés.

Les culots sont resuspendus dans une solution de solubilisation (NaH_2PO_4 50mM, NaCl 300mM, EDTA 1mM, DTT 5mM, Guanidine hydrochloride 6M) puis incubés pendant 1h minimum à +4°C sous faible agitation. A la fin de cette étape, le mélange est centrifugé et le surnageant qui contient la protéine solubilisée est récupéré afin d'être dialysé. L'échantillon subit trois dialyses successives :

- ✓ Dialyse I pendant 48h minimum à +4°C dans un tampon (NaH_2PO_4 50mM, NaCl 300mM, EDTA 1mM, DTT 5mM, Guanidine hydrochloride 3M, Arginine 0.2M, Sucrose 0.5M, MgCl_2 2mM)
- ✓ Dialyse II pendant 48h minimum à +4°C dans un tampon (NaH_2PO_4 50mM, NaCl 300mM, EDTA 1mM, DTT 5mM, Guanidine hydrochloride 1M, Arginine 0.2M, Sucrose 0.5M, MgCl_2 2mM)
- ✓ Dialyse III pendant 48h minimum à +4°C dans un tampon (EDTA 1mM, DTT 5mM, Tris 50mM, Triton X-100 à 0.1%, Glycérol 50%)

III.2.3.4 Purification des protéines d'intérêt

Les protéines totales solubles contenant la protéine recombinante sont chargées sur une colonne d'affinité à l'histidine : Ni-NTA (Sigma). La colonne est lavée deux fois avec du PBS contenant 15 mM d'imidazole. Les protéines sont éluées avec 250 mM d'imidazole.

Les fractions contenant les protéines recombinantes, fusionnées au cytochrome b5 sont visibles à l'oeil nu. Ces fractions sont regroupées et le pool de protéines est alors chargé une deuxième fois sur une colonne de streptactine (forme modifiée de la streptavidine). Après le lavage, les protéines sont éluées par 10mM de la Desthiobiotine selon les préconisations du constructeur.

III.2.4 Analyse de l'expression et de la purification de la protéine recombinante

III.2.4.1 Par SDS-PAGE

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant est une technique essentiellement analytique dans laquelle les protéines à séparer, placées dans un champ électrique, migrent à travers un support réticulé en fonction de leur masse molaire. Les protéines ainsi séparées peuvent être visualisées par coloration ou par fluorescence. Les gels de polyacrylamide utilisés sont de 12% et de 1 mm d'épaisseur, fournis par Invitrogen (NuPage Novex Bis-Tris Gels). Entre 5 et 15µg d'échantillon à analyser sont préalablement dilués avec du tampon de charge. Ce dernier, charge toutes les protéines négativement. Une dénaturation thermique par chauffage à 95°C pendant 10 min dans un thermomixer est ensuite réalisée afin de rompre les ponts disulfures des protéines qui migrent en fonction de leurs poids moléculaires et non en fonction de leurs charges. Un volume de 20µl est déposé dans chaque puits du gel et la migration s'effectue pendant 45 minutes à 200 V.

La chambre de migration des mini cuves (EI9001-XCell II Novex MiniGel, Invitrogen) est remplie avec le tampon 1X MOPS (50 mM 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid, 50 mM Tris Base, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.7). Après la migration, les gels sont mis en contact avec la solution de coloration (5 volumes méthanol, 1 volume acide acétique, 5 volumes H₂O distillée et 0.25% bleu de Coomassie) 3 heures sous agitation. La décoloration est réalisée, sous agitation, pendant 1 à 2 heures dans du tampon de décoloration (30% éthanol, 10% acide acétique).

III.2.4.2 Analyse de l'expression et de la purification par Western Blot

Les protéines recombinantes de fusion purifiées sont séparées sur un gel de poly-acrylamide SDS-PAGE. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose grâce à l'appareil iBlot Dry Blotting System (Invitrogen). Après transfert, les sites non spécifiques de la membrane sont bloqués par une solution de saturation (Tween20 à 0.05%, BSA à 2%, H₂O distillée).

La membrane est, ensuite, exposée pendant 1h au contact d'une solution de streptavidine couplée à la peroxidase. Après une succession de lavages la révélation se fait à la suite de l'ajout du substrat TMB for membranes permettant une détection spécifique des bandes correspondant aux protéines d'intérêt. Après lavage de la membrane, la photographie est réalisée grâce à un système d'imagerie GE Health care.

III.2.4.3 Analyse de l'expression et de la purification par spectrométrie de masse

La bande correspondant à la fibronectine III9-10 purifiée est découpée à partir du gel puis placée dans un tube contenant 50 µl d'eau MilliQ et enfin congelée à -20°C jusqu'à l'étape de digestion des protéines par la trypsine. La digestion avec la trypsine est réalisée en utilisant le Proteineer SPII automatisé (Bruker Daltonik) et les robots du digesteur Ettan (Amersham Biosciences), en se référant aux instructions du fabricant. Les produits de la digestion ont été mélangés avec une matrice de solution saturée d'acide cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) dans 50% d'acétonitrile et 2% d'acide formique et déposés sur une plaque d'échantillon MALDI. L'instrument MALDI-TOF / TOF (UltrafleXtreme, Bruker Daltonics) a été utilisé en mode d'ions positifs et Aa été contrôlé par le logiciel Compass for Flex, version 1.4 (FlexControl 3.4, 3.4 Flexanalysis, Bruker Daltonics); 4000 tirs laser ont été accumulés par spectre dans les modes MS et MS / MS.

Les spectres MS ont été calibrés en utilisant le mélange de calibration standard de peptides (Peptide Calibration Standard mixture, Bruker Daltonics). Les peptides d'intérêt ont été sélectionnés pour la MS / MS selon les données MS.

Les données obtenues par MS et MS / MS ont été soumises à la base de données SwissProt / UniProtKB (<http://www.expasy.org>) en utilisant le logiciel MASCOT (matrice des sciences). Les paramètres de recherche utilisés sont les suivants: taxonomie Homo sapiens; carbamidomethylation fixe des résidus de cystéine; oxydation variable des résidus de méthionine; la tolérance de la masse du peptide est de 30 ppm et la tolérance de la masse du fragment-ion est de 0,5 Da. Le score ion Mascotte MS / MS > 30 indique l'identité (p <0,05).

III.2.5 Suivi de l'adsorption de la CMAT-FNIII9-10

Nous avons exploité la propriété du cytochrome b5 à émettre une coloration rouge en présence de l'acide δ-aminolévulinique (ALA) in bactério pour la reproduire in vitro. Pour cela, une plaque de micro-titrage de 24 puits (Corning) a été utilisée pour l'adsorption de 16µg et de 34µg de fibronectine recombinante de fusion en solution.

Après une incubation de 16 heures à 4°C, les surnageants (non adsorbés) ont été prélevés puis ajoutés dans deux différents puits contenant chacun 100 µl d'un extrait protéique bactérien d'une souche non transformée par le pEBI et cultivée en présence de 2 mM d'acide δ-aminolévulinique (ALA). Cette souche ne produit donc pas le cytochrome b5. Une incubation des surnageants a été réalisée pendant 60 min à 37 ° C. Un échantillon ne contenant que de l'extrait bactérien a été utilisé comme témoin et incubé dans les mêmes conditions.

Les surnageants correspondant aux solutions initiales de coating (16µg et 34µg) ont ensuite été dosés par la mesure de l'absorbance à 400 nm (longueur d'onde spécifique du cytochrome b5) et à 562nm (absorbance des protéines totales). Ainsi, la quantité de protéines adsorbées a été déterminée à partir du calcul de la différence entre la quantité initiale des protéines totales (dans la solution de coating (16µg et 34µg)) et la quantité des protéines mesurée dans les surnageants.

III.2.6 Evaluation de l'activité biologique du fragment CMAT-FNIII9-10

Après avoir produit et validé le fragment FNIII9-10 en fusion avec la CMAT, son activité biologique a été investiguée d'abord sur un support en polystyrène en présence de cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC). Une fois l'activité adhésive de notre fragment confirmée, nous pouvons envisager la stratégie de son immobilisation à la surface du biomatériau (films de PCL) dans le cadre de sa fonctionnalisation. La réponse cellulaire d'adhésion sur le échafaudage fabriqué a été étudiée.

III.2.6.1 Elaboration de films de PolyCaproLactone

La PCL employée dans cette étude est un produit commercial (Aldrich). La PCL a été utilisée sans purification préalable. Les films de PCL sont préparés par « spin-coating ». Pour ce faire, la PCL est dissoute dans une solution de dichlorométhane (DCM – Fluka ; d=1,33 g.cm⁻³) avec une concentration à 60%(m/v) – soit 1,2g de PCL pour 2 mL de DCM (dissolution pendant une nuit).

La solution (2 mL) est étalée dans une boîte de pétri Steriplan (Duran 100 x 10 mm), puis spin-coatée pendant 30 secondes à une vitesse de 1500 tours.min⁻¹, à l'aide d'un spin-coater (Spin 150-v3, SPS). Par la suite, les films sont séchés 24 heures à température ambiante pour permettre l'évaporation du DCM.

Pour finir, les films sont décollés de la boîte de pétri et découpés à l'emporte-pièce pour obtenir des disques de 1,56 cm de diamètre environ avec une épaisseur moyenne de 45 µm.

Après le découpage des disques de PCL, ceux-ci sont lavés à l'acétone pendant 3 heures pour éliminer le dichlorométhane, puis à l'eau pendant une nuit pour éliminer l'acétone. Pour la stérilisation, les films sont placés dans des bains d'éthanol à 70° pendant une nuit.

Afin de les conditionner pour la culture cellulaire, chaque disque de PCL est déposé dans un puits d'une plaque 24 puits et est ensuite incubé 3x30 minutes dans du PBS, puis 3x30 minutes dans du DMEM, pour éliminer l'éthanol, et enfin une nuit dans du DMEM + PS + FZ + SVF 10% (Annexe). Ce milieu de culture sera éliminé juste avant l'ensemencement des disques par les cellules.

III.2.6.2 Analyse des disques de PCL par EDX (Energy Dispersive X-Ray)

L'analyse EDX ou spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie est une technique qui permet de connaître la composition élémentaire qualitative et/ou quantitative d'un échantillon. Elle peut être associée à des outils d'imagerie comme la SEM (microscopie électronique à balayage). L'analyse EDX se base sur le principe de l'utilisation d'une diode Si(Li) qui mesure les énergies des photons X émis par la région de l'échantillon bombardée par le faisceau d'électrons. Les surfaces traitées peuvent être aussi petites que le nanomètre. Les renseignements apportés fournissent la distribution latérale des éléments de la surface numérisée sous forme d'image.

III.2.6.3 Construction de l'échafaudage adhésif : PCL-CMAT

Dans le cadre du design d'un échafaudage adhésif, le fragment recombinant a été immobilisé, via son partenaire de fusion CMAT, d'une manière non orientée puis orientée à la surface des disques de PCL, à travers une couche de streptavidine.

Pour cela, nous avons disposé les disques de PCL dans une plaque de 24 puits. Ensuite, nous avons préparé une solution de streptavidine à 10 μ M (déterminée par rapport à la zone de surface 1.9cm²) dans du PBS, que nous avons adsorbée à la surface des disques de PCL. Après une heure d'incubation à température ambiante, nous avons éliminé le surnageant et rincé, pendant 10 minutes, les disques trois fois avec du PBS.

Une solution de fibronectine recombinante (CMAT-FNIII9-10) a été préparée à 20 μ M, puis utilisée pour coater les PCL traités avec la streptavidine. La plaque de 24 puits a été agitée à faible vitesse dans le but d'homogénéiser l'étalement de la solution de fibronectine à la surface des PCL. Après une incubation à 4°C pendant une nuit le surnageant est éliminé, les disques sont rincés abondamment trois fois avec du PBS.

A la fin de cette étape, une solution de BSA à 1% a été ajoutée à la surface de certains disques et incubée à 37°C pendant 1 heure. L'excès de cette solution de blocage des sites est enlevé et les disques sont prêts à être ensemencés par les cellules.

III.2.6.4 Adhésion cellulaire

✓ Origine cellulaire

Les cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC) utilisées dans la présente étude dans le but de valider l'activité biologique du fragment recombinant, ont été obtenues à partir de moelles osseuses prélevées chez des patients sains lors d'arthroplasties totales de hanches. Tous les échantillons ont été obtenus, auprès du «Service de Chirurgie Orthopédique de l'Hôpital d'Instruction des Armées Percy" (Clamart, France).

Les (hMSC) ont été cultivées dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal (FCS, PAN Biotech GmbH) et 1% de pénicilline / streptomycine (Gibco) à 37 ° C dans une atmosphère à 5% de CO₂ jusqu'à confluence.

✓ Ensemencement cellulaire

Le contenu cellulaire d'une flasque est « trypsiné » puis repris dans 10 mL de milieu de culture. Cette suspension cellulaire est comptée au Coulter Z1 puis diluée dans du milieu de culture pour obtenir une concentration finale de 10000 cellules / mL.

Dans une plaque de 24 puits, dans laquelle ont été déposés les films de PCL conditionnés, 40000 cellules sont déposées dans chaque puits. Après incubation, les cellules non adhérentes (surnageant de culture) et les cellules ayant adhéré (cellules « trypsinées » sur le fond du puits ou sur le film de PCL) sont comptées au Coulter Z1. Toutes les mesures sont réalisées en triplicate.

✓ Comptage des cellules

Les cellules sont comptées à l'aide d'un compteur de cellules automatisé (Coulter Z1, Coulter Electronics, England). Le diamètre d'aspiration des cellules est supérieur à 8µm (Annexe).

A l'aide d'un tampon isotonique (Coulter® Isoton® II Diluent), une première mesure est réalisée pour mesurer le bruit de fond. Un mL de suspension cellulaire est mélangé à 9mL d'Isoton® dans une cuve à Coulter.

Après homogénéisation des cellules, la mesure est effectuée par l'appareil (nombre de cellules par mL). L'homogénéité de la suspension cellulaire est vérifiée à l'aide d'un graphique de répartition cellulaire donné par l'instrument.

✓ **Microscopie électronique à balayage (MEB)**

Les cellules adhérentes au film de PCL sont observées par Microscopie Electronique à Balayage (MiniMEB TM3000, Hitachi) (Annexe). Pour se faire, les cellules ont tout d'abord été fixées dans de l'éthanol. Les films sont ensuite séchés pour une projection d'électrons efficace sous vide. Le film est ensuite collé sur un porte échantillon à l'aide d'un scotch carbone double face et le tout est inséré sur la platine Peltier du mini MEB refroidie à 18°C.

La température de la platine est aussitôt abaissée à 10°C. Le vide se fait ensuite dans le miniMEB. L'observation se fait sous une tension d'environ 15 kV.

IV. RESULTATS

Au cours de cette thèse, nous avons cloné les domaines 9 et 10 du type III de la fibronectine humaine impliqués dans l'adhésion cellulaire, en phase avec un multitag de coloration et d'affinité CMAT. Après la validation des étapes de clonage, la première étape de nos travaux a été de réaliser l'optimisation de la production de la protéine recombinante de fusion. Plusieurs paramètres tels que la souche d'expression, la température de culture après induction et la concentration en inducteur ont été étudiés.

La seconde étape a été le suivi en temps réel des étapes de production, d'extraction et de purification de la protéine d'intérêt grâce au tag de coloration (le domaine de fixation de l'hème du cytochrome b5). Par ailleurs, nous avons mis au point un système permettant le suivi visuel et la quantification des protéines adsorbées à la surface du support.

Ensuite, nous avons vérifié que le fragment recombinant produit était biologiquement actif. Nous avons donc évalué son aptitude à fixer les cellules mésenchymateuses souches. L'étape de validation de l'activité adhésive est très importante dans la mesure où l'on vise la fonctionnalisation de la surface d'un biomatériau par ce fragment. Par la suite, nous avons réalisé une adsorption de la protéine recombinante de fusion sur un support de PCL. L'activité du fragment recombinant a été comparée avec celle d'une fibronectine entière commercialisée.

Enfin, nous avons cherché à orienter l'adsorption de la protéine de fusion de manière à exposer les sites responsables de l'attachement cellulaire. Pour cela, nous avons adsorbé à la surface de notre PCL une couche de streptavidine sur laquelle ont été immobilisés les fragments de FNIII9-10 grâce à l'établissement d'une liaison SBP-Streptavidine. Des cellules mésenchymateuses souches humaines ont été ajoutées à cette construction multi couches et le comportement adhésif de cette dernière a été étudié.

Les résultats seront présentés suivant trois grandes parties :

Partie I : Design et clonage du fragment FNIII9-10

Partie II : Production, validation et traçage

Partie III : Elaboration d'un support adhésif et étude de la réponse cellulaire

IV.1 Design et clonage du fragment FNIII9-10

IV.1.1 Design de la construction

Lors de ce travail, nous avons construit un multitag d'expression (figure 24) composé d'une part de deux tags d'affinité permettant la simplification de l'étape de purification du fragment recombinant et garantissant un meilleur rendement de purification. D'autre part, un marqueur coloré permet le suivi en temps réel des procédés de production, de purification et d'adsorption des domaines 9 et 10 de la FN humaine. Dans la perspective de vouloir disposer de la protéine FNIII9-10 sans partenaire de fusion, nous avons inséré un site de clivage spécifique.



Figure 24: Composition de la cassette d'expression

La cassette possède les deux tags d'affinités permettant de réaliser une double chromatographie d'affinité afin d'améliorer le degré de pureté de la protéine recombinante : une séquence 10xHis permettant une purification sur colonne NTA-Ni²⁺, un Tag SBP pour la réalisation d'une chromatographie d'affinité sur colonne de streptavidine ou de streptactine. Le multitag comprend le domaine de fixation de l'hème du cytochrome b5 qui est le tag de coloration et un site de clivage de la TEV protéase qui permet de séparer la protéine recombinante FNIII9-10 de la CMAT.

IV.1.2 Clonage du fragment recombinant FNIII9-10

IV.1.2.1 Synthèse de l'insert FNIII9-10

La séquence codant les domaines 9 et 10 a été amplifiée à partir du gène codant la fibronectine humaine du pFN103 par PCR avec les amorces a1 décrites dans la section « matériels & méthodes ». La figure 25 a montre la simulation préliminaire de la PCR théorique par le biais du logiciel Serial cloner et la validation de celle-ci sur gel d'agarose 1%.

La taille de l'amplicon obtenu correspond à la taille théorique du fragment attendu faisant 572 pb (indiqué par une flèche sur la figure 25 b).

Après la confirmation expérimentale de l'étape de PCR, nous avons procédé au clonage du fragment d'intérêt dans le vecteur de sous clonage le PCR2.1.

(a)

(b)

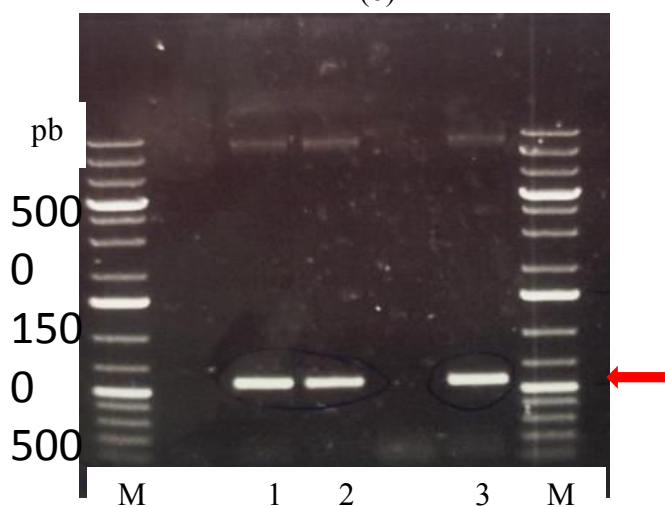


Figure 25: Analyse du clonage par PCR. (a) Validation par le logiciel serial cloner de la PCR de simulation (b) Analyse sur gel d'agarose à 1% du produit PCR à partir du pFN 103 M : marqueur de poids moléculaire (1 Kb DNA Ladder), 1-3 : Clones transformés

IV.1.2.2 Sous clonage dans le vecteur PCR2.1 et validation

L'étape de sous clonage de FNIII9-10 dans le vecteur PCR2.1 nous permet l'insertion rapide et directe d'un produit PCR dans un vecteur plasmidique en une seule étape. Grâce à l'ajout d'un seul désoxyadénosine (A) aux extrémités 3' des produits de PCR codant l'insert, ces derniers se lient efficacement aux résidus 3' désoxythimidines (T) du vecteur linéarisé.

A la fin de l'étape de sous clonage, l'insertion du fragment d'intérêt est vérifiée par le biais du logiciel Serial cloner. Par ailleurs, nous avons réalisé la validation du sous clonage par PCR et par digestion enzymatique dans le but de vérifier la présence de l'insert. A cet effet, deux digestions du PCR2.1 recombinant ont été réalisées. La digestion non spécifique, réalisée par EcoRI a généré trois fragments. Le premier se situe au niveau de 3900 pb correspondant à la taille du PCR2.1 linéarisé, les deux autres fragments se situent vers les 400 pb et 170 pb. La visualisation de ces trois fragments indique que l'enzyme EcoRI possède 3 sites sur le vecteur recombinant. En effet, EcoRI ne coupe pas seulement de part et d'autre de l'insert mais également à l'intérieur de celui-ci d'où la présence de deux fragments dont la somme de correspond à la taille de l'insert (figure 26 a).

Dans un second temps, nous avons réalisé une digestion spécifique, par le couple PmlI / BlnI. Ce dernier coupe de part et d'autre de l'insert. La digestion a résulté en l'obtention d'un premier fragment de haut poids moléculaire situé vers les 4000 pb et correspondant au PCR2.1 linéarisé et un second fragment de taille plus faible situé vers les 570 pb ce qui correspond à la taille théorique de l'insert (figure 26b).

a

b

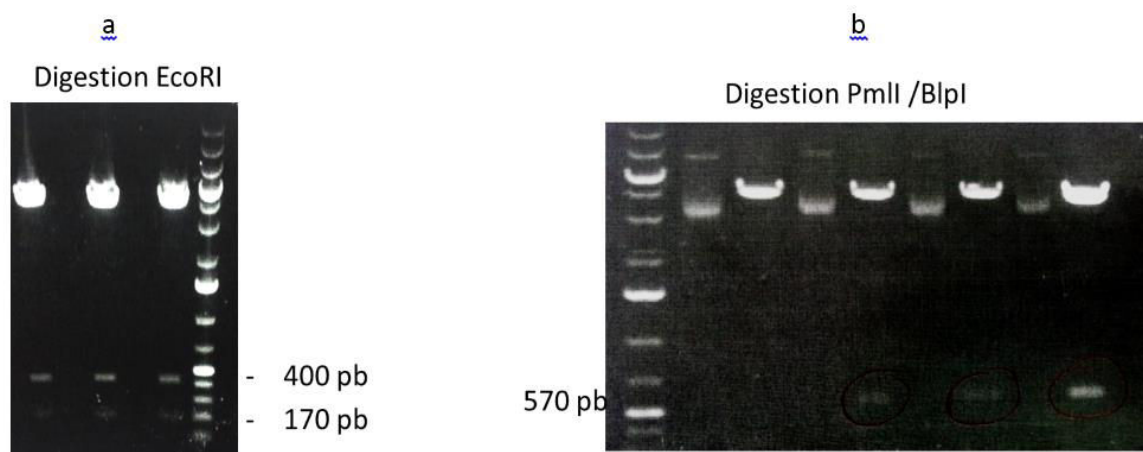


Figure 26: Validation de l'insertion du fragment d'intérêt par digestion aux enzymes de restriction

IV.1.2.3 Clonage et validation de l'insert dans le vecteur d'expression

Après avoir validé les étapes préliminaires de clonage, nous procédons à l'insertion du fragment d'intérêt dans le vecteur d'expression. La séquence codante pour les domaines 9 et 10 de la FN a été amplifiée à partir du PCR2.1, validée puis digérée par le couple d'enzymes de restriction BlnI et SmaI. Le plasmide pET15b, contenant la CMAT, a été linéarisé au niveau des mêmes sites de restriction en aval de la cassette CMAT (Figure 27). A ce niveau le vecteur est prêt à intégrer la séquence d'intérêt.

La ligation a été d'abord réalisée théoriquement via le logiciel Serial cloner et nous avons réussi à valider cette étape par simulation. Les résultats de la ligation *in silico* sont représentés sur la figure 27.

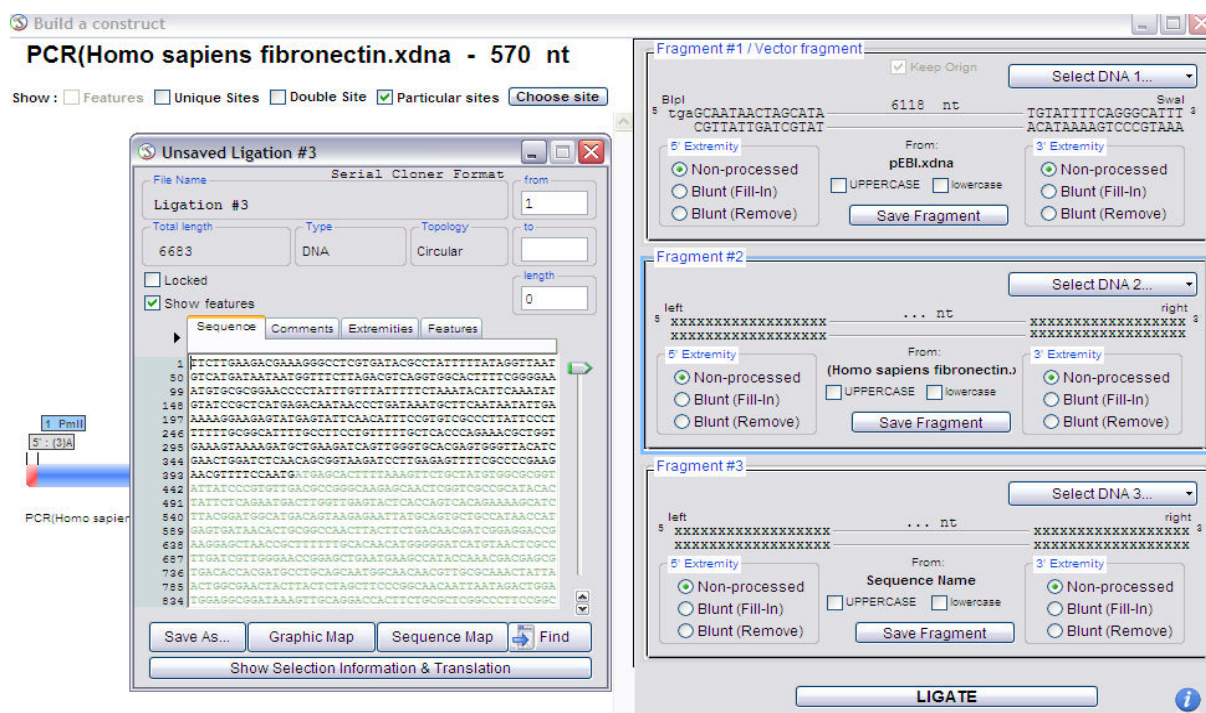


Figure 27: validation de la ligation pEBI-insert par simulation

La ligation in silico confirme que le plasmide recombinant pEBI-CMAT-FNIII9-10 présente une taille de 6683 pb correspondant à la taille du plasmide linéarisé ayant incorporé le fragment recombinant.

Par la suite, nous avons réalisé une PCR sur le vecteur recombinant qui a révélé la présence, pour tous les clones testés, d'une bande aux environs de 570 pb correspondant au poids moléculaire attendu pour le fragment FNIII9-10 (figure 28). Ceci confirme donc que l'étape de ligation a été réussie.

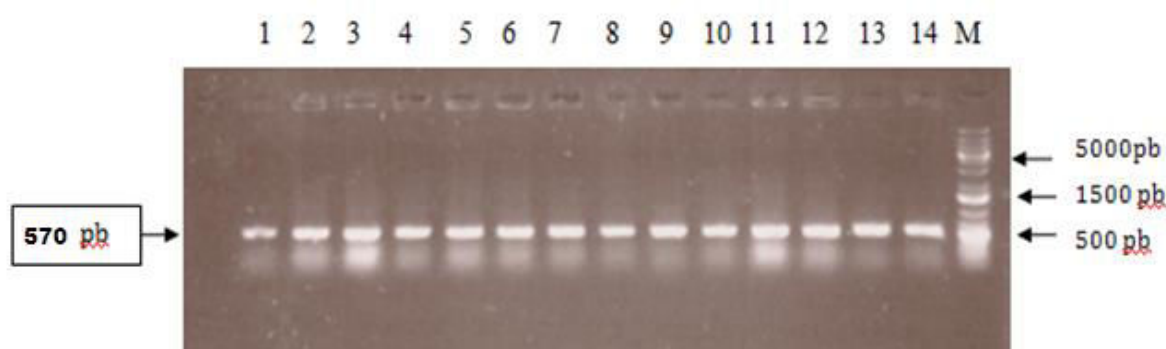


Figure 28: Résultat de la PCR réalisée sur le pEBI

1-14: différents clones recombinants analysés, M: marqueur de poids moléculaire (1 Kb DNA Ladder), la flèche située au niveau de 570 pb indique les bandes correspondant à la taille attendue de l'insert.

D'autre part, nous avons réalisé une digestion enzymatique du pEBI recombinant par le couple d'enzyme (KpnI / BlnI). Le produit de digestion a été révélé sur gel d'agarose. On remarque la présence de deux fragments sur le gel d'agarose. Le premier se situe vers 5700 pb et correspond à la taille du pEBI linéarisé. Un autre fragment est visible sur le gel vers 912 pb et correspond à la taille théorique attendue de l'insert (figure 29). Ces résultats viennent valider les différentes étapes de clonage réalisées.

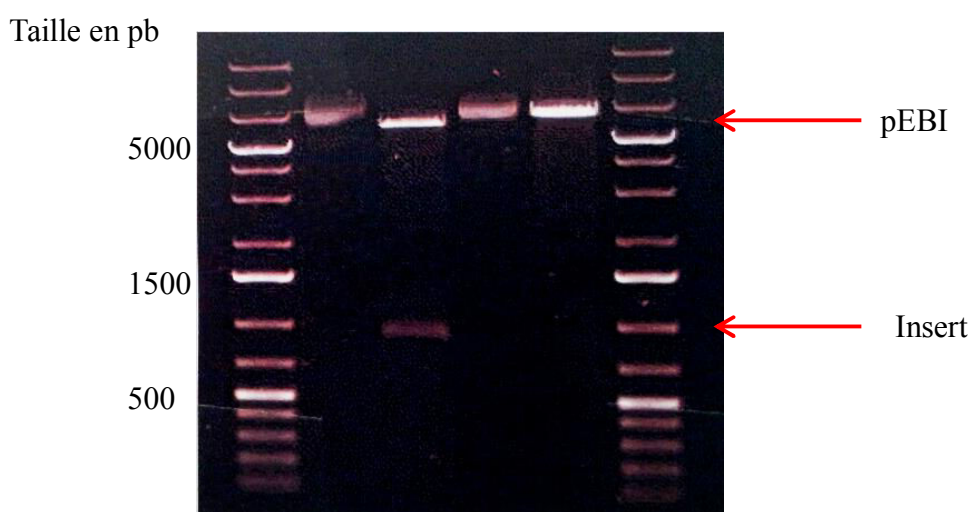


Figure 29: validation de la ligation de l'insert FNIII9-10 dans le vecteur d'expression pEBI par digestion enzymatique

IV.1.2.4 Validation des étapes de clonage et identification de la séquence par bioinformatique

Enfin, nous avons voulu connaître la succession des bases qui forment la séquence d'intérêt et déterminer l'ordre de leur enchaînement afin d'identifier le fragment d'intérêt. Cette étape a pu être réalisée grâce à des outils de biologie moléculaire tel que le séquençage et à des logiciels de bioinformatique.

• Résultat du séquençage

Nous avons procédé au séquençage du plasmide recombinant pEBI-FNIII9-10 selon la méthode Sanger Big Dye Terminator. Les résultats du séquençage sont déterminants car ils nous ont

permis de confirmer la séquence ainsi que les ORF de la construction. Les résultats ont fourni les séquences sens / anti sens suivantes :

>FN_Asens

```
ganancatacacagtgatggtataatcaactccagggttaaggccgctgatggtagctgtagacttgctcccaggcacagtgaaactcct
ggacagggctatttctcctgtttctccgtaagtgatcctgtaatatctcactgtgacagcaggagcatcccagctgatcagtaggctggt
gggggtcgcagcaacaacttccagggtccctcggaacatcagaaactgttgattgttgccaatcaataagggacttctcctctgccatta
agagcaacgatgctgaccacatactctgtgcctggagtgaggttggtgaggggtgatggaattccgagagtggggcaccgatctctc
gaggtctcccactgaagtgtcgggatgatggcggatcctgtagccagtgatggtggctcgaggagcaatccagtgacagtaaaag
agttggcagtaatatcagaaaagtcaatgccagttgggggaatcaagacctgtttctgtcttctctaagaggtgtgctctcatgtgttctg
agacactggagacactcactacataattctgtaccaggcaggagatttgttaagaccactgcattgtctgaaggagaaattgacaactctg
caacatcttctcattttcacagggtgagtaacgcaccaggaagttggttaaatcaatggatgggggtggagcccaggtgacacgcatg
gtgtctggaccaatgttggtgaatgcagggtcagtgaggaggaggaacagccgttgtgtcatgtagtaggggactctcgcgcga
ttaatgagagtataacgctgatatacatagtaatgcccggctccagccctgtgactgtgtagtacctactgaggagtcacaaaaattctt
caaaaatagggataccttctcctgccgcaactactgtgatgcggtaccaataatgggtggaagagtttagcgggggtccacctcaggcc
gatgctgaatcggttatatcaaaaagcttaggtcagtgagttngggcacctctgggnatgatggtatcnaanaataanggacatttt
cctt
```

>fn_sens

```
aacctgacctggagtgtcacagtctcctgggagaggagcaccacccagacattactggttatagaattaccacaacccctacaaa
cggccagcagggaaattcttggaaagtgggtccatgctgatcagagctcctgcacttttgataacctgagtcgggctggagtaca
atgtcagtgttacactgtcaaggatgacaaggaaagtgtccctatctctgataccatcatcccagaggtgccccaaactcactgacctaag
ctttgtgataaaccgattcaagcatcggcctgaggtggaccccgctaaactcttccaccattattgggtaccgcatcacagtagttgcg
gcaggagaaggtatccctattttgaagattttgtggactcctcagtaggatactacacagtcacagggctggagccgggcattgactat
gatatcagcgttatcactctcattaatggcggcgagagtccccctactacatgacacaacaaacggctgttctcctcccactgacctgc
gattcaccaacattgggtccagacacatgcgtgtcacctgggtccacccccatccattgatttaaccaacttctggtgcgttactcacct
gtgaaaaatgaggaagatgttgacagattgtcaatttctcctcagacaatgcagtgggtcttaacaaatctcctgctgtgacagaatatgt
agtgagtgctccagtgctacgaacaacatgagagcacacctcttagaggaagacagaaaacaggtcttgattcccaactggcattg
acttttctgatattactgccaactcttttactgtgcactggattgtcctcgagccaccatcactggctacaggatccgccatcatcccgagc
acttcagtgaggagacctcgagaagatcgggtgccccactctcggaattccatcacctcaccaacctcactccaggcacagagtatgt
ggtcagcatcgttgctcttaatggcagnnaggaaagtcccttattgattggccaacaatcaacangtttctgatgttccgaggnacctgg
aaantgttgctgcgacccc
```

- Réversion de la séquence

Grâce à l'outil REVSEQ toolkit du programme EMBOSS (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/revseq>) nous avons établi une réversion de la séquence FNAs dans le but de synthétiser une séquence consensus correspondant au fragment cloné et qui nous sert de matrice pour l'identification de celle-ci dans la base de données. Cette dernière est donnée ci-dessous.

[Delete Data](#)[Download Data](#)[Return To Data List](#)[Show/Hide Data Contents](#)

```
>FN_AntiSens_REVERSE
aaGGaAAAgTgtCCnttatnttngAtaCCATCATncCCAGAGGTGCcnaAactCACTGA
CCTAAGCTTTGTTGATaTAACCGATTCAAGCATCGGCCTGAGGTGGACCcCGCTAAACTC
TTCCaCCATTATTGGGTACCGCATCACAGTAGTTGCGGCAGGAGAAGGTATCCCTATTT
TTGAAGATTTTGTGGACTCCTCAGTAGGATACTACACAGTCACAGGGCTGGAGCCGGCA
TTGACTATGATATCAGCGTTATCACTCTCATTAAATGGCGGCAGAGTGCCCTACTACAT
GACACAACAACCGCTGTTCTCTCCCTCCACTGACCTGCGATTACCAACATTGGTCCAGA
CACCATGCGTGTCACCTGGGCTCCACCcCCATCCATTGATTAAACCAACTTCTGGTGCG
TTACTCACCTGTGAAAAATGAGGAAGATGTTGCAGAGTTGTCAATTTCTCTTCAGACAA
TGCACTGGTCTTAACAAATCTCCTGCCTGGTACAGAAATGTAGTGAGTGCTCCAGTGT
CTACGAACAACATGAGAGCACACCTCTTAGAGGAAGACAGAAAACAGGTCTTGATTCCCC
AACTGGCATTGACTTTTCTGATATTACTGCCAACTCTTTTACTGTGCACTGGATTGCTCC
TCGAGCCACCATCACTGGCTACAGGATCCGCCATCATCCCGAGCACTTCAGTGGGAGACC
TCGAGAAGATCGGGTGCCCCACTCTCGGAATCCATCACCCCTACCAACCTCACTCCAGG
CACAGAGTATGTGGTCAGCATCGTTGCTCTTAATGGCAGAGAGGAAAGTCCCTTATTGAT
TGGCCAACAATCAACAGTTTCTGATGTTCCGAGGGACCTGGAAGTTGTTGCTGCGACCCC
CACCAGCCTACTGATCAGCTGGGATGCTCCTGCTGTCacaGTGAGATATTACAGGATCAC
TTACGGAGAAAcaGGAGGAAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCactGTGCTGGGAGCAAGTC
TacagCTACCAatcaGCGGCCTTAAACCTGGAGTTGATTATACCAatcactGTGTATGntnt
c
```

- Alignement multiple de séquences

La séquence FN-Antisens-Reverse obtenue précédemment a été alignée avec la séquence sens fournie par les étapes du séquençage grâce à l'outil clustal omega dans le but de constituer la séquence consensus. L'alignement de celles-ci est représenté ci après.

<u>FN Sens</u>	GACAGAAAACAGGTCTTGATTCCCACTGGCATTGACTTTTCTGATATTACTGCCAACT
<u>FN AntiSens REVERSE</u>	GACAGAAAACAGGTCTTGATTCCCACTGGCATTGACTTTTCTGATATTACTGCCAACT

<u>FN Sens</u>	CTTTTACTGTGCACTGGATTGCTCCTCGAGCCACCATCACTGGCTACAGGATCCGCCATC
<u>FN AntiSens REVERSE</u>	CTTTTACTGTGCACTGGATTGCTCCTCGAGCCACCATCACTGGCTACAGGATCCGCCATC

<u>FN Sens</u>	ATCCCGAGCACTTCAGTGGGAGACCTCGAGAAGATCGGGTGCCCCACTCTCGGAATTCCA
<u>FN AntiSens REVERSE</u>	ATCCCGAGCACTTCAGTGGGAGACCTCGAGAAGATCGGGTGCCCCACTCTCGGAATTCCA

<u>FN Sens</u>	TCACCTCACCAACCTCACTCCAGGCACAGAGTATGTGGTCAGCATCGTTGCTCTTAATG
<u>FN AntiSens REVERSE</u>	TCACCTCACCAACCTCACTCCAGGCACAGAGTATGTGGTCAGCATCGTTGCTCTTAATG

<u>FN Sens</u>	GCagannaGGAAAGTCcTTATTGATTGGCCAACAATCAACangtTtTGATGTTCCGagg
<u>FN AntiSens REVERSE</u>	GCAGAGAGGAAAGTCCCTTATTGATTGGCCAACAATCAACA-GTTTCTGATGTTCCGAGG
	** ***** ** *****
<u>FN Sens</u>	naCCTGGAAantTGttGCTGCGaccccc-----
<u>FN AntiSens REVERSE</u>	GACCTGGAA-GTTGTTGCTGCGACCCCCACCAGCCTACTGATCAGCTGGGATGCTCCTGC
	***** ** *****
<u>FN Sens</u>	ACAGTCACAGGGCTGGAGCCGGGCATTGACTATGATATCAGCGTTATCACTCTCAATTAAT
<u>FN AntiSens REVERSE</u>	ACAGTCACAGGGCTGGAGCCGGGCATTGACTATGATATCAGCGTTATCACTCTCAATTAAT

<u>FN Sens</u>	GGCGGCGAGAGTGCCCTACTACATGACACAACAAACGGCTGTTCTCTCCCACTGACC
<u>FN AntiSens REVERSE</u>	GGCGGCGAGAGTGCCCTACTACATGACACAACAAACGGCTGTTCTCTCCCACTGACC

<u>FN Sens</u>	TGCGATTACCAACATTGGTCCAGACACCATGCGTGTCACTGGGCTCCACCCCATCCA
<u>FN AntiSens REVERSE</u>	TGCGATTACCAACATTGGTCCAGACACCATGCGTGTCACTGGGCTCCACCCCATCCA

<u>FN Sens</u>	TTGATTTAACCAACTTCCTGGTGCGTTACTCACCTGTGAAAAATGAGGAAGATGTTGCAG
<u>FN AntiSens REVERSE</u>	TTGATTTAACCAACTTCCTGGTGCGTTACTCACCTGTGAAAAATGAGGAAGATGTTGCAG

<u>FN Sens</u>	AGTTGTCAATTTCTCCTTCAGACAATGCAGTGGTCTTAACAAATCTCCTGCCTGGTACAG
<u>FN AntiSens REVERSE</u>	AGTTGTCAATTTCTCCTTCAGACAATGCAGTGGTCTTAACAAATCTCCTGCCTGGTACAG

<u>FN Sens</u>	AATATGTAGTGAGTGTCTCCAGTGTCTACGAACAACATGAGAGCACACCTCTTAGAGGAA
<u>FN AntiSens REVERSE</u>	AATATGTAGTGAGTGTCTCCAGTGTCTACGAACAACATGAGAGCACACCTCTTAGAGGAA

- Synthèse de la séquence consensus

L'alignement des séquences FN-Antisens-Reverse / FN-Sens nous permet enfin de synthétiser la séquence consensus par le biais du consensus tool sur HIV seq database fournie ci après.

>Consensus_A_AS_sans_BdD

```
aaccctgacc tggagtgtc acagtctcct gggagaggag caccaccca
gacattactg gttatagaat taccacaacc cctacaaacg gccagcaggg
aaattctttg gaagaagtgg tccatgctga tcagagctcc tgcactttt
ataacctgag tcccgccctg gagtacaatg tcagtgttta cactgtcaag
gatgacaag aaagtgtccc tattctctg ataccatcat tcccagaggt
gccccaaact actgacctaa gctttgttga tataaccgat tcaagcatcg
gcctgagggt gaccccgcta aactcttcca cccattattg ggtaccgat
cacagtagtt gcggcaggag aaggtatccc ttttttgaa gattttgtg
actctcagt aggatactac acagtcacag ggctggagcc gggcattgac
tatgatata gcgttatcac tctcattaat ggcggcgaga gtgccctac
tacatgacac aacaacggc tgttctcct cccactgacc tgcgattcac
caacattggt ccagacacca tgcgtgtcac ctgggtcca ccccatcca
ttgatttaac caactctctg gtgcgttact cacctgtgaa aaatgaggaa
gatgttgag agttgtcaat ttctcttca gacaatgcag tggcttaac
aaatctctg cctggtacag aatatgtagt gagtgtctcc agtgtctacg
aacaacatga gagcacacct ctagaggaa gacagaaaac aggtcttgat
tcccaactg gcattgactt ttctgatatt actgccaact ctttactgt
gcactggatt gctctcgag ccaccatcac tggctacagg atccgccatc
atcccagca ctacgtggg agacctcgag aagatcggt gcccactct
cggaattcca tcacctcac caacctact ccaggcacag agtatgtgt
cagcatcgtt gctctaatg gcagagagga aagtcctta ttgattggc
aacaatcaac agtttctga tgtccgagg gacctgaaa gttgtgtctg
cgacccccac cagctactg atcagctggg atgctcctgc tgcacagtg
agatattaca ggatcactta cggagaaaca ggaggaaata gccctgtcca
ggagttcact gtgcctggga gcaagtctac agctaccatc agcggcctta
aacctggagt tgattatacc atacttgtt atgttc
```

- Identification de la séquence consensus

En dernière étape, nous procédons à l'alignement de notre séquence consensus, établie précédemment, avec une multitude de séquences de la base de donnée du NCBI par le biais du « data base sequence blast ». Cet outil permet de trouver les régions similaires à notre séquence par alignement avec des régions homologues. Ce programme a retrouvé rapidement dans ses bases de données, des séquences ayant des zones de similitude avec la séquence d'intérêt correspondant aux domaines 9 et 10 de la fibronectine humaine. Le résultat de l'alignement est représenté ci-dessous.

Nous observons une identité de l'ordre de 99 % avec l'isoforme Homo sapiens fibronectin 1 (FN1), avec un query cover de 99% (figure 30). Ces observations confirment par conséquent l'identité de notre séquence. A ce niveau nous pouvons entamer la phase de production du fragment FNIII9-10.

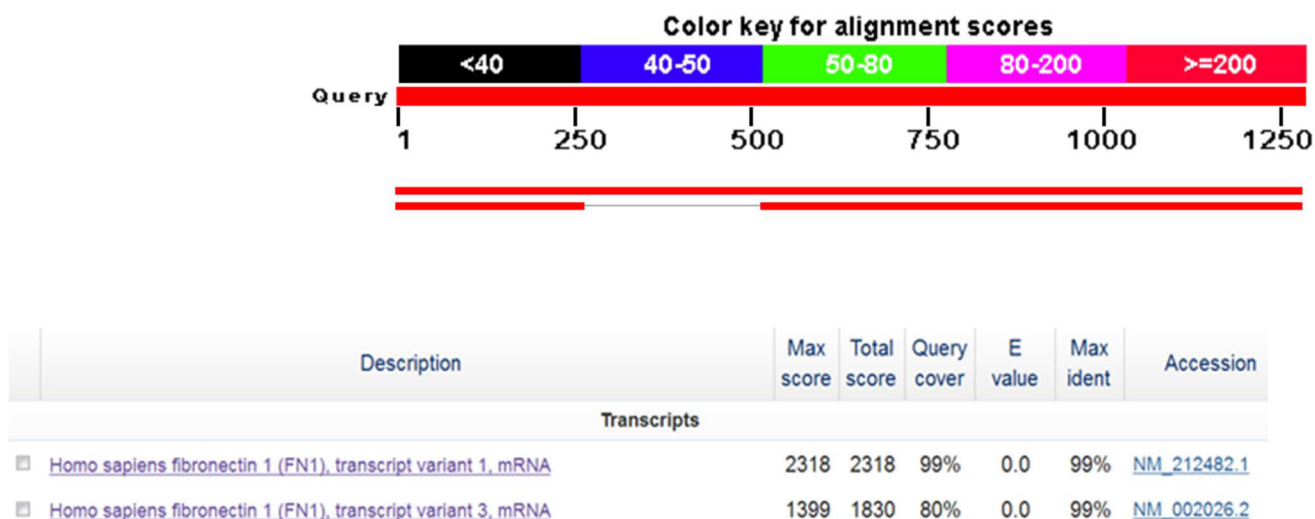


Figure 30: Résultat de l'alignement de la séquence FNIII9-10 avec les séquences de la base de données du NCBI

IV.2 Production, validation et traçage du fragment FNIII9-10

Dans cette partie, nous allons d'abord analyser les résultats obtenus pour les études d'expression, d'optimisation de la production et de purification du fragment FNIII9-10 dont le clonage en phase avec la CMAT a été validé. Ensuite, nous allons évaluer la capacité du système CMAT (via le tag de coloration) dans le traçage en temps réel des étapes de production, de purification et d'adsorption.

Nous présenterons ensuite les résultats de validation de la production et de la purification. Enfin, nous étudierons l'activité biologique du fragment recombinant afin d'évaluer son comportement adhésif vis-à-vis des cellules mésenchymateuses souches humaines.

Au cours de ce travail, *E.Coli* BL21 (DE3) pLysS et KRX ont été transformées par le plasmide recombinant pET15b-CMAT-FNIII9-10 dans le but de produire le fragment codant le domaine de fixation cellulaire de la fibronectine humaine.

IV.2.1 Etude de la cinétique de croissance des deux souches BL21 p Lys S et KRX

Afin de caractériser et de comparer la cinétique de croissance des deux souches de production utilisées pour l'expression du fragment FNIII9-10, nous avons procédé à des cultures de 16h des souches KRX et BL21 pLysS induites dans les mêmes conditions (concentration de l'inducteur IPTG= 0.5mM température de culture 37°C), en présence de témoins non induits. Les résultats sont représentés ci après.

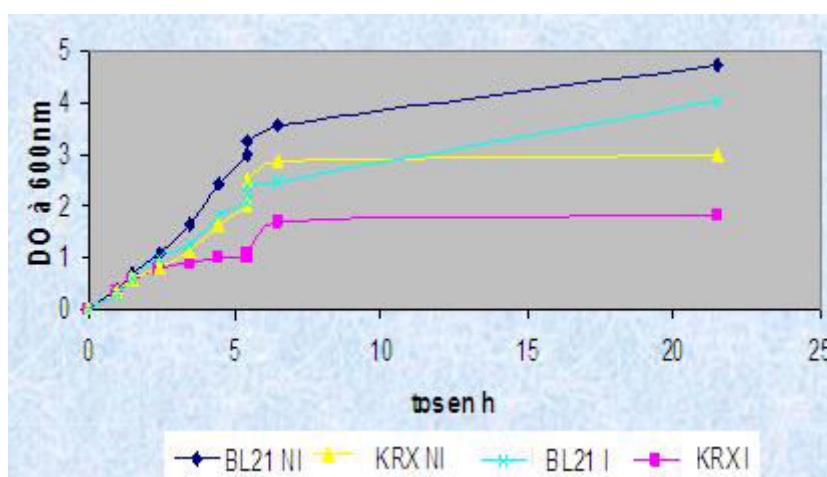


Figure 31: Cinétique de croissance des souches d'expression BL21pLysS et KRX

D'après les courbes représentatives de la cinétique de croissance (figure 31), on peut observer, que toutes ont presque la même allure (une légère phase de latence suivie d'une phase de croissance exponentielle où $\mu = \mu_{max}$).

Les deux souches *E. Coli* BL21 (DE3) pLysS et *E. coli* KRX ont présenté à peu près le même temps de latence que ce soit dans les conditions induites ou non induites. Cependant, nous constatons bien que l'induction affecte les paramètres de croissance des deux souches.

Par ailleurs, quelque soit la souche utilisée (BL21 ou KRX), les bactéries induites présentent toujours une cinétique de croissance moins importante que celles non induites.

D'autre part, dans les conditions induites, *E. Coli* BL21 (DE3) pLysS a présenté une croissance plus intéressante que celle observée pour KRX : la DO finale mesurée chez BL21 est bien plus élevée que celle relevée pour KRX.

IV.2.2 Suivi qualitatif et quantitatif de la production de FNIII9-10

IV.2.2.1 Traçage en temps réel de l'expression et de la purification de FNIII9-10

Au cours de ce travail, nous avons mis en œuvre un procédé de production de protéines recombinantes chez *E. coli*, faisant intervenir plusieurs tags combinant des fonctions complémentaires (10xHis, SBP et cytochrome b5). Dans cette construction, nous avons voulu tester la capacité du cytochrome b5 à fournir une coloration facilement détectable à l'œil nu afin de l'exploiter pour le traçage visuel des étapes de production et de purification du fragment recombinant.

La première utilité du marqueur coloré a été de nous renseigner, en temps réel, sur l'expression de la FNIII9-10 avant toute étape d'analyse. L'apparition d'une couleur rouge (Figure 32) a été directement observable à l'œil nu pendant la phase d'expression et les étapes d'extraction de la protéine taguée ce qui se traduit par une confirmation de la présence de la protéine d'intérêt dans l'extrait protéique. Le culot de la culture induite montre une coloration rouge comparé à celui de la culture non induite (figure 32 a). De plus, des informations préliminaires sur la solubilité de la protéine de fusion peuvent être renseignées avec précision en suivant la coloration des fractions soluble et insoluble récoltées après l'étape d'extraction et ce sans recourir à des étapes fastidieuses conventionnelles comme l'analyse sur gel.

D'autre part, nous avons voulu mettre en évidence l'intérêt de cette technologie dans la détermination du temps de culture optimal en nous basant uniquement sur le suivi de la coloration rouge en fonction du temps de culture après l'induction. Pour cela nous avons réalisé l'extraction des protéines totales solubles à trois temps de culture : 3h, 6h et 16h après induction.

Nous avons remarqué que la couleur rouge des extraits s'intensifie en fonction des différents temps d'incubation testés (figure 32 b). Cette propriété du cytochrome b5 à se colorer en rouge fournit donc une méthode simple et puissante pour un screening accéléré des conditions optimales d'expression.

Enfin, la construction CMAT nous a permis de tracer l'étape de purification en suivant, par le biais de la coloration, la présence de la protéine de fusion. La figure 32 c montre d'une part la présence d'une solution rouge dans la colonne qui se traduit par la fixation de la protéine de fusion, via le tag SBP, à la streptactine immobilisée. Et de l'autre, la fraction non retenue incolore qui est située en bas de la colonne. Ainsi, ce système donne une information précoce quant à la purification de la protéine permettant ainsi d'accélérer les étapes conventionnelles d'analyse et d'optimisation des conditions de purification.

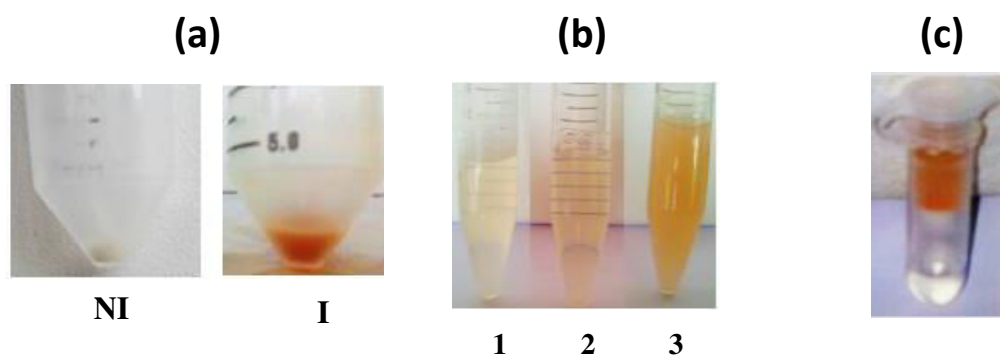


Figure 322: Traçage en temps réel de l'expression et de la purification du fragment FNIII9-10

IV.2.2.2 Rôle de la CMAT dans la caractérisation semi-quantitative

Nous avons démontré précédemment l'intérêt du système de fusion CMAT dans le suivi visuel des différentes étapes d'expression et de purification de la protéine recombinante en temps réel. Nous nous sommes intéressés par la suite à évaluer la capacité de la CMAT à fournir une information quantitative précoce sur la production de la protéine d'intérêt. Pour cela, nous avons prélevé des échantillons provenant des fractions de protéines totales solubles après 3 h, 6h et 16 h de culture (figure 33 a). Ces échantillons ont été analysés sur gel SDS-PAGE afin de comparer la production protéique à ces différents temps de mesure. Nous avons observé que la bande de 42kda correspondant à la protéine de fusion est d'intensité importante par rapport à l'ensemble des bandes correspondant aux protéines totales et ce pour les différents temps (3h, 6h et 16h) (figure 33 b). Ce constat indique donc que la protéine d'intérêt est très exprimée et que le système d'induction a orienté efficacement la machinerie cellulaire vers la production de la protéine hétérologue.

D'autre part, l'intensité de la bande à 42 kDa augmente d'une manière significative en fonction du temps. En comparant les résultats du gel avec les résultats du suivi de la coloration lors de l'expression, nous avons réussi à établir une corrélation entre l'intensité de la coloration rouge des fractions solubles et l'intensité des bandes relatives au dépôt des échantillons de ces mêmes fractions sur le gel d'électrophorèse. En conclusion, la CMAT constitue un outil efficace d'estimation semi-quantitative des protéines produites.

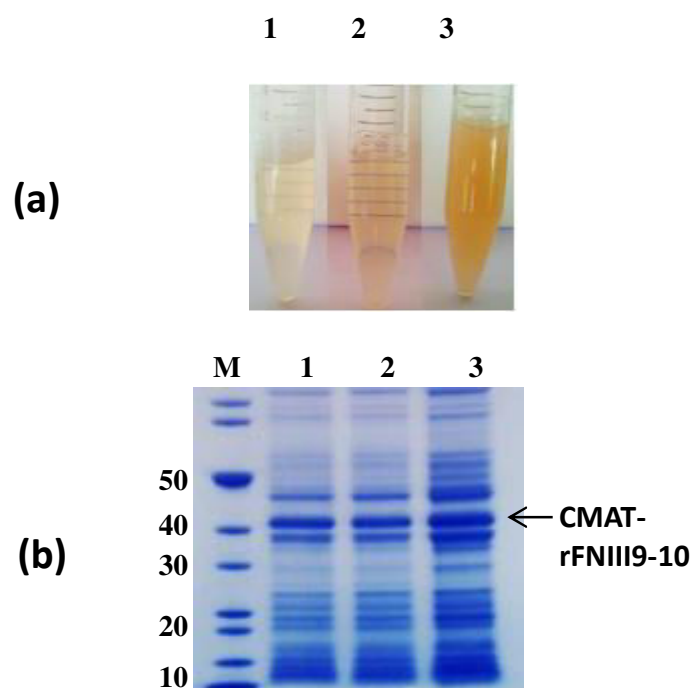


Figure 333: Corrélation entre l'intensité de la coloration des fractions protéiques et de leurs bandes respectives

IV.2.3 Optimisation de l'expression du fragment recombinant FNIII9-10

Dans le but d'optimiser la production du fragment III9-10 de la fibronectine humaine, nous avons cultivé les souches dans diverses conditions en faisant varier les paramètres suivant: la souche de production, la température de culture après l'induction et la concentration en inducteur. Ces paramètres influent à plusieurs niveaux et peuvent affecter la solubilité et le rendement de production. Ainsi, l'effet de la variation de ces paramètres sur le profil d'expression de la protéine recombinante d'intérêt a été étudié et les conditions optimales de production ont été déterminées.

IV.2.3.1 Variation des paramètres de culture

✓ Etude de la variation de la concentration en inducteur

Dans un premier temps, l'effet de la variation de la concentration en inducteur sur l'expression de la FNIII9-10 a été étudié. La figure 34 correspondant à l'analyse de l'expression de la CMAT-FNIII9-10, montre que la majorité de la production protéique s'est faite principalement dans les corps d'inclusion. En effet, les bandes au niveau des fractions insolubles (puits 4, 6, 8 et 10) sont plus intenses que celles correspondant aux fractions solubles (puits 5, 7, 9 et 11).

En variant la concentration en inducteur, nous pouvons constater que pour une concentration de 0.3mM d'IPTG, la bande correspondant à la protéine de fusion au niveau de la fraction soluble (indiquée par une flèche sur la figure 34) est plus intense comparé aux autres conditions (puits 7). Cette différence, même si elle n'est pas très significative, indique que la concentration en inducteur a quand même un effet sur la forme d'expression de la protéine.

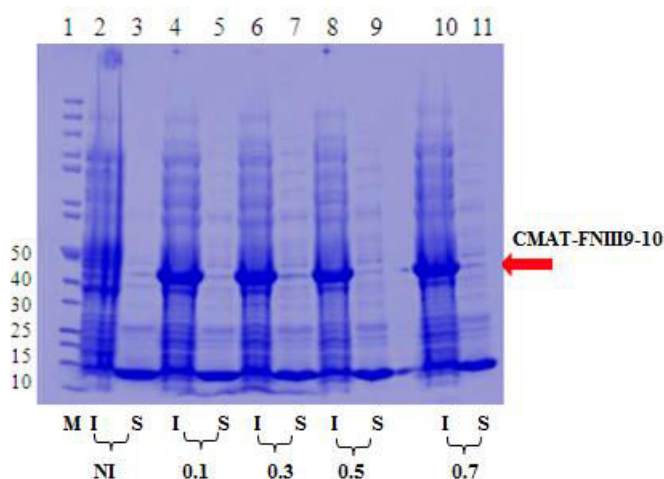


Figure 344: Effet de la variation de la concentration en inducteur sur l'expression de la FNIII9-10

I : fraction insoluble, S : fraction soluble, 1 : marqueur de poids moléculaire, 2 : protéines totales insolubles de la culture non induite, 3 : protéines totales solubles de la culture non induite, 4,6,8 et 10 : protéines totales insolubles de la culture induite à 0.1, 0.3, 0.5 et 0.7 mM d'IPTG respectivement, 5, 7, 9 et 11 : protéines totales solubles de la culture induite à 0.1, 0.3, 0.5 et 0.7 mM d'IPTG respectivement. La flèche indique la taille de la protéine attendue.

Cette étude nous a permis de fixer à 0.3mM la concentration de l'inducteur IPTG permettant l'expression optimale.

✓ Etude de la variation de la souche et de la température après induction

Dans un second temps, plusieurs souches de production ainsi que la température de culture après induction ont été testées, tout en fixant la concentration de l'inducteur à 0.3mM, afin d'en étudier l'effet sur le profil d'expression protéique. La comparaison entre les résultats obtenus pour les différentes conditions est représentée dans la figure 35. Nous constatons que la production du fragment recombinant s'est faite majoritairement sous forme de corps d'inclusion. En effet, tant pour la souche KRX que pour la souche BL21, nous observons la présence d'une bande intense au niveau de 42 kda (taille correspondant à la CMAT-FNIII9-10) située au niveau des puits correspondant aux fractions insolubles. Nous remarquons que, malgré la diminution de la température de culture post-induction, nous n'avons pas réussi à solubiliser la protéine. Toutefois, nous obtenons une bande d'intensité plus marquée à 20°C au niveau de la fraction soluble pour la souche BL21. Ce résultat nous a orienté vers une diminution de la température après induction à 18°C afin d'en étudier l'effet.

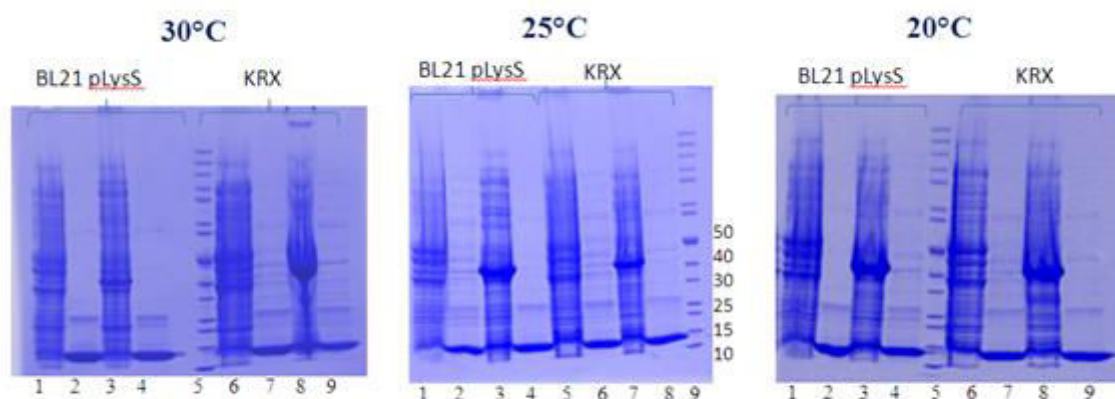


Figure 35: Effet de la variation de la souche et de la température de culture après induction sur l'expression de la FNIII9-10

Pour les cultures à 30°C et 20°C : 1,6 : protéines totales insolubles de la culture non induite, 2,7 : protéines totales solubles de la culture non induite 3,8 : protéines totales insolubles de la culture induite 4, 9 : protéines totales solubles de la culture induite 5 marqueur de poids moléculaire. Pour les cultures à 25°C : 1,5 : protéines totales insolubles de la culture non induite 2,6 : protéines totales solubles de la culture non induite 3,7 : protéines totales insolubles de la culture induite 4,8 : protéines totales solubles de la culture induite, 9 : marqueur de poids moléculaire.

Après avoir baissé la température de culture après induction à 18°C, nous constatons que l'intensité de la bande correspondant à la protéine de fusion contenue dans la fraction insoluble a significativement diminué. Cette diminution de la taille de la bande se traduit par la diminution de l'agrégation des protéines sous forme de corps d'inclusion.

Ce constat est appuyé par l'observation d'une différence d'intensité remarquable entre les bandes correspondant aux fractions purifiées à partir des cultures à 20°C et à 18°C. Nous remarquons en effet, que la diminution de la température de culture après induction a participé à augmenter la quantité de protéines (figure 36).

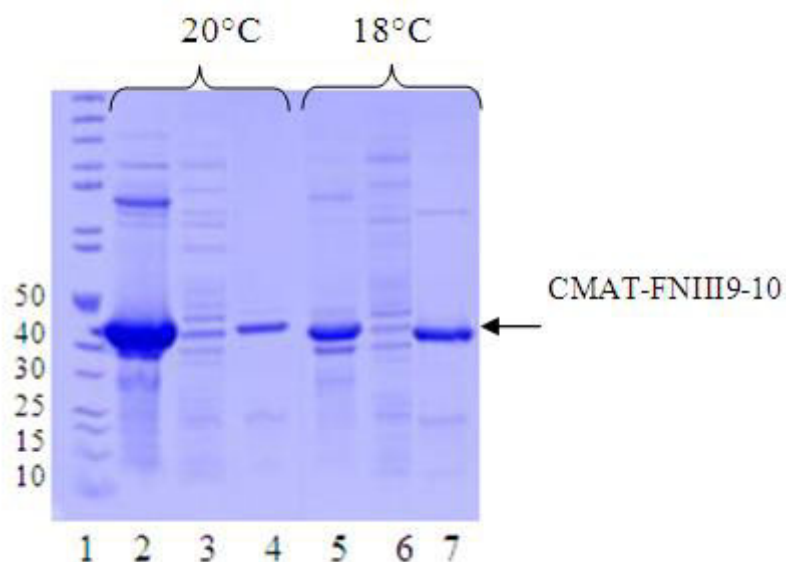


Figure 36: Effet de la température de culture sur la solubilité

1: Marqueur de poids moléculaire, 2 et 5: protéines totales insolubles de la culture induite, 3 et 6: protéines totales solubles de la culture induite, 4 et 7: la fraction purifiée

IV.2.3.2 Solubilisation et renaturation des corps d'inclusion

Au vu des résultats précédents, l'hypothèse que la protéine d'intérêt soit de nature insoluble s'est posée puisque la production s'est faite approximativement à 80% dans la fraction insoluble. Mais le fait de faire passer la température de culture de 20°C à 18°C a permis d'orienter l'expression sous forme soluble. Dans une optique d'optimisation, nous avons cherché à mettre au point un protocole de solubilisation des corps d'inclusion suivi d'une phase de refolding afin d'analyser l'expression et la purification du fragment recombinant et de les comparer aux résultats de l'expression et de la purification sous forme soluble.

L'étape de solubilisation a été réalisée par l'ajout de la Guanidine hydrochloride (G-HCl) à 6 M. En comparant l'intensité de la bande correspondant à la fraction insoluble avant (figure 37 a colonne 2) et après solubilisation (figure 37 b colonne 2) nous remarquons que cette étape a été partielle étant donné que l'intensité de la bande n'a pas diminué. Ce constat implique que les corps d'inclusion sont encore présents.

A la fin de la renaturation, réalisée par une succession d'étapes de dialyse, nous constatons que l'intensité de la bande augmente ce qui prouve que nous arrivons à récupérer une bonne partie de la protéine (figure 37 b colonne 3).

Enfin, nous avons comparé les résultats de la production du fragment recombinant III9-10 de la fibronectine humaine par deux approches différentes. Nous avons constaté qu'après l'étape de purification, la bande correspondant à la fraction purifiée à partir de la phase soluble est nettement plus intense que celle correspondant à la fraction purifiée à partir de la solubilisation des corps d'inclusion (figure 37 colonnes 4a et 4b) le but de cette manipulation étant d'optimiser la production sous forme soluble. Ces résultats ont été confirmés suite à la quantification des fractions purifiées, où nous obtenons à partir de 100mL de culture ~ 300mg de protéines purifiées à partir de l'extrait soluble et ~ 200 mg de protéines purifiées à partir des corps d'inclusion solubilisés et renaturés. En plus d'être complexe et nécessitant beaucoup de temps, le procédé de solubilisation des corps d'inclusion offre un rendement plus faible. **Par conséquent, nous avons opté pour la production de notre protéine de fusion à 18°C avec une concentration de 0,3 mM d'IPTG pour le reste de nos manipulations. Ces conditions garantissent une production optimale de la protéine d'intérêt.**

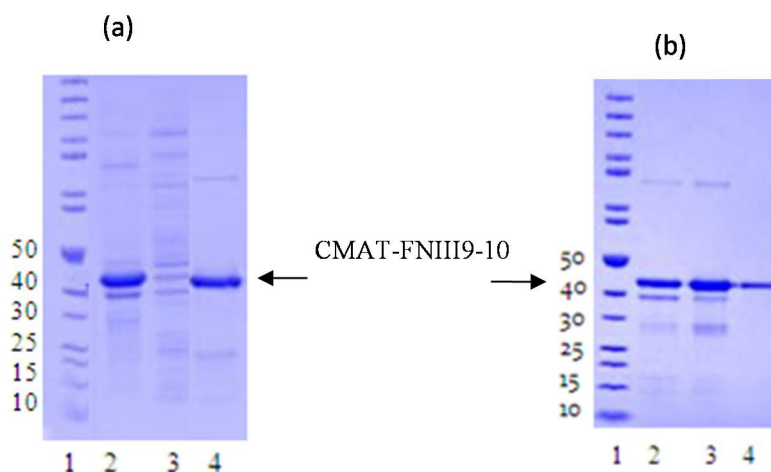


Figure 37: Analyse de l'expression de CMAT-FNIII9-10

(a) Expression à 18°C / 0.3 mM IPTG 1: Marqueur de poids moléculaire, 2: Protéines totales insolubles, 3: protéines totales solubles, 4: protéines purifiées (b) Analyse de la solubilisation et la renaturation de CMAT-FNIII9-10 à 37°C/ 1 mM IPTG 1: Marqueur de poids moléculaire, 2 : culot non solubilisé (restant), 3 culot renaturé, 4 Fraction renaturée et purifiée

IV.2.4 Rôle de la CMAT dans la quantification des protéines

Nous avons défini précédemment qu'une unité d'absorbance (1 UA) du cytochrome est équivalente à 400 mg / l de protéines (Miladi et al., 2013). Afin d'évaluer la capacité du cytochrome b5 à quantifier les protéines recombinantes de fusion, une corrélation entre le signal d'absorption du cytochrome b5 et la quantité de protéines a été établie. Les fractions solubles récupérées à partir du lysat ont été analysées par lecture densitométrique à 400nm pour déterminer la quantité.

Ces mêmes échantillons ont été dosés par une méthode de dosage classique la BCA et les DO des mêmes fractions ont été prises à 562nm aux mêmes points de culture (3h, 6h et 16h de culture après induction). Nous avons constaté, dès 3 heures de culture après induction, une production protéique. En nous basant sur les résultats quantitatifs obtenus à ces deux longueurs d'ondes, nous avons établi une comparaison en termes de quantité des valeurs obtenues. Pour les deux longueurs d'ondes utilisées nous observons des quantités croissantes de protéine en fonction du temps de culture. La lecture à 400nm est spécifique au cytochrome b5.

Ce dernier étant le partenaire de fusion du fragment d'intérêt, par conséquent la lecture de l'absorbance à 400nm nous renseigne d'une manière spécifique sur la quantité de la protéine de fusion. La lecture à 562nm quant à elle, nous indique la quantité des protéines totales (Figure 38).

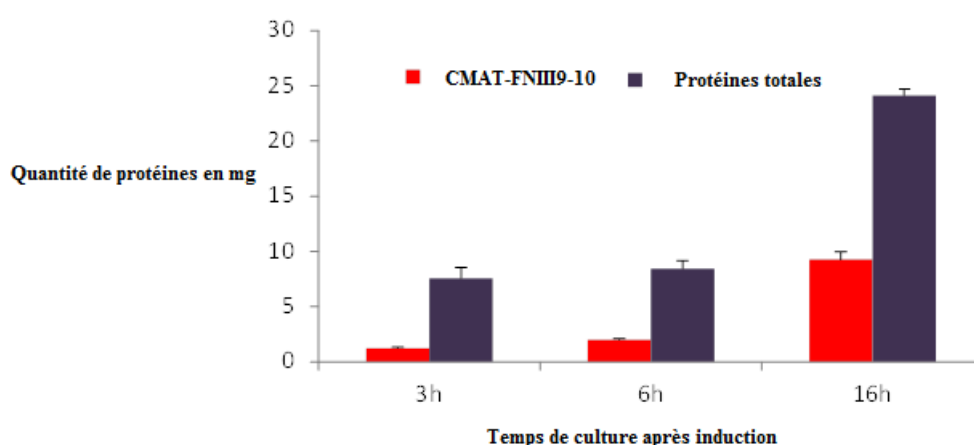


Figure 35: Quantité de CMAT-FNIII9-10 et des protéines totales en fonction du temps

Ainsi, ce système fournit une méthode rapide et spécifique pour quantifier les protéines fusionnées à la CMAT et estimer ainsi la production des protéines d'intérêt parmi les protéines totales à des points précis de la culture.

En effet, à 3h nous remarquons que la protéine d'intérêt représente 16 % de la totalité des protéines bactériennes pour atteindre les 38 % à la fin de la culture (figure 39). Cette quantité est considérable, ce qui implique que le système CMAT garantit une expression importante des protéines hétérologues.

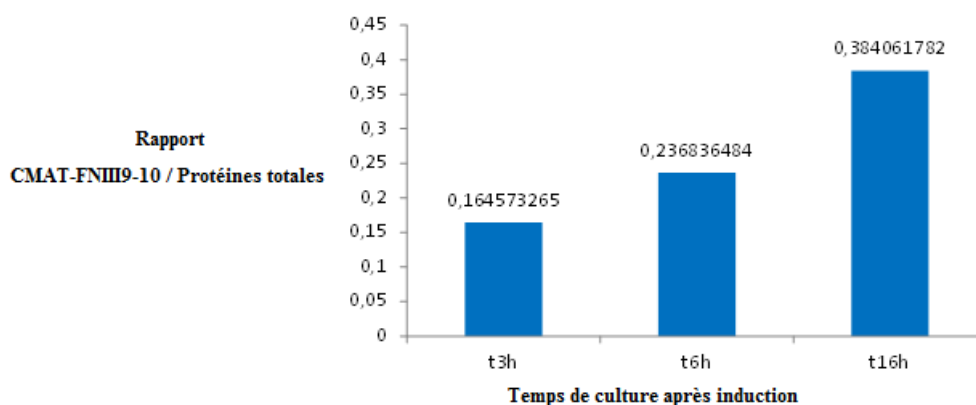


Figure 36: Pourcentage de production de la protéine de fusion par rapport à la totalité des protéines bactériennes

IV.2.5 Double purification de la CMAT-FNIII9-10 par chromatographie d'affinité

En plus du suivi en temps réel de l'expression et de la purification, l'utilisation de la CMAT comme partenaire de fusion, permet de réaliser l'étape de purification par chromatographie d'affinité en utilisant le double tag : 10xHis et SBP et offrant une haute qualité. Le rendement de purification du Multitags a été évaluée par l'analyse SDS-PAGE des fractions éluées de la première purification sur IMAC et celles issues de la double étape de purification sur colonne streptactine.

Le gel SDS-PAGE (figure 40, lignes 6 et 7) a montré des bandes intenses au niveau de 42kDa correspondant au poids moléculaire attendu de la protéine de fusion.

La comparaison de la qualité de purification réalisée via la colonne IMAC (figure 40, piste 6) et celle par la double purification (figure 40, piste 7) a montré la présence de contaminants dans la fraction éluee à partir de la colonne IMAC. En analysant la piste 7, nous remarquons que la deuxième purification ne permet d'obtenir que la bande d'intérêt. Les contaminants ont été éliminés.

L'analyse du gel SDS par le logiciel Image quant TL nous permet de déterminer le degré de pureté de la fraction purifiée. Dans ce cas il est de 98 %. Par conséquent, cette double purification, offre une haute qualité de purification. D'où, l'intérêt de son utilisation complémentaire à la purification sur les billes de Nickel.

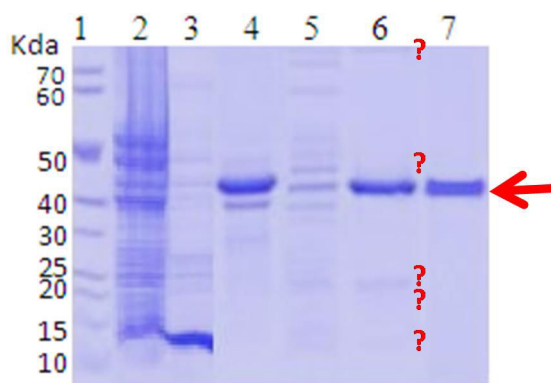


Figure 37: Analyse et comparaison de la qualité de la purification de la CMAT-FNIII9-10

La flèche indique le niveau de la bande correspondant à la protéine de fusion, les points d'interrogation traduisent les bandes contaminantes.

IV.2.6 Validation de la protéine recombinante de fusion

IV.2.6.1 Validation par Western blot

Cette technique analytique a été utilisée afin de détecter et d'identifier spécifiquement le fragment recombinant CMAT-FNIII9-10 à partir de la fraction purifiée de l'extrait des protéines totales produites chez E.Coli. Les résultats obtenus sont visualisés ci-dessous :

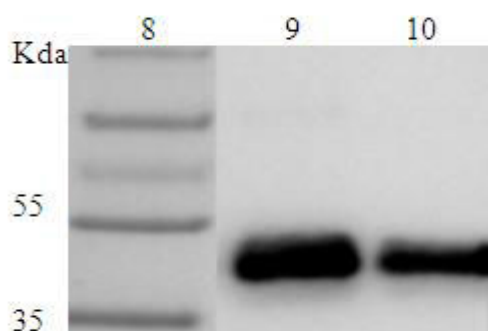


Figure 38: Validation de l'expression de la CMAT-FNIII9-10 par western blot

Le gel ci-dessus montre des bandes localisées au niveau de 42kda, taille attendue de la protéine de fusion. Cette révélation traduit en fait la fixation spécifique du substrat (TMB : tetramethylbenzidine) qu'on a ajouté à la peroxydase couplée à la streptavidine. La streptavidine ayant de l'affinité pour le SBP va s'y fixer.

Aucune autre bande supplémentaire n'est détectée sur toute la partie restante du gel, ce qui démontre que la bande visualisée correspond bien à la protéine de fusion.

IV.2.6.2 Validation par spectrométrie de masse

Nous avons voulu vérifier que les séquences peptidiques courtes RGD et PHSRN, impliquées dans l'adhésion cellulaire, sont présentes dans le fragment recombinant (rFNIII9-10) par spectrométrie de masse. A cet effet, la bande de 42 kDa correspondant à la protéine de fusion CMAT-rFNIII9-10 a été d'abord séparée par SDS-PAGE (Figure 42) ensuite excisée pour être analysée par MALDI-TOF / TOF suivant le protocole décrit dans la section « Matériel et méthodes ».

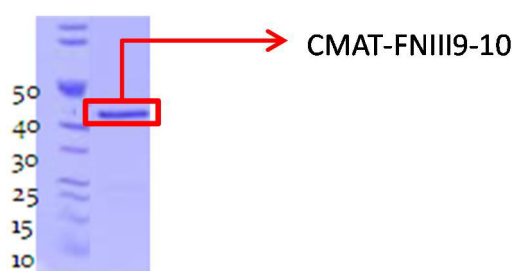


Figure 39: Séparation et isolement de la bande à analyser

La protéine de fusion contient plusieurs séquences peptidiques codant le cytochrome b5, le SBP tag, le His tag..., l'identification MS / MS est donc nécessaire afin d'identifier les peptides recherchés à partir du fragment recombinant de la FN détecté sur le spectre MS. Toutes les masses correspondant aux peptides générés suite à la coupure théorique du fragment recombinant avec de la trypsine ont été marquées sur le spectre de MS en utilisant le logiciel Peptide Mass (<http://www.expasy.org>).

Les masses des peptides correspondant aux séquences contenant le tri-peptide RGD (1591,8 et 2470,3 m / z) et la séquence PHSRN (995,5 et 2532,3 m / z) ont été détectées sur le spectre de MS (figure 43 a). Les peptides marqués (9 pics) sont représentés dans la séquence de la FN (figure 43 b).

(a)

```
1 MLRGPGLG LLA VQCLGTA VPSTGASKSK RQAQQMVQPQ SPVAVSQSKP
51 GCYDNGKHYQ INQWERTYL GNA LVCTCYG GSRGFNCESK PEAEETCFDK
(---)
1251 KDDKESVPIS DTIIPAVPPP TDLRFTNIGP DTMRTWAPP PSIDL TNFLV
1301 RYSPVKNEED VAE LSISPSD NAVVL TNLLP GTEYVVS VSS VYE QHESTPL
1351 RGRQKTGLDS PTGIDFSDIT ANSFTVHWIA PRATITGYRI RHHPEHFSGR
1401 PREDRVPHSR NSITLTNLTP GTEYVVSIVA LNGREESPLL IGQQSTVSDV
1451 PRDLEVVAAT PTSLLISWDA PAVTVRYRYI TYGETGGNSP VQEFTVPGSK
1501 STATISGLKP GVDYTITVYA VTGRGDSPAS SKPISINYRT EIDKPSQMQV
1551 TDVQDNSISV KWLPS SSPVT GYRVTTTPKN GPGPTKTATA GPDQTEMTIE
1601 GLQPTVEYVV SVYAQNPSGE SQPLVQTAVT NIDRPKGLAF TDVDVDSIKI
(---)
2301 TYHVGEQWQK EYLGAICSCT CFGGQRGWRC DNCRRPGGEP SPEGTTGQSY
2351 NQYSQRYHQR TNTNVNCP IE CFMPLDVQAD REDSRE
```

(b)

Sequence position	Detected masses [M+H] ⁺	Predicted sequence
1390 – 1402	1625.8243	R. IRHHPEHFSGRPR. E
1392 – 1402	1356.6409	R. HHPEHFSGRPR. E
1403 – 1410	995.4742	R. EDRVPHSR. N
1411 – 1434	2532.3241	R. NSITLTNLTPGTEYVVSIVALNGR. E
1435 – 1452	1954.9716	R. EESPLLIGQQSTVSDVPR. D
1453 – 1476	2524.3271	R. DLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVR. Y
1480 – 1500	2168.0121	R. ITYGETGGNSPVQEFTVPGSK. S
1501 – 1524	2470.2777	K. STATISGLKPGVDYTITVYAVTGR. G
1525 – 1539	1591.7643	R. GDSPASSKPISINYR. T

Dans

le

but

Figure 40: Résultat de la spectrométrie de masse réalisée sur la protéine de fusion CMAT-FNIII9-10

d'identifier ces peptides, les pics d'intérêt ont été soumis à une fragmentation MS / MS. Trois d'entre eux ont été identifiés sans ambiguïté. Comme indiqué dans le tableau XX, les résultats MS / MS confirment par conséquent la présence des séquences d'intérêt (RGD et PHSRN) dans la protéine de fusion (CMAT-rFNIII9-10).

Tableau XX: Résultat de l'identification MS/MS

Fragmented masse	Identified Sequence	Protein identification	Mascot score
995,47 m/z	EDRVPHSR	Human fibronectin	43
2532,32 m/z	No matching	No identification	
2470,27 m/z	STATISGLKPGVDYTITVYAVTGR	Human fibronectin	57
1591,76 m/z	GDSPASSKPISINYR	Human fibronectin	59

IV.2.7 Suivi de l'adsorption de la CMAT-FNIII9-10 sur du plastique

En plus de fournir un système simple et efficace de suivi en temps réel de l'expression et de la purification des protéines d'intérêt, la technologie de fusion avec le multi tags CMAT offre une nouvelle méthode rapide pour le suivi de l'adsorption des protéines à la surface de supports, grâce au marqueur coloré le cytochrome b5. En effet, ce dernier, en présence d'acide δ -aminolévulinique se colore en rouge, visible à l'œil nu.

Des extraits bactériens de cultures induites avec l'acide δ -aminolévulinique ont été placés dans des puits d'une plaque en polystyrène. En absence de la protéine rFN, l'extrait bactérien reste non coloré (jaune) (figure 44, puits 1). Cependant, après l'ajout de la solution de CMAT-rFNIII9-10 aux extraits bactériens, nous avons remarqué l'apparition d'une coloration rouge (figure 44, puits 2 et 3).

De plus, une augmentation des intensités de la coloration est perceptible en fonction des quantités croissantes de CMAT-rFN ajoutées dans les puits (figure 44, puits 2 et 3). Ainsi, des informations qualitatives sur la présence du fragment recombinant ont été obtenues de manière simple et rapide grâce à ce traceur.

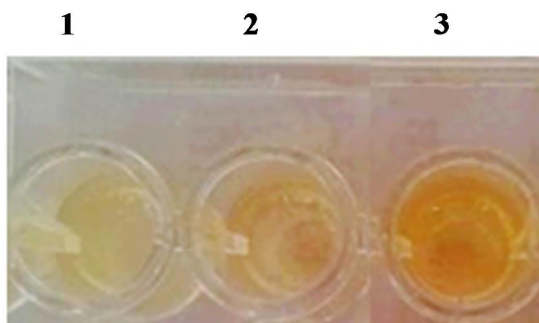


Figure 41: Suivi de l'adsorption

D'autre part, le développement de ce système nous a permis également d'évaluer quantitativement les protéines adsorbées (tableau XXI), en nous basant sur la corrélation établie entre le signal d'absorbance du cytochrome b5 à 400nm et la quantité de protéine calculée que nous avons défini précédemment une unité d'absorbance (UA 1) du cytochrome est équivalente à 400 mg / l de protéines (Miladi et al., 2013). Ainsi, l'évaluation de l'adsorption protéique à la surface des matériaux devient beaucoup plus simple en comparaison aux méthodes classiques de quantification de l'adsorption.

Tableau XXI: Quantification de l'adsorption de la CMAT-FNIII9-10

	Absorbance à 562nm		Absorbance à 400nm	
	2	3	2	3
Fraction protéique				
Protéines totales dans la solution de coating	16 µg	34 µg	11 µg	18 µg
Protéines totales dans le surnagent après le coating	4,8 µg	11 µg	4,71 µg	11 µg
Protéines totales coatées	6,12 µg	13 µg	4,29 µg	7 µg
Protéines totales dans l'extrait bactérien	13 µg		0.04 µg	

La quantité des protéines adsorbées à la surface des plaques de polystyrène a été comparée à la quantité des mêmes échantillons déterminée par le dosage BCA. Nous avons constaté une différence de valeurs (tableau 20) qui s'explique par le fait que la méthode colorimétrique est plus spécifique et renseigne que sur la quantité des protéines de fusion ; contrairement à la BCA qui mesure les protéines totales. Nous avons trouvé qu'environ 40% des protéines ont été adsorbées à la surface de polystyrène.

IV.3 Evaluation de l'activité biologique du fragment recombinant et élaboration d'un échafaudage adhésif

IV.3.1 Evaluation de l'activité biologique de CMAT-rFN sur le plastic

L'activité biologique du fragment recombinant a été testée en évaluant son effet sur l'adhésion initiale de cellules souches mésenchymateuses (MSC). En effet, ces cellules exposent à leurs surfaces les récepteurs des intégrines reconnus par le site de fixation cellulaire RGD.

Au cours de cette expérience, des concentrations croissantes d'une solution de fibronectine recombinante ont été adsorbées à la surface d'une plaque de culture cellulaire afin d'étudier

l'attachement des cellules et de déterminer la concentration seuil nécessaire pour une adhésion optimale.

La figure 45 a, montre qu'au bout de 30 minutes d'incubation à 37 ° C, le fragment recombinant adsorbé à la surface du polystyrène présente une capacité à fixer les MSC. Par conséquent, ce résultat confirme, que la protéine recombinante de fusion a subit correctement son repliement et a donc conservé son activité biologique, ce qui valide l'activité du fragment recombinant.

D'autre part, nous remarquons que le comportement bioadhésif du fragment recombinant vis-à-vis des MSCs n'est pas le même pour les différentes concentrations de rFN utilisées pour le coating. Une différence dans le nombre de cellules adhérentes est remarquable. Lorsque le fragment recombinant est adsorbé à une concentration de 100 nM, l'adhésion cellulaire a été inférieure à celle observée dans les puits coatés avec 200 nM et 400 nM de la même solution. Ceci implique que le nombre de cellules adhérentes augmente en fonction de la concentration de la solution d'adsorption. Il existe donc une relation entre le comportement cellulaire et la concentration de la rFN adsorbée à la surface du support. En outre, lorsque la concentration de coating est de 400nM, nous remarquons que la réponse cellulaire était identique que celle observée pour les puits coatés avec 200 nM, signifiant que la concentration de saturation a été atteinte. Ainsi, la concentration d'adsorption seuil garantissant un attachement cellulaire optimal a été déterminée elle est de 200 nM. De plus, nous avons constaté que le comportement cellulaire vis-à-vis des puits coatés avec la rFN est similaire à celui observé pour la surface de polystyrène traitée pour garantir une adhésion cellulaire maximale. Ce qui implique que le fragment recombinant améliore l'activité adhésive cellulaire.

Dans un second temps, afin d'étudier la spécificité et l'efficacité du fragment recombinant à fixer les MSCs, la bioactivité de la CMAT-FNIII9-10 a été comparée à celle de la fibronectine commerciale du plasma pFN. La figure 45 b montre que l'adhésion cellulaire en présence du fragment recombinant est légèrement inférieure à celle observée en présence de la fibronectine totale. Ces résultats démontrent donc que le fragment recombinant supporte l'adhésion des MSCs ainsi, notre stratégie a permis une élaboration efficace d'un fragment capable de mimer l'activité de la fibronectine entière pour l'attachement cellulaire.

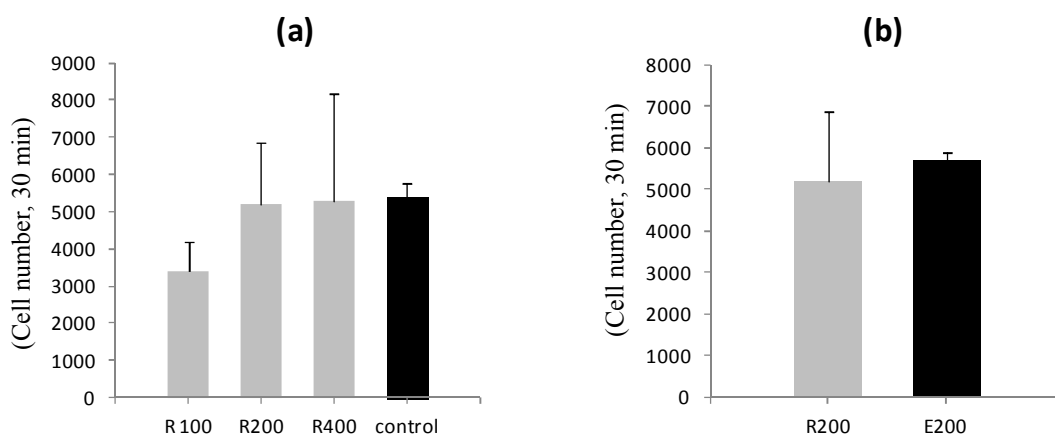


Figure 42: Nombre de cellules adhérant aux supports plastiques revêtus de rFN et de pFN après 30 minutes d'incubation à 37°C en absence de sérum.

(a) Effet des concentrations croissantes de solution d'adsorption CMAT-RFN sur l'adhésion cellulaire. R100, R200, R400 correspondent respectivement à 100 nM, 200 nM et 400 nM. Contrôle: polystyrène traité. (b) le rFN présente une comparaison de l'activité biologique du fragment recombinant à la fibronectine du plasma pFN. E200 correspond à 200 nm de la solution d'adsorption de la pFN.

En conclusion, après avoir validé l'activité biologique du fragment recombinant adsorbé d'une manière non spécifique à la surface d'une surface de polystyrène et après avoir démontré son efficacité à garantir des réponses d'adhésion cellulaire équivalentes à celle observées en présence de la fibronectine entière, nous avons souhaité orienter l'immobilisation de notre fragment à la surface des disques de polycaprolactone afin d'en étudier la réponse.

IV.3.2 Elaboration et caractérisation des disques de PCL

Après la production du domaine FNIII9-10, nous avons validé avec succès son activité biologique sur un support plastique dans le but les utiliser pour la fonctionnalisation de la surface des disques de PCL.

IV.3.2.1 Préparation des disques de PCL

Les films de PCL ont été élaborés comme décrit dans la section « matériels et méthodes » en se basant sur le principe du spin-coating d'une solution de PCL dissoute dans du dichlorométhane.

Grâce à ce procédé, la solution est étalée pendant 30 secondes à une vitesse de 1500 tours.min⁻¹ de manière à obtenir un film réparti de façon homogène à la surface d'une boîte de pétri en verre Steriplan et d'une épaisseur d'environ 45 µm (figure 46).

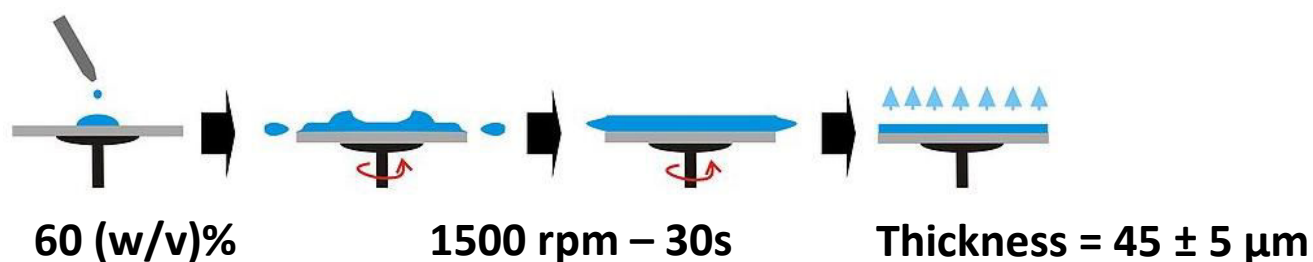


Figure 43: Principales étapes de l'élaboration de film de PCL par spin-coating

Après évaporation du solvant, les films de PCL obtenus sont alors détachés de la surface de la boîte de pétri pour être découpés en disques de diamètres plus petits et variables selon l'application souhaitée. Les disques de PCL obtenus, après découpage, sont présentés sur la figure 47.



Figure 44: Disques de PCL découpés à partir du film de PCL

Nous constatons que certains disques de PCL présentent quelques défauts : trous, déchirures, irrégularités, formes non circulaires... Ceci est dû au procédé de fabrication ou à la technique de découpage. Seuls les disques conformes (forme circulaire de 1,5 cm, surface régulière) ont été conservés pour les études de fonctionnalisation de surface.

IV.3.2.2 Caractérisation des disques de PCL synthétisés

➤ Caractérisation morphologique de la surface des disques

Dans le but de caractériser la surface des disques de PCL, nous avons réalisé une observation au microscope électronique à balayage de ces derniers. Le résultat de cette observation a révélé que la PCL qui est un polymère semi-cristallin, présente une structure hautement organisée. En effet, les chaînes macromoléculaires sont repliées sur elles-mêmes et empilées formant des lamelles cristallines qui sont arrangées de manière radiale autour du centre de nucléation et sont

séparées entre elles par des zones amorphes (où les chaînes ne sont pas organisées). Ces structures peuvent varier dans la forme et la dimension suivant les conditions de recristallisation. Sur le cliché MEB, ces structures sont mises en évidence (figure 48).

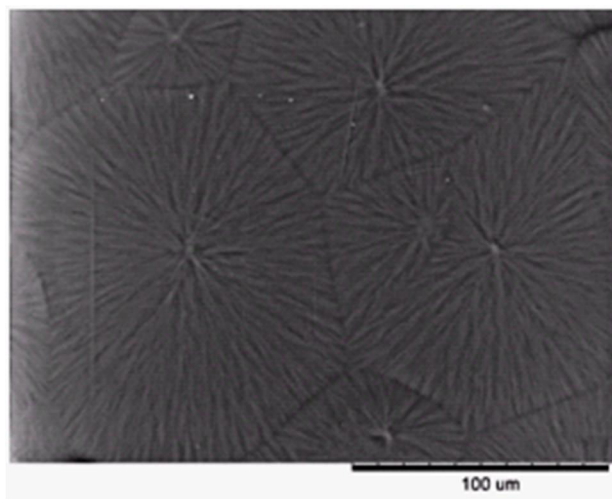


Figure 45: MEB environnemental (en absence de coating) d'un disque de PCL

➤ Analyse élémentaire par EXD

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la détermination de la composition élémentaire de la surface des disques de PCL par cartographie obtenue par EDX montrant la répartition du carbone et de l'oxygène au niveau du film élaboré.

L'analyse EXD a été couplée à la microscopie électronique à balayage afin d'étudier la distribution latérale de ces éléments issus de la surface numérisée sous forme d'image.

La moyenne de l'analyse élémentaire a été réalisée sur 5 films de PCL. Nous remarquons que la distribution du carbone et de l'oxygène est homogène comme attendu (figure 49).

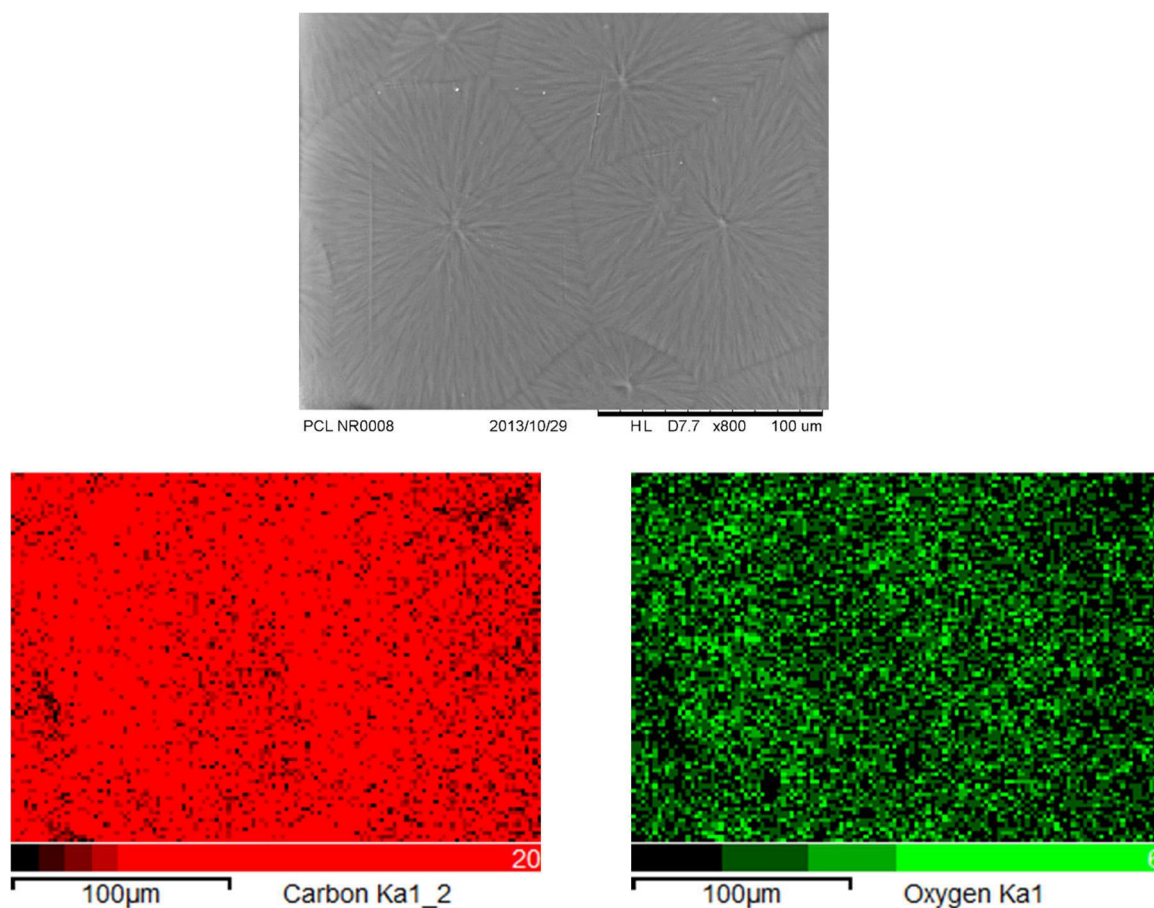


Figure 46: Cartographie obtenue par EDX montrant la répartition les atomes C et O

Enfin, nos résultats déduits par EDX ont été comparés à la distribution théorique de ces deux éléments à la surface de la PCL. Les valeurs obtenues par EDX coïncident d'une manière identique (Tableau XXII).

Tableau XXII: Pourcentages massiques théoriques et expérimentaux

Echantillons	Pourcentage massique des atomes	
	%C	%O
PCL théorique	69,2	30,8
Film PCL (EDX)	$69,6 \pm 0,3$	$30,1 \pm 0,3$

➤ **Propriétés physicochimiques des disques de PCL**

La synthèse des polymères comme la PCL aboutit à une distribution de chaînes de longueurs différentes. De ce fait, on ne peut pas parler d'une masse molaire unique mais de masses molaires moyennes. Pour définir totalement un échantillon polymère, il faut connaître deux masses molaires moyennes : la masse molaire moyenne en nombre M_n et la masse molaire moyenne en poids M_w . L'indice de polymolécularité est calculé par le rapport M_w / M_n . Il caractérise la dispersion de la masse molaire du polymère. La détermination des propriétés thermiques de la PCL est nécessaire pour le contrôle de l'élaboration et des caractéristiques mécaniques et de dégradabilité du matériau. Ci-après le tableau XXIII qui résume les principales caractéristiques de la PCL.

Tableau XXIII: Caractéristiques massiques et thermiques de la PCL

Caractéristique	Valeur
Masse molaire moyenne en nombre	$M_n = 25\,400 \text{ g.mol}^{-1}$
Masse molaire moyenne en poids	$M_w = 40\,600 \text{ g.mol}^{-1}$
Indice de polymolécularité	$PDI = 1.6$
Température de transition vitreuse	$T_g = -63 \pm 1^\circ\text{C}$
Température de fusion	$T_m = 61 \pm 1^\circ\text{C}$
Taux de cristallinité	$X_c = 52\%$
Angle de contact avec eau	$\theta = 74 \pm 3^\circ$

IV.3.3 Etude de la réponse cellulaire des CSM humaines au contact d'un film de PCL bioactivé par le fragment recombinant

IV.3.3.1 Etude de l'effet de la BSA et du sérum de vœu fœtal sur la spécificité de l'adhésion cellulaire

Dans le but de vérifier la spécificité de la propriété adhésive de notre support, nous avons tout d'abord, voulu étudier l'effet du sérum de vœu fœtal et de l'albumine de sérum bovin (BSA) sur l'adhésion des MSC. Pour ce fait, nous avons réalisé le test d'adhésion cellulaire sur les disques de PCL en présence et en absence de ces derniers.

Après 3h d'incubation à 37°C, nous avons procédé au comptage cellulaire et nous avons observé une différence du comportement cellulaire pour les différentes conditions d'adsorption.

Tout d'abord, nous avons remarqué que l'adhérence cellulaire sur les films de PCL en absence de BSA (PCL no block) est plus importante en présence de sérum (serum free/ with serum) (figure 50).

Dans un second temps, pour les expériences d'adhésion cellulaire réalisées en présence et en absence de la BSA, nous avons remarqué que le nombre de cellules adhérentes diminue lorsqu'on bloque avec la BSA. Ces résultats démontrent que les sites n'ayant pas été bloqués par la BSA en présence de sérum montrent un nombre de cellule plus élevé que les autres conditions. Alors que les sites bloqués par la BSA en absence de sérum présentent le niveau d'adhésion le plus faible comparé à toutes les conditions. Par conséquent ces deux paramètres influent d'une manière significative sur le comportement cellulaire et l'effet de la BSA en absence de sérum a été le plus prononcé. Pour le reste de nos manipulations, nous avons opéré en absence de sérum et en bloquant les surfaces avec la BSA une fois l'adsorption par la solution de fibronectine a été réalisée.

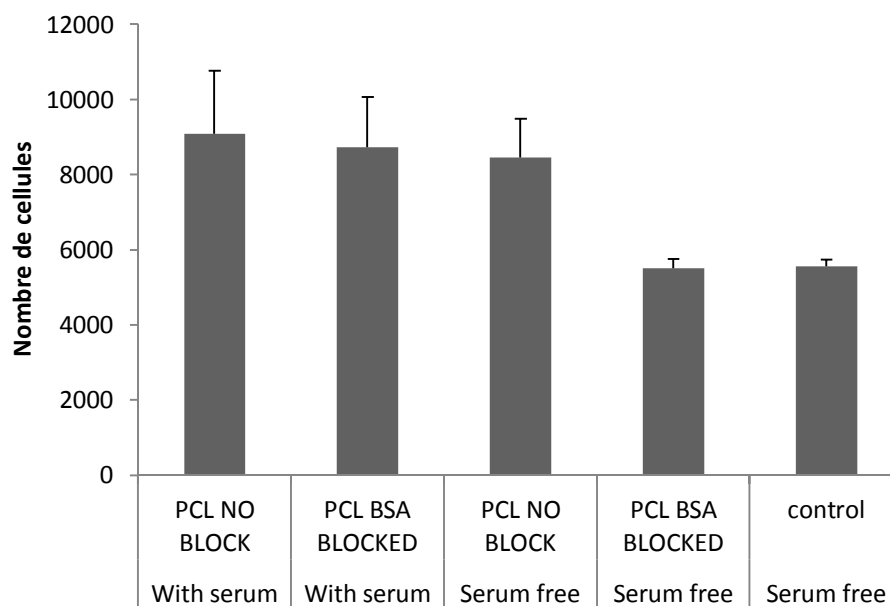


Figure 47: Effet de la BSA et du sérum sur l'adhésion des MSCs sur les films de PCL

IV.3.3.2 Construction de l'échafaudage adhésif

La stratégie de l'immobilisation orientée vise à étudier l'effet de l'adsorption spécifique sur l'adhésion cellulaire. Elle consiste en l'immobilisation du fragment recombinant au niveau de son extrémité N-terminal via le tag SBP sur une couche de streptavidine, pour laquelle il présente une forte affinité. La streptavidine a été préalablement adsorbée sur les films de PCL prédisposés dans une plaque pour culture cellulaire de 24 puits. Cette structure favoriserait à priori l'exposition du tripeptide RGD à la surface de notre support afin de fixer spécifiquement les récepteurs cellulaires. Pour ce fait, nous avons réalisé notre construction comme indiqué dans la figure 51.

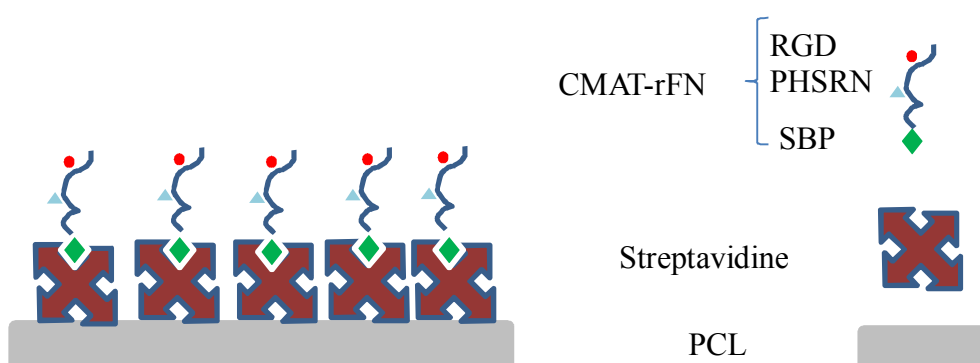


Figure 48: Schéma représentant la déposition de la couche de streptavidine et du fragment CMAT-rFN à la surface de la PCL

IV.3.3.3 Adhésion cellulaire sur l'échafaudage adhésif

Pour cette expérience, les cellules MSCs ont été étalées à la surface des disques de PCL pré disposés dans des plaques de culture de 24 puits dans différentes conditions : PCL seule, PCL + streptavidine, PCL +solution de fibronectine recombinante de fusion, PCL +solution de fibronectine commerciale, PCL+ streptavidine +solution de fibronectine recombinante de fusion , PCL + streptavidine +solution de fibronectine commerciale.

Après 3 heures d'incubation à 37°C, nous avons procédé au comptage cellulaire. Nous avons collecté les fractions issues du surnagent de la solution de coating pour chaque condition, que nous avons mesurées au Coulter.

Cette expérience a été réalisée d'une part, afin de caractériser le comportement cellulaire en réponse aux différentes constructions ci-dessous et de fournir un renseignement sur la construction offrant le meilleur pouvoir adhésif et de l'autre dans le but d'étudier l'effet de l'immobilisation orientée du fragment recombinant sur la réponse d'adhésion cellulaire. Les résultats présentés dans la figure 52 traduisent le nombre de cellules non adhérentes.

D'une manière générale, nous pouvons constater que toutes les surfaces permettent l'adhésion cellulaire avec une différence dans les réponses cellulaires en fonction du support. Dans un premier temps, nous remarquons que la PCL seule représente le nombre de cellules non adhérentes le plus élevé et offre par conséquent le support le moins adhésif. Nous remarquons que le coating de la PCL avec une couche de streptavidine a contribué légèrement à la diminution de la valeur des cellules non adhérentes. Ce ci suggérerait que la streptavidine aurait un effet adhésif par rapport aux cellules souches mésenchymateuses.

D'autre part, lorsque nous avons adsorbé séparément les solutions de fibronectine (commerciale et recombinante) à la surface de la PCL, nous avons constaté une diminution au niveau du nombre de cellules non adhérentes comparé à la PCL seule et celle coatée avec la streptavidine. Par ailleurs, les supports adsorbés par le fragment recombinant de fusion ont montré une réponse cellulaire équivalente à ceux coatés par la fibronectine totale commerciale. Ainsi, nous pouvons suggérer que la fonctionnalisation de la PCL par le biais de la fibronectine contribue à améliorer ses capacités adhésives pour les cellules.

Dans un second temps, nous avons voulu étudier l'effet de l'orientation de l'immobilisation du fragment recombinant FNIII9-10 fusionné à la CMAT sur l'adhésion cellulaire.

Les résultats montrent que le nombre de cellules non adhérentes est le plus faible pour l'échafaudage que nous avons construit à partir d'un disque de PCL pré-coaté de streptavidine et sur lequel nous avons immobilisé le fragment FNIII9-10 grâce à l'affinité de son partenaire de fusion SBP à la streptavidine. Ce qui implique que ce support assure le moins de perte cellulaire comparé aux autres supports.

Enfin, nous remarquons qu'avec ce support fonctionnalisé avec un fragment recombinant de fibronectine, nous sommes parvenus à obtenir une réponse d'adhésion cellulaire légèrement meilleure que celle observée sur la surface modifiée avec la fibronectine entière commerciale. Ainsi, on pourrait déduire que la fonctionnalisation de la surface de notre biomatériau via une immobilisation orientée du fragment FNIII9-10 a contribué efficacement à améliorer l'adhésion cellulaire.

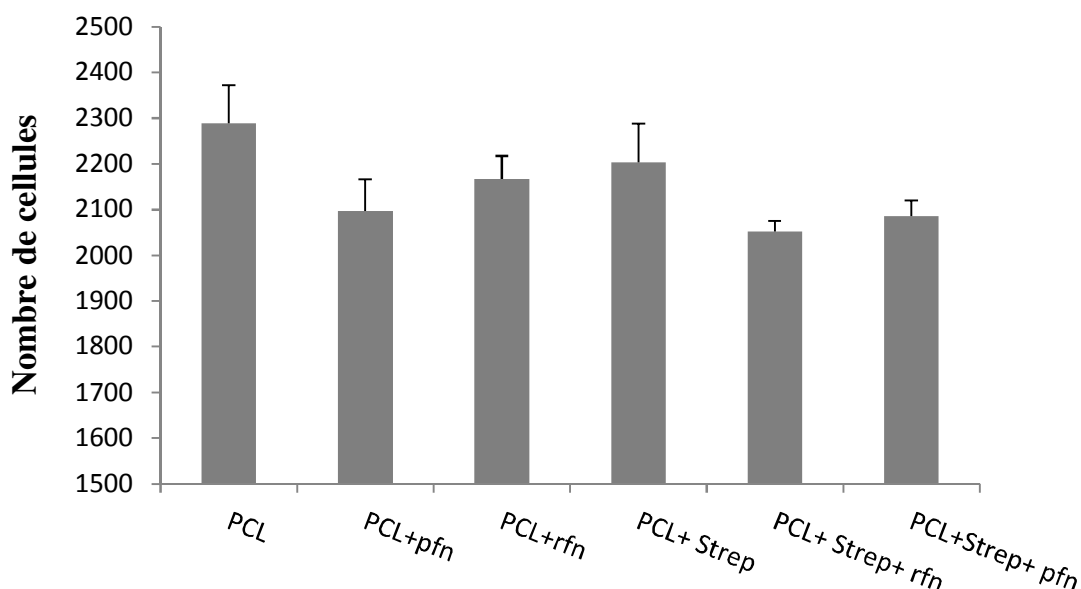


Figure 49: Nombre de cellules non adhérentes sur les différents supports après 3heures d'incubation à 37°C

IV.3.3.4 Observation en Microscopie Electronique à Balayage

Après avoir déterminé la surface garantissant le meilleur pouvoir adhésif et offrant le moins de perte cellulaire, nous avons souhaité procéder à l'observation des cellules adhérentes sur le biomatériau directement par microscopie électronique à balayage.

Cette technique nous permet d'une part la visualisation de la colonisation de la surface du échafaudage par les cellules et de l'autre d'étudier l'étalement cellulaire.

Ce qui nous offre des images claires renseignant à la fois sur la densité mais aussi sur la morphologie des cellules. Les résultats sont montrés sur la figure 53.

D'une manière générale, nous remarquons que les cellules se sont attachées sur les différentes surfaces. Par ailleurs, nous pouvons constater que la densité de la distribution cellulaire n'est pas identique pour les différents supports utilisés. En effet, l'observation de la MEB de la PCL coatée par de la fibronectine entière montre une surface presque totalement tapissée de cellules alors que les densités cellulaires sont moins importantes pour le cas des supports de la PCL seule et la PCL coatée par la solution de fibronectine recombinante. Nous remarquons également la présence de tâches noires sur les photos MEB, celles-ci correspondent aux pores présents dans les disques de PCL.

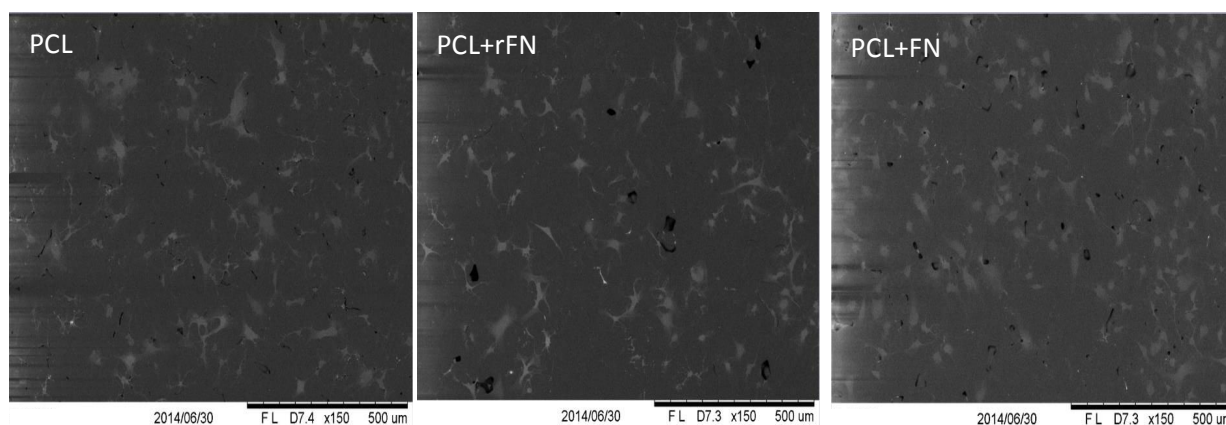


Figure 50: Observations au microscope électronique à balayage de l'adhésion cellulaire des hMSC sur les supports de PCL coatés ou non de fibronectine recombinante et du plasma

Dans un second temps, nous avons voulu étudier l'effet de l'immobilisation orientée sur l'adhésion cellulaire des cellules souches mésenchymateuses. Nous constatons que la PCL seule présente une faible densité cellulaire comparé aux deux autres supports où le nombre de cellules. De plus, les cellules y sont étalées de manière sporadique (figure 54).

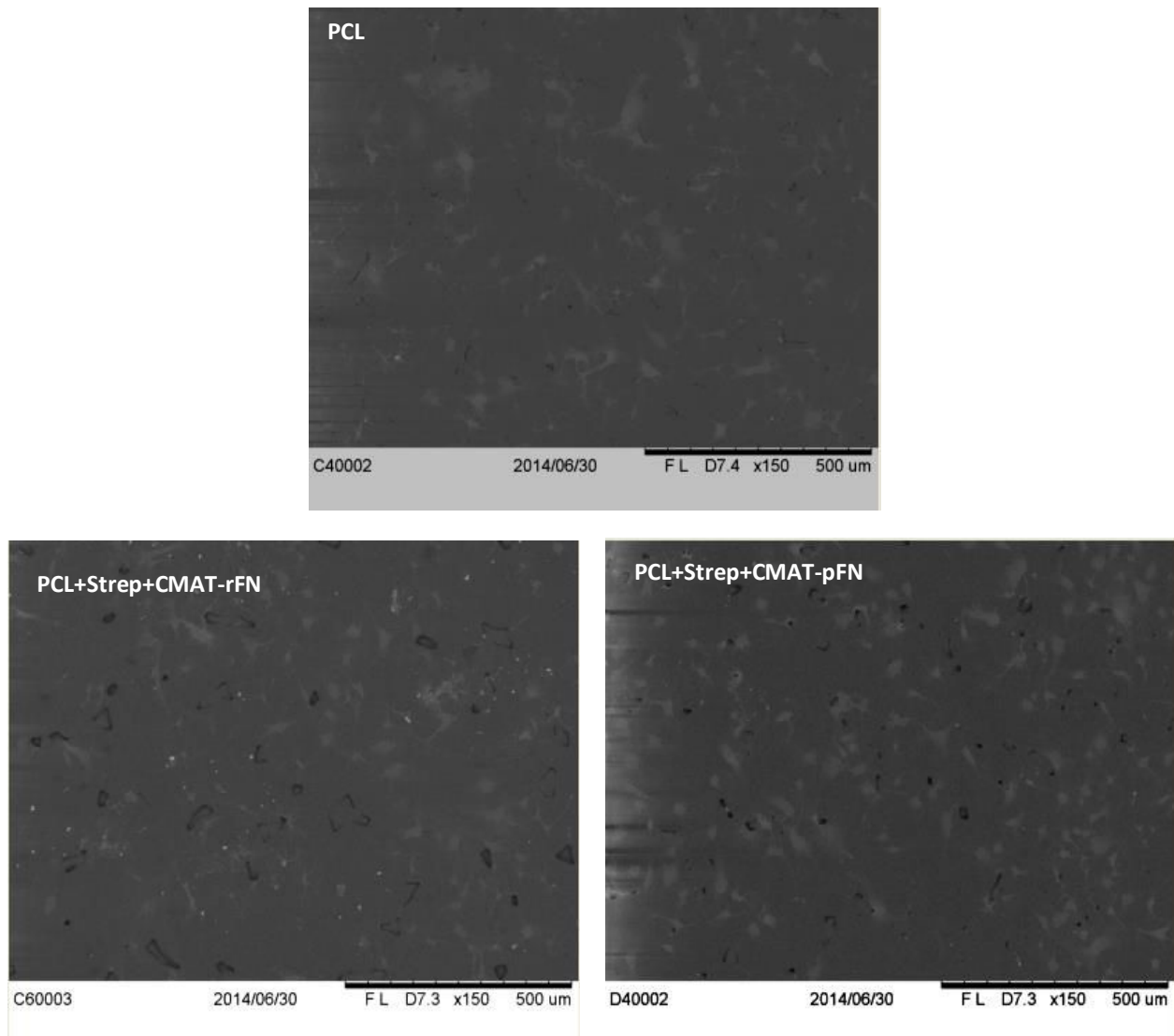


Figure 51: Observations au microscope électronique à balayage de l'adhésion cellulaire des hMSC sur les supports de PCL fonctionnalisés et non fonctionnalisés

Les observations au MEB indiquent que malgré que les cellules adhérentes soient moins nombreuses à la surface coatée par le fragment CMAT-FNIII9-10, celles-ci sont étalées de manière plus performante que sur la surface coatée par la fibronectine totale. En effet, sur la figure 55 (a) nous remarquons la présence de formes cellulaires rondes alors que sur la figure 55 (b) les cellules se présentent sous une forme de losange. Ce constat nous amène à suggérer que le échafaudage que nous avons construit par le biais de l'immobilisation orientée du fragment CMAT-FNIII9-10 sur le disque de PCL est favorable à l'adhésion et au bon étalement cellulaire.

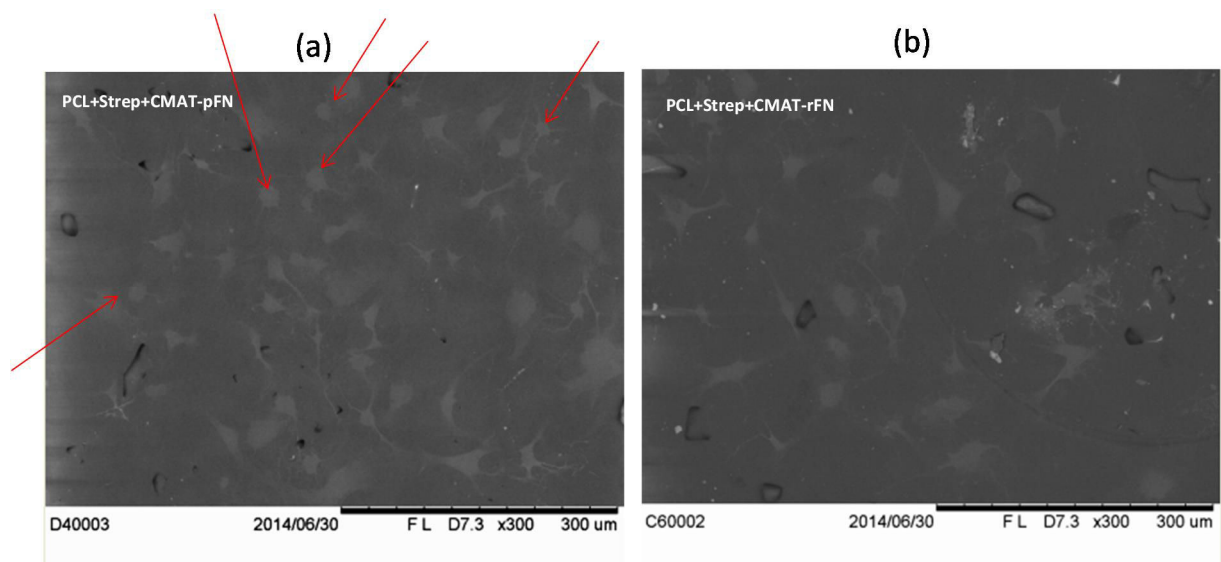


Figure 52: comparaison de l'étalement cellulaire sur deux surfaces coatées avec de la fibronectine totale (a) et avec un fragment recombinant CMAT-FNIII9-10 (b) via une couche de streptavidine.

V. DISCUSSION

Le vieillissement de la population ainsi que les accidents responsables de perte d'organes ou de tissus créent d'une manière continue un besoin de plus en plus croissant en matériaux spécifiquement adaptés pour des applications biomédicales réparatrices. Le développement de ces matériaux spécialisés doit obéir aux exigences mécaniques et chimiques requises par le corps humain et garantir une réponse appropriée.

Cependant de nombreux échecs post implantation sont toujours rencontrés suite à des interactions cellule- matériau et l'une des plus grandes préoccupations des chercheurs biomédicaux est d'assurer l'intégration rapide du biomatériau en éliminant les risques de rejets.

Dans l'étude bibliographique nous avons montré que plusieurs stratégies ont été proposées afin de palier à cette contrainte majeure. Cependant, aucune de ces stratégies n'est vraiment optimale. Parmi celles-ci, une approche prometteuse suscitant un intérêt croissant consiste en l'immobilisation de molécules bioactives à la surface du biomatériau. Cette technique vise principalement à améliorer l'adhésion sélective du bio matériau et à assurer la rapidité de son intégration.

Parmi les molécules participant à la médiation du processus d'adhésion cellulaire, une glycoprotéine multifonctionnelle est utilisée par de nombreuses cellules comme substrat d'adhérence: la fibronectine. Cette protéine est composée de plusieurs domaines d'adhésion dont le site de fixation cellulaire. Cette liaison FN-Cellule est initiée grâce à une affinité entre le tri peptide RGD situé dans le fragment 10 du domaine III de la FN et les récepteurs des intégrines exposés à la surface cellulaire.

Par conséquent, la fibronectine est un candidat intéressant pour la fonctionnalisation des surfaces des bio-matériaux dans le but de favoriser leur intégration.

Dans ce travail, nous nous sommes donc intéressés à la production des fragments 9 et 10 du domaine III de la fibronectine humaine impliquée dans l'adhésion cellulaire. L'objectif de cette thèse vise ensuite à tester la bio activité par le biais d'un test d'adhésion cellulaire en vue de l'immobilisation de ces fragments à la surface de notre biomatériau. Pour cela nous avons opté pour la production de ces fragments par génie génétique incluant la technologie de fusion.

En effet, la production de protéines hétérologues faisant appel à la stratégie de fusion est devenue une méthode de plus en plus utilisée depuis son apparition dans le domaine des biotechnologies. Grâce au développement des stratégies de clonage et des méthodes de

production, la technologie recombinante de fusion a connu un essor remarquable. Elle apporte une touche complémentaire aux techniques d'optimisation visant la séquence d'ADN telles que la mutagenèse dirigée et l'optimisation des codons. Actuellement, l'industrie pharmaceutique fait appel à un nombre très important de protéines recombinantes de fusion utilisées pour des applications thérapeutiques telles que l'hormone de croissance humaine, l'interferon- α , l'érythropoïétine...(Carter, 2011).

Ce progrès a donc fortement contribué à l'optimisation de la production et à l'élaboration de nouveaux systèmes intervenant dans l'amélioration de l'efficacité et la praticité des étapes de production.

Dans ce contexte, différents partenaires de fusion ont été utilisés dans le domaine des protéines recombinantes. Une approche visant l'emploi de plusieurs tags de fusion en tandem a été largement utilisée ces dernières années, dans la perspective d'associer leurs avantages et de les combiner. De ce fait, il est devenu non seulement possible de modifier le comportement des protéines en agissant sur la solubilité telles que, la maltose binding protéine (MBP) (Dyson et al., 2004), la glutathion S transférase (GST) (Kim and Lee, 2008), la thioredoxine (TRX), mais aussi de développer des protocoles de purification standardisés grâce aux TAGS d'affinité et des protocoles de suivi rapide des différentes étapes de production des protéines grâce aux tags de coloration.

Dans le cadre de la réalisation de ces travaux de thèse, nous avons conçu et développé un nouveau système de production de protéines recombinantes qui fait appel à l'utilisation de trois partenaires de fusion en tandem. Deux tags d'affinité (10xHis tag et SBP tag) intervenant dans la simplification de l'étape de purification et offrant des degrés de pureté améliorés et un tag coloré (cytochrome b5) offrant la possibilité de tracer les étapes de production et de purification. A travers ce système nous avons également pu mettre au point une méthode simple et économique permettant le suivi et la quantification de l'adsorption des protéines recombinantes de fusion à la surface d'un support.

Grâce à ce projet, nous avons ainsi montré l'intérêt de l'utilisation du système CMAT dans le cadre de l'expression, la purification et l'adsorption des fragments 9 et 10 du domaine III de la fibronectine humaine.

Au cours de ce travail, nous avons choisi un système d'expression modulable offrant la possibilité du contrôle de l'expression via l'induction. Nos résultats ont montré que l'induction

affecte d'une manière significative les paramètres de croissance des deux souches testées. En effet, l'étape de l'induction réoriente la machinerie cellulaire vers la synthèse des protéines hétérologue et donc favorise leur expression spécifique plutôt que la production de biomasse.

Par ailleurs, malgré ses performances en tant que système d'expression le plus utilisé pour la production de protéines recombinantes, *E. Coli* présente un problème majeur couramment rencontré se traduisant par de faibles niveaux d'expression de protéines recombinantes sous forme soluble (Kimizuka et al., 1991; Mitra et al., 2005).

En effet, lors de l'expression du fragment recombinant (CMAT-FNIII9-10) nous avons constaté qu'une grande partie de la production s'est opérée sous forme de corps d'inclusion. Ces derniers se trouvent sous forme d'agrégats et ne sont donc pas actifs. Or l'objectif de ce travail vise la production d'un fragment recombinant présentant une activité adhésive vis-à-vis des cellules hMSCs. A cet effet, nous avons réalisé un travail d'optimisation de la production de notre protéine recombinante FNIII9-10 dans le but de favoriser son expression sous forme soluble.

Lors de ce travail d'optimisation, nous avons choisi le système procaryote *E.coli* grâce à ses nombreux avantages et aux potentielles applications qu'il offre. En effet, en nous basant sur les travaux de recherches précédemment menés par le laboratoire EBInnov (EBI), nous avons réussi à maîtriser les paramètres cinétiques de croissance de cette souche ainsi que les protocoles de leur transformation.

De plus, plusieurs paramètres peuvent être modifiés afin d'obtenir un profil d'expression optimal. La culture de ce système présente d'autres avantages comme le faible coût, les conditions de culture simples la croissance rapide de cette souche (Goeddel et al., 1979). Le fragment III9-10 de la fibronectine par exemple a été exprimé chez *E.coli* dans le cadre de l'élaboration d'une matrice 2 D intervenant dans la promotion de l'adhésion et de la différenciation des cellules mésenchymateuses souches humaines (Martino et al., 2009). Kang and Jang (2009) ont également utilisé ce système d'expression pour la production du fragment III10 de la fibronectine dans le but de décrire ces effets sur l'attachement cellulaire.

Dans le cadre de la production de protéines hétérologues dans *E.coli*, il a été démontré que plusieurs paramètres peuvent affecter la solubilité et le rendement de production (Sørensen and Mortensen, 2005; Yin et al., 2003). Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de la variation de la souche d'expression (BL21 pLysS et KRX), la concentration de l'inducteur

IPTG (0.1, 0.3, 0.5 et 0.7 mM) et la température de culture après induction (18, 20, 25 et 30°C) sur l'expression de FNIII9-10.

Ainsi, à travers ce travail d'optimisation, nous avons déterminé les conditions nécessaires à une production optimale obtenue chez BL21 pLysS induite avec 0.3mM IPTG et cultivée à 18°C pendant 16 heures. Dans leurs travaux portant sur l'expression du fragment FNIII7-10 de la fibronectine Zhang et al. (2010) ont utilisé une concentration de 0.4mM d'IPTG et une température de culture de 30°C alors que Cutler et García (2003) ont utilisé une température de culture de 28°C pour une même concentration en IPTG.

Dans un second temps, nous avons voulu investiguer la piste de la solubilisation des corps d'inclusion obtenus par le biais d'un agent solubilisant suivie d'une succession d'étape de renaturation. Pour cela, nous avons mis au point un protocole de dénaturation / renaturation. Ce protocole fait appel à un agent dénaturant fort capable de rompre les agrégats.

Enfin, nous avons comparé les résultats obtenus à travers les deux méthodes sur le plan des quantités de protéines générées. Nous avons obtenus 258µg de protéines purifiées à partir de la fraction soluble et 287µg de protéines purifiées à partir de la solubilisation de la fraction insoluble. Nous avons constaté que les valeurs n'étaient pas très différentes et que la solubilisation n'a pas été totale. De plus, l'emploi de l'agent dénaturant risque de compromettre l'activité biologique des protéines puisque ce dernier étant agressif va totalement dénaturer la structure tridimensionnelle de notre protéine de fusion.

D'où notre choix pour la production de la protéine de fusion CMAT-FNIII9-10 dans les conditions optimales de culture fixés par le travail d'optimisation réalisé en amont afin de la récupérer sous forme soluble.

Lors de l'expression de la protéine recombinante de fusion sous forme de corps d'inclusion, nous avons constaté une coloration rouge du culot bactérien. La présence de cette couleur dans le culot bactérien indique que le cytochrome b5 a réussi à garder sa capacité à retenir son cofacteur (l'hème) en dépit des conditions dénaturantes engendrées par la guanidine hydrochloride.

Cet élément contribue donc à fournir une information visuelle précoce, nécessaire à la localisation de la protéine d'intérêt. D'où l'intérêt de ce système dans le criblage rapide des clones, exprimant de manière optimale, la protéine d'intérêt sous sa forme soluble.

D'autre part, le système CMAT offre la possibilité de renseigner sur le temps optimal de la culture bactérienne garantissant la meilleure production protéique. En effet, nos résultats ont montré que la superposition entre les fractions protéiques extraites à différents temps de culture et leurs profils de migration protéique analysés sur SDS-PAGE, reflète une linéarité entre les intensités de la coloration de la fraction et la bande électrophorétique correspondante. Par conséquent, cette corrélation offre l'avantage de fournir un outil performant et rapide de screening de la durée optimale de culture.

De part sa propriété chromogène favorisant l'optimisation de l'expression des protéines d'intérêt, le cytochrome b5 présente le grand avantage d'être stable. En effet, il a démontré une aptitude à conserver la même couleur rouge tout au long des processus de production et de purification contrairement au Tag FMN dont la couleur n'est pas la même et a tendance à varier en fonction des changements redox. De plus, en termes de masse moléculaire il est clair que notre tag présente une taille (15KDa) moins importante que celle de FMN (21KDa) (Finn et al., 2005).

Depuis le développement de la stratégie de purification en tandem, plusieurs combinaisons de tags ont été largement utilisées comme par exemple le système combinant le FLAG tag et le calmodulin binding peptide (CBP tag) dans la double purification d'un complexe de protéine de mammifère (Liang et al., 2009).

Le système CMAT que nous avons développé, fait appel à deux étapes de purification séquentielles grâce à la présence des deux tags d'affinité (10xHis tag et SBP tag).

Grâce à cette combinaison, il garantit efficacement une étape simple et rapide de purification en réduisant considérablement le risque de présence de contaminants retenus dans l'éluat final. En effet, les résultats de la purification de la protéine de fusion CMAT-FNIII9-10 sur le gel SDS-PAGE ont montré que cette double chromatographie d'affinité offre une haute spécificité et une meilleure qualité de purification dont le degré a atteint les 98%. Dans d'autres études portant sur la production de la fibronectine ou d'un fragment qui en dérive, la présence de contaminants résiduels, après l'étape de purification, est notable que ce soit en utilisant le His tag (Elloumi et al., 2009) ou la GST (Roy et al., 2010).

Ceci coïncide également avec certaines conclusions dans lesquelles il a été rapporté que la purification par chromatographie en utilisant le tag His seul présentait un faible degré de pureté (Keefe et al., 2001).

De ce fait, l'approche que nous avons mise au point a contribué avec succès à soulever certaines contraintes liées à la qualité de purification des complexes protéiques.

Par ailleurs, nous pouvons affirmer que notre stratégie de clonage a été réalisée avec succès et que l'élaboration de la structure tridimensionnelle de la protéine de fusion (CMAT-FNIII9-10) s'est opérée correctement. En effet, nous avons remarqué que les deux tags se sont liés à leurs matrices respectives lors de l'étape de purification et n'ont pas été masqués par la conformation du fragment FNIII9-10 lors de son repliement. Cette étape est très déterminante et risque de compromettre leur activité et empêcher par conséquent leur reconnaissance par la matrice.

La stratégie de fusion CMAT et le travail d'optimisation réalisé en amont ont permis de fixer des conditions de culture et de purification optimisées assurant une récupération maximale de la protéine d'intérêt. Après avoir quantifié les protéines d'intérêt, nous avons constaté que notre système a généré un rendement d'environ 3 mg de protéines recombinantes de fusion purifiées par litre de culture bactérienne. Ce résultat rejoint le rendement de production allant de 2 à 10mg de protéines /L obtenu par (Petrie, 2006) et présente en plus l'avantage d'offrir un meilleur rendement de pureté.

A partir des données bibliographiques mettant l'accent sur le rôle des séquences RGD et PHSRN dans l'initiation et la médiation de l'adhésion cellulaire (Aota et al., 1994) nous avons cloné et produit les domaines 9 et 10 contenant ces fragments en fusion avec la CMAT. Après les étapes de clonage et de production, la présence de ces séquences a été vérifiée.

Dans la mesure où la protéine de fusion CMAT-FNIII9-10 contient un mélange de protéines, l'analyse MS / MS s'est avérée nécessaire et les peptides (RGD) et (PHSRN) ont été détectés avec succès à partir du fragment recombinant de fibronectine sur le spectre MS.

L'objectif de notre travail a été ensuite d'adsorber la solution contenant les protéines de fusion purifiées à la surface du biomatériau dans le but d'étudier la réponse cellulaire relative. L'adjonction d'anticorps anti RGD ou anti HFN7 figure parmi les techniques qui permettent de caractériser l'adsorption de fragments de fibronectine à la surface d'un support (Cutler and García, 2003; Roy et al., 2010).

Cette méthode est très précise et apporte en plus une information relative à la qualité de l'étalement des fragments adsorbés cependant elle présente un inconvénient majeur puisqu'elle reste onéreuse. En plus de fournir un système efficace et facile pour le traçage des étapes allant de l'expression à la purification, la technologie de fusion CMAT offre une nouvelle méthode de

suivi rapide de l'adsorption des protéines à la surface des supports, et ce en utilisant le marqueur de coloration: le cytochrome b5. Il a été montré que le cytochrome b5 nécessite le précurseur d'hème (ALA) pour la production de la coloration rouge (Ishizuka et al., 2011). Ainsi, des extraits bactériens d'une culture non transformée et induite à l'ALA ont été utilisés. Ces extraits contiennent l'ALA métabolisé et constituent donc le substrat du marqueur chromogène. Nous avons mis au point ce protocole dans le but de détecter la présence de notre protéine d'intérêt (FNIII9-10) fusionnée à ce dernier par changement de couleur suite au contact des deux échantillons. Ce protocole a montré clairement l'apparition d'une coloration rouge de la solution de fibronectine recombinante de fusion en présence de l'extrait bactérien. De plus, en fonction des quantités croissantes de CMAT-FNIII9-10 utilisées dans ce test, une augmentation au niveau de l'intensité de coloration a été perceptible. Ainsi, des informations qualitatives rapides sur l'adsorption des protéines de fusion ont pu être renseignées sans nécessiter de source d'énergie externe contrairement à la GFP (Green Fluorescent Protein) (Finn et al., 2005).

Par ailleurs, le développement d'un tel système de traçage de l'adsorption permet une quantification facile et rapide des protéines recombinantes de fusion grâce à la corrélation établie entre le signal du cytochrome b5 et la quantité relative de protéine. La quantification de l'adsorption par le biais de ce système présente également l'avantage d'être spécifique par rapport à des méthodes de dosage conventionnelles et d'analyse sur gel d'électrophorèse (Zhang et al., 2010) et contribue surtout à un gain de temps considérable.

En effet, nous avons démontré dans nos anciens travaux que la mesure de l'absorbance à 400nm est spécifique au cytochrome b5. Ce dernier étant le partenaire de fusion de du fragment FNIII9-10, la mesure de la DO400nm reflète donc la quantité de la protéine d'intérêt. Grâce au système CMAT, nous avons quantifié les protéines d'intérêt contenues dans la solution initiale de coating et celles contenues dans le surnagent récupéré après l'étape d'adsorption afin d'en déduire la quantité des protéines CMAT-FNIII9-10 adsorbées. Ainsi, nous avons pu estimer d'une manière simplifiée le pourcentage d'adsorption de notre fragment d'intérêt qui est d'environ 40%. Ce résultat est très intéressant puisqu'il nous renseigne sur la quantité de fibronectine qui tapisse la surface utilisée.

Les pertes sont probablement dues aux étapes de lavage suivant l'adsorption mais aussi à la force de pipetage qui pourrait avoir contribué à décrocher des cellules ayant déjà adhéré.

Après les étapes de validation du contrôle qualité et d'adsorption du fragment recombinant CMAT-FNIII9-10, l'activité biologique de ce dernier a été investiguée dans le but de

l'employer comme outils de fonctionnalisation de la surface des films de PCL ultérieurement. Le fragment recombinant de fusion a montré que son comportement adhésif initial était comparable à celui de la fibronectine totale du plasma et du polystyrène traité pour l'attachement cellulaire en présence des cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC).

Un biomatériau destiné à l'implantation sera exposé d'une manière directe et prolongée à l'environnement physiologique riche en sérum, plasma et liquide synovial. La composition de ces milieux est riche en protéines qui vont couvrir la surface du biomatériau et influencer les étapes du processus cellulaire à savoir l'adhésion. Cette étape physiologique clé a poussé les chercheurs à développer des biomatériaux capables d'assimiler d'une manière optimale les cellules à leurs surfaces de manière à favoriser la régénération ou la réparation tissulaire. A cet effet, l'approche de modification de surface des biomatériaux par les biais de ligands biologiques qui participent à fixer les intégrines cellulaires a émergé dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Ce processus d'interaction entre les ligands développés et les récepteurs cellulaires est une étape critique qui dépend de l'orientation spatiale des motifs immobilisés et de leur densité à la surface du support (Bing-Hao Luo, 2007).

Cependant, cette stratégie a montré ses limites dans la mesure où elle ne permet pas le contrôle précis de l'adsorption, l'orientation et la densité de la répartition du ligand à la surface du support.

Dans l'objectif de développer cette approche, nous avons généré notre ligand FNIII9-10 en fusion avec la CMAT et notamment le tag SBP reconnu spécifiquement par la streptavidine. Cette dernière servira de jonction entre le biomatériau (PCL) et notre ligand CMAT-FNIII9-19). Nous avons évalué par la suite la capacité de notre système dans l'interaction avec les intégrines cellulaires des hMSCs et donc sa capacité à contrôler la présentation du ligand.

Nous avons cherché à valider l'activité bio-adhésive de notre fragment sur un support de polystyrène. Nos résultats ont montré que les cellules souches mésenchymateuses humaines se sont fixées avec succès à la surface coatée avec le fragment recombinant.

Cette réponse devrait être attribuée à la présence du domaine III10 de la fibronectine. En effet, il a été rapporté que le peptide RGD reconnu par de nombreuses intégrines dont les unités $\alpha 5 \beta 1$ est un facteur clé dans le déclenchement de l'adhésion cellulaire (Hsu et al., 2004; Obara et al., 1987; Ruoslahti and Pierschbacher, 1987). Des études ont démontré que la séquence PHSRN

localisée dans le domaine III9, en présence du tri-peptide RGD, a montré un effet synergétique se traduisant par une augmentation significative de l'adhésion cellulaire. (Aota et al., 1994; Mardon and Grant, 1994). Le coulage des deux domaines 9 et 10, dans leur ordre d'enchaînement et leur structure native constitue un paramètre important dans le maintien de leur activité (Aota et al., 1994).

D'autre part, nous avons constaté qu'il existe une relation entre le nombre de cellules adhérentes, la concentration de la solution de fibronectine recombinante adsorbée à la surface du support. Ce constat semble en accord avec certains travaux dans lesquels il a été rapporté que l'attachement cellulaire est « dose dépendant » de la quantité de fibronectine adsorbée (Cutler and García, 2003; Underwood and Bennett, 1989). Ainsi, il serait envisageable de moduler la réponse cellulaire en augmentant la quantité de ligands. Or, nous avons démontré qu'il existe une concentration seuil, à partir de laquelle la surface devrait être saturée et donc ne plus induire d'attachement cellulaire.

Dans le but de tester et de valider l'implication de notre ligand dans la fixation spécifique des hMSCs, nous avons étudié la réponse cellulaire en présence et en absence de sérum de veau fœtal et de BSA à 1%. Nous avons d'abord observé que l'adhérence cellulaire ne semble pas être influencée par la présence du sérum. Par contre, les résultats des expériences dans lesquelles la BSA n'a pas été ajoutée, montrent un nombre de cellules bien supérieur à ceux des conditions de saturation par la BSA. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Schmidt and Healy (2013).

Au vu des résultats, on pourrait suggérer que l'ajout de la BSA avant l'ensemencement cellulaire s'est révélé une étape importante dans la réduction du bruit de fond dû à l'adhésion non spécifique au support.

Dans un second temps, nous avons testé la capacité de notre échafaudage adhésif composé d'un disque de PCL, d'une couche de streptavidine et des fragments CMAT-FNIII9-10 à fixer les hMSCs. Ensuite, nous avons étudié l'effet de l'immobilisation orientée du fragment CMAT-FNIII9-10 sur la réponse adhésive.

Nous avons constaté que notre échafaudage (PCL-Streptavidine-CMAT-FNIII9-10) offre le moins de perte cellulaire par rapport aux autres constructions. Ainsi, la fonctionnalisation de la surface des PCL par le biais de la fibronectine du plasma ou le fragment recombinant a permis une meilleure adhésion cellulaire. En effet, il a été montré que la modification de surface des

biomatériaux avec des protéines de la matrice extracellulaire contribuait à l'amélioration de la médiation de l'adhésion de cellules stromales et d'ostéoblastes (Rezania and Healy, 1999) mais aussi à réduire le temps nécessaire à l'attachement cellulaire (Rahmany and Van Dyke, 2013).

De plus, on peut remarquer que l'immobilisation orientée de notre fragment sur les disques de PCL, via la streptavidine, présente un comportement adhésif cellulaire légèrement plus important que celui dans le cas d'une adsorption non spécifique. Ce constat pourrait être dû au fait que l'immobilisation du fragment recombinant via le tag SBP a permis de le présenter d'une manière orientée. Ainsi, cette approche pourrait avoir contribué à exposer correctement les séquences RGD et PHSRN à la surface du disque de PCL et donc à favoriser l'interaction avec les intégrines cellulaires.

Par ailleurs, nous avons remarqué que l'adhésion cellulaire sur une surface coatée avec de la streptavidine a montré un niveau d'adhésion cellulaire légèrement plus élevé que celui observé sur la PCL seule. Ceci suggérerait que la streptavidine possède une capacité à fixer les récepteurs cellulaires.

Dans leur étude, Schmidt et al. (2013) ont décrit l'affinité de la streptavidine aux récepteurs cellulaires. Cependant, cette interaction semble s'opérer à de faibles niveaux. L'étude de la structure de la streptavidine a montré une similarité de sa chaîne aminée avec celle du domaine III10 de la fibronectine et ce au niveau du tripeptide RYD.

Ce motif peptidique rappelle effectivement le RGD de la fibronectine. Cette constatation expliquerait ainsi l'effet mimétique de la streptavidine dans la médiation de la fixation des intégrines.

Au vu de nos résultats, on pourrait suggérer que la streptavidine montre un modèle de support approprié pour l'immobilisation orientée du fragment CMAT-FNIII9-10 à la surface des disques de PCL dans le cadre de la construction de l'échafaudage biomimétique d'adhésion.

Notre stratégie a offert un moyen performant pour l'amélioration de l'activité bio adhésive du biomatériau et plus précisément dans l'initiation spécifique des disques de PCL à l'interaction avec les intégrines cellulaires. Cette stratégie présente l'avantage de préserver les propriétés biologiques des peptides immobilisés contrairement aux techniques de fonctionnalisation chimiques (Huang et al., 2010).

Cependant, les observations de nos comptages cellulaires ne montrent tout de même pas des différences très significatives. Ce ci pourrait être expliqué par le fait que la densité d'ensemencement cellulaire initial n'a peut être pas été assez forte. D'autre part, étant donné que dans le cadre de ces travaux de thèse, les protocoles ont été mis au point pour la première fois, il serait judicieux d'optimiser les expérimentations d'élaboration de l'échafaudage adhésif en essayant d'augmenter les quantités de streptavidine immobilisée et de fibronectine correspondantes lors du coating du fait que le comportement cellulaire y est étroitement lié.

Enfin, l'organisation des cellules au sein du tissu ainsi que leur morphologie constituent des paramètres importants dans l'étude de la réponse à l'implantation. Ainsi, nous avons analysé ces données et nous avons remarqué que les cellules mésenchymateuses souches humaines avaient une répartition homogène et une densité de distribution plus importante sur les disques de PCL coatés avec de la fibronectine par rapport aux non greffés. Cette distribution pourrait s'expliquer par la présence à la surface des PCL des peptides RGD et PHSRN impliqués dans la l'interaction avec les récepteurs cellulaires. Cette interaction favoriserait donc l'attachement cellulaire initié par le biais des récepteurs des intégrines. De plus, lors du processus d'assemblage cellulaire, l'étape de l'adhésion est généralement suivie par l'étalement cellulaire. Nos résultats ont montré que les cellules adhérentes ont adopté des formes de losange parfois étoilées au contact de l'échafaudage adhésif ce qui indique qu'elles ont réussi à s'étaler correctement sur cette surface.

En résumé, notre stratégie a fournit un moyen efficace pour concevoir des fragments de fibronectine humaine capables de mimer l'adhésion cellulaire pour des expériences de fonctionnalisation de surface. Ce système fait appel à la technologie recombinante afin de garantir une flexibilité permettant de designer les fragments en fonction de leurs rôles biologiques. En effet, grâce à ce modèle nous pourrions envisager de concevoir des chimères de fibronectine par clonage en tandem de plusieurs domaines complémentaires : domaines de fixation de l'héparine par exemple.

Notre stratégie de clonage en fusion avec le marqueur coloré cytochrome b5 a permis une détection facile à l'œil nu du fragment d'intérêt à des stades précoces de son expression, de sa purification et de son adsorption à la surface de supports. Cette approche présente une alternative attrayante aux méthodes conventionnelles et garantit un gain de temps remarquable au niveau des étapes de contrôle qualité.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

VI. CONCLUSION & PERSPECTIVES

Depuis le développement des techniques de modification de surfaces des implants, plusieurs progrès ont été réalisés dans le but d'optimiser l'intégration rapide des biomatériaux. Parmi ceux-ci, une approche associant des biomolécules actives à la surface des biomatériaux a beaucoup été utilisée.

L'origine de ces biomolécules actives est variable et ces dernières peuvent être obtenues par la technologie recombinante. En effet, cette stratégie offre la possibilité de faire appel à des outils garantissant une production efficace grâce à l'utilisation des tags de fusion permettant le suivi rapide de l'expression et de la purification protéique avec un degré de pureté optimal.

Lors de la réalisation de cette thèse, nous avons d'abord développé un procédé de traçage de l'expression et de la purification de protéines recombinantes qui combine l'action de trois tags de fusion (10xHis, SBP et cytochrome b5) en tandem. Ce système a été utilisé pour la production du fragment III9-10 de la fibronectine humaine. Il a montré son intérêt d'une part, dans le suivi des étapes de production et de purification et de l'autre, dans le suivi et la quantification de l'adsorption du fragment recombinant à la surface de support grâce au cytochrome b5. De plus, ce procédé a montré l'intérêt du double tag d'affinité dans la réalisation simple et rapide d'une chromatographie d'affinité et dans l'amélioration du degré de pureté de la protéine d'intérêt.

Ensuite, nous avons construit une matrice adhésive grâce à l'immobilisation orientée du fragment recombinant de la fibronectine FNIII9-10 en fusion avec la cassette multi tags (CMAT) à la surface d'un film de PCL à l'aide d'une couche de streptavidine. L'approche suivie dans cette partie du travail de recherche a consisté d'abord, dans l'élaboration des films de PCL, ensuite dans l'établissement de leurs propriétés physicochimiques et enfin dans leur fonctionnalisation par immobilisation du fragment FNIII9-10 en fusion avec la CMAT à travers une couche de streptavidine. Une fois encore, le système CMAT prouve son intérêt dans l'immobilisation orientée grâce au tag SBP dont l'affinité par rapport à la streptavidine a été exploitée.

Enfin, notre objectif était d'étudier l'influence de cette construction sur le comportement cellulaire et de comprendre plus en détail l'effet de l'immobilisation orientée sur la réponse des cellules souches mésenchymateuses humaines et le rôle que joue le fragment recombinant au niveau de l'interface cellule matériau.

La CMAT-FNIII9-10 clonée et produite chez E.coli BL21 a été surexprimée et nous avons tracé à l'œil nu les étapes relatives à sa production et à sa purification grâce au domaine de fixation de l'hème du cytochrome b5. Ce même tag, grâce à sa propriété chromogène nous a permis de quantifier la protéine d'intérêt par simple lecture spectrophotométrique sans avoir recours à une source d'énergie externe.

De plus, nos résultats ont montré un degré de pureté de la CMAT-FNIII9-10 amélioré ayant atteint les 98% grâce au couple de tag d'affinité 10xHis et SBP.

Ainsi, sa surexpression, ses capacités de coloration et de purification, sa sensibilité et sa stabilité font de la CMAT un candidat intéressant pour l'optimisation de procédés de production et de purification de protéines recombinantes.

Au cours de ces travaux, l'étape de clivage n'a pas été traitée, cependant le choix d'intégrer un site de clivage *tev* est déterminant puisqu'il présente l'avantage d'offrir la possibilité d'éliminer la CMAT après la purification dans la perspective d'une application thérapeutique. Les travaux menés par le laboratoire de biologie moléculaire de l'EBI ont porté sur la production et l'immobilisation de la *tev* protéase sous forme de colonnes de clivage.

La caractérisation de l'activité biologique adhésive du fragment recombinant produit a été un de nos principaux objectifs. L'adhésion des CSh en présence de la protéine CMAT-FNIII9-10 adsorbée à la surface d'un support en plastique a été réalisée avec succès et a montré des niveaux d'attachement équivalents à la surface traitée par une solution de fibronectine entière du plasma. De plus, la détection de l'adsorption du fragment CMAT-FNIII9-10 à la surface du plastique a été effectuée avec succès, grâce à la méthode colorimétrique, en utilisant le cytochrome b5.

Dans les expériences d'adsorption orientée de la CMAT-FNIII9-10, par fixation du tag SBP à la streptavidine étalée à la surface des PCL, il a été constaté une légère réduction de la perte cellulaire par rapport à des surfaces non traitées.

Cette approche a été adoptée afin d'optimiser la conformation des fragments de fibronectine adsorbés à la surface des PCL en améliorant l'exposition de leurs sites impliqués dans la fixation cellulaire, tels que les séquences « RGD » et « PHSRN ».

Cette thèse a été menée en associant plusieurs thématiques scientifiques comme la biologie moléculaire, la science des biomatériaux et la chimie, dans la perspective de permettre l'élaboration d'une nouvelle matrice adhésive.

En résumé, les résultats fournis par ce travail de recherche ont permis la mise en place d'un procédé efficace de production de protéine recombinantes d'une part et l'emploi de molécules bioactives telle que la CMAT-FNIII9-10 comme groupement fonctionnel pour un matériau polymère (PCL) de l'autre. Cette stratégie offre une solution attrayante pour les études visant à promouvoir l'intégration rapide d'implants dans des applications d'ingénierie tissulaire, orthopédiques et dentaires.

Ces résultats encourageants devraient pouvoir se poursuivre. Il serait donc intéressant de réaliser des essais de production de la CMAT-FNIII9-10 à l'échelle de fermenteur de 5 litres, d'utiliser d'autres systèmes de production tels que la levure afin d'optimiser le rendement de production et de solubilité.

Par ailleurs, les observations positives des tests d'adhésion cellulaire nous poussent à envisager la construction de nouvelles chimères faisant intervenir des domaines codant pour d'autres fonctions impliquées dans le processus cellulaire. Il serait aussi intéressant d'optimiser d'avantage les paramètres de construction du scaffold dans la mesure où la réponse cellulaire est dépendante des quantités de fibronectine.

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Albano C, Randers-Eichhorn L, Bentley WE RG. 1998 Green fluorescent protein as a real time quantitative reporter of heterologous protein production. *Biotechnol Prog.* 14(2):351-4.
- Aota S, Nomizu M, Yamada KM. 1994. The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J Biol Chem* 269(40):24756-61.
- Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J. 2006. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 48:1-13.
- Balcaen L, Bolea-Fernandez E, Resano M, Vanhaecke F. 2014. Accurate determination of ultra-trace levels of Ti in blood serum using ICP-MS/MS. *Analytica Chimica Acta* 809(0):1-8.
- Bauer TW, Muschler GF. 2000. Bone Graft Materials: An Overview of the Basic Science. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 371:10-27.
- Bayer ME, Bayer MH, Lunn CA, Pigiet V. 1987. Association of thioredoxin with the inner membrane and adhesion sites in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 169:2659-2666.
- Bing-Hao Luo CVC, and Timothy A. Springer. 2007. Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annu Rev Immunol.* 25:619–647.
- Bornhorst J, Falke J. 2000. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol.* 326:245-54
- Bradshaw MJ, Smith ML. 2014. Multiscale relationships between fibronectin structure and functional properties. *Acta Biomaterialia*(0).
- Branemark P-I. 1983. Osseointegration and its experimental background. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 50(3):399-410.
- Buddy D, Ratner ASH, Frederick J.Schoen, Jack E. Lemons. 1996. *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. Seattle, Boston, Birmingham: Academic press.
- Burnouf T, Burnouf M. 2004. Séparation chromatographique des protéines du plasma, notamment du facteur VIII, du facteur von Willebrand, de la fibronectine et du fibrinogène. Google Patents.
- Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, Mattern MR. 2005. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr Purif* 43(1):1-9.
- Cardin AD, Demeter DA, Herschel JR, Weintraub R, Jackson L. 1991. Molecular design and modeling of protein-heparin interactions. *Methods in Enzymology* 203:556-583.
- Carter PJ. 2011. Introduction to current and future protein therapeutics: A protein engineering perspective. *Experimental cell research* 317 1261 – 1269.
- Charlton A, Zachariou M. 2011. Tag removal by site-specific cleavage of recombinant fusion proteins. . *Methods Mol Biol* 681:349-67.
- Choi JH, Keum KC, Lee SY. 2006. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science* 61(3):876-885.
- Christie JM, R. Jenkinson, H. F. 2002. Expression of fibronectin-binding protein FbpA modulates adhesion in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology* 148(Pt 6):1615-25.
- Clarke G, Blajchman M. 2012. Utilisation de composants sanguins humains. *Société Canadienne du sang*.
- Collins-Racie LA, McColgan JM, Grant KL, DiBlasio-Smith EA, McCoy JM, LaVallie ER. 1995. Production of Recombinant Bovine Enterokinase Catalytic Subunit in *Escherichia coli* Using the Novel Secretory Fusion Partner DsbA. *Nat Biotech* 13(9):982-987.
- Cutler S, García A. 2003. Engineering cell adhesive surfaces that direct integrin $\alpha 5 \beta 1$ binding using a recombinant fragment of fibronectin. *Biomaterials* 24(10):1759-1770.
- Cutler SM, García AJ. 2003. Engineering cell adhesive surfaces that direct integrin $\alpha 5 \beta 1$ binding using a recombinant fragment of fibronectin. *Biomaterials* 24(10):1759-1770.
- Davis GD, Elisee C, Newham DM, Harrison RG. 1999. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng* 65:382-388.

- Demain AL, Vaishnav P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* 27(3):297-306.
- Detrez F, Seguela R, Coulon G. 2007. Etude des mécanismes de déformation d'un polymère semi-cristallin : le poly(-caprolactone). 18 ème Congrès Français de Mécanique. Grenoble.
- Dickinson CD, Veerapandian B, Dai XP, Hamlin RC, Xuong NH, Ruoslahti E, Ely KR. 1994. Crystal structure of the tenth type III cell adhesion module of human fibronectin. *Journal of molecular biology* 236(4):1079-1092.
- Dyson MR, Shadbolt SP, Vincent KJ, Perera RL, McCafferty J. 2004. Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: Identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC Biotechnol* 4:32.
- Edelbaum O, Stein D, Holland N, Gafni Y, Livneh O, Novick D, Rubinstein M, Sela I. 1992 Expression of active human interferon-beta in transgenic plants. *J Interferon Res.* 12((6):449-53.
- Elloumi HI, Makiko N, Masayasu M, Eiry K. 2009. Construction of multifunctional proteins for tissue engineering: Epidermal growth factor with collagen binding and cell adhesive activities. *Journal of Biotechnology* 139:19-25.
- Erickson HP, Carell N, McDonagh J. 1981. Fibronectin Molecule Visualized in Electron Microscopy : A Long, Thin, Flexible Strand. *The journal of cell biology* 91:673-678.
- Esposito D, Chatterjee DK. 2006. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current Opinion in Biotechnology* 17:353-358.
- Fan GC, Gao FL, Wei TY, Huang MY, Xie LY, Wu ZJ, Lin QY, Xie LH. 2010. Expression of rice gall dwarf virus outer coat protein gene (S8) in insect cells. *Virol Sin* 25(6):401-8.
- Farran I, Sánchez-Serrano J, Medina J, Prieto J, Mingo-Castel A. 2002. Targeted expression of human serum albumin to potato tubers. *Transgenic Res.* 11(4):337-46.
- Finn RD, Kapelioukh I, Paine MJ. 2005. Rainbow tags: a visual tag system for recombinant protein expression and purification. *BioTechniques* 38:387-392
- Fong BA, Wu W-Y, Wood DW. 2010. The potential role of self-cleaving purification tags in commercial-scale processes. *Trends in Biotechnology* 28(5):272-279.
- Furth ME, Atala A, Van Dyke ME. 2007. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* 28(34):5068-5073.
- Geissler U, Hempel U, Wolf C, Scharnweber D, Worch H, Wenzel K. 2000 Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts. *J Biomed Mater Res.* 51(4):752-60.
- Gnoth S, Jenzsch M, Simutis R, Lubbert A. 2008. Product formation kinetics in genetically modified *E. coli* bacteria: inclusion body formation. *Bioprocess Biosyst Eng* 31(1):41-6.
- Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, Heyneker HL, Yansura DG, Crea R, Hirose T, Kraszewski A, Itakura K, Riggs AD. 1979 Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl Acad. Sci.* 76:106-110.
- Gutiérrez-Ortega A, Sandoval-Montes C, de Olivera-Flores T, Santos-Argumedo L, Gómez-Lim M. 2005. Expression of functional interleukin-12 from mouse in transgenic tomato plants. *Transgenic Res.* 14(6):877-85.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation *J. Biol. Chem* 249:7130-7139.
- Hedhammar M, Alm T, Gräslund T, Hober S. 2006. Single-step recovery and solid-phase refolding of inclusion body proteins using a polycationic purification tag. *Biotechnology Journal* 1(2):187-196.
- Hefti MH, Van Vugt-Van der Toorn CJ, Dixon R, Vervoort J. 2001. A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site. *Anal Biochem* 295(2):180-5.
- Heng BC, Jian Li A, Chen K-L, Reuveny S, Cool SM, Birch WR, Kah-Weng Oh S. 2012. Translating Human Embryonic Stem Cells from 2-Dimensional to 3-Dimensional Cultures in a Defined Medium on Laminin- and Vitronectin-Coated Surfaces. *Stem Cells and Development.* . 21(10): 1701-1715.

- Hetrick E, Schoenfisch M. 2006 Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chem Soc Rev.* 35(9):780-9.
- Heydarkhan-Hagvall S, Schenke-Layland K, Dhanasopon A, Rofail F, Smith H, Wu B, Shemin nR, Beygui R, MacLellan W. 2008. Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering. *Biomaterials* 29(19):2907-14
- Hochuli E, Dobeli H, Schacher A. 1987. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* 411:177-84.
- Hoffmann F, Rinas U. 2004. Stress Induced by Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*. *Physiological Stress Responses in Bioprocesses: Springer Berlin Heidelberg.* p 73-92.
- Holzapfel B, Reichert J, Schantz J, Gbureck U, Rackwitz L, Nöth U, Jakob F, Rudert M, Groll J, Hutmacher D. 2013. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65(4):581-603.
- Hombreiro PM, Zinutti C, Lamprecht A, Ubrich N, Astier A, Hoffman M, Bodmeier R, Maincent P. 2000. The preparation and evaluation of poly(epsilon-caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *J Control Release.* 3(65):429-38.
- Hsu S-h, Chu W-P, Lin Y-S, Chiang Y-L, Chen DC, Tsai C-L. 2004. The effect of an RGD-containing fusion protein CBD-RGD in promoting cellular adhesion. *Journal of Biotechnology* 111(2):143–154.
- Hu J, Qin H, Sharma M, Cross TA, Gao FP. 2008. Chemical cleavage of fusion proteins for high-level production of transmembrane peptides and protein domains containing conserved methionines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778(4):1060-1066.
- Huang X, Zauscher S, Klitzman B, Truskey G, Reichert W, Kenan D, Grinstaff M. 2010. Peptide Interfacial Biomaterials Improve Endothelial Cell Adhesion and Spreading on Synthetic Polyglycolic Acid Materials. *Annals of Biomedical Engineering* 38(6):1965-1976.
- Hynes R, Yamada K. 1982. Fibronectins: Multifunctional Modular Glycoproteins. *The journal of cell biology* 95 369-377
- Idris A, Tohda H, Kumagai H, Takegawa K. 2010. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *. Appl Microbiol Biotechnol* 86:403-417.
- Ishizuka M, Abe F, Sano Y, Takahashi K, Inoue K. 2011. Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. *Int. Immunopharmacol* 11:358-365.
- Jennya RJ, Mannb KG, Lundblad RL. 2003. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa
Protein Expression and Purification
31(1):1-11.
- Jiang Z, Huang Y, Sharfstein ST. 2006. Regulation of recombinant monoclonal antibody production in chinese hamster ovary cells: a comparative study of gene copy number, mRNA level, and protein expression. *Biotechnol Prog.* 22(1):313-8.
- Jou C-H, Lin S-M, Yun L, Hwang M-C, Yu D-G, Chou W-L, Lee J-S, Yang M-C. 2007. Biofunctional properties of polyester fibers grafted with chitosan and collagen. *Polymers for Advanced Technologies* 18(3):235-239.
- Kain S, Adams M, Kondepudi A, Yang T, Ward W, Kitts P. 1995. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *BioTechniques* 19(4):650-655.
- Kang W, Jang J. 2009. Protein engineering, expression, and activity of a novel fusion protein possessing keratinocyte growth factor 2 and fibronectin. *Acta Biochim Biophys Sin* 41(1):16-20.
- Keefe A, Wilson D, Seelig B, Szostak J. 2001. One-Step Purification of Recombinant Proteins Using a Nanomolar-Affinity Streptavidin-Binding Peptide, the SBP-Tag. *Protein Expression and Purification* 23:440-446
- Kim S, Lee SB. 2008. Soluble expression of archaeal proteins in *Escherichia coli* by using fusion-partners. *Protein Expr. Purif* 62:116-119.
- Kimizuka F, Taguchi Y, Ohdate Y, Kawase Y, Shimojo T, Hashino K, Kato I, Sekiguchi K, Titani K. 1991. Production and characterization of functional domains of human fibronectin expressed in *Escherichia coli*. *J Biochem* 110(2):284-91.

- Kinsey R, Williamson MR, Chaudhry S, Mellody KT, McGovern A, Takahashi S, Shuttleworth CA, Kielty CM. 2008. Fibrillin-1 microfibril deposition is dependent on fibronectin assembly. p 2696-2704.
- Kornblihtt AR, Pesce CG, Alonso CR, Cramer P, Srebrow A, Werbajh S, Muro AF. 1996. The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. *FASEB. J* 10:248-257.
- Kornblihtt AR, Umezawa K, Vibe-Pedersen K, Baralle FE. 1985. Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *Embo J* 4(7):1755-9.
- Kubitzki T, Noll T, Lutz S. 2008. Immobilisation of bovine enterokinase and application of the immobilized enzyme in fusion protein cleavage. *Bioprocess Biosyst Eng* 31(3):173-82.
- Kuo W-HK, Chase HA. 2011. A new strategy for the on-column exopeptidase cleavage of poly-histidine tagged proteins. *Journal of Chromatography B* 879(28):3028-3033.
- Kwak K-A, Kim Y-H, Kim M, Lee B-T, Song H-Y. 2013. Bio-functionalization of polycaprolactone infiltrated BCP scaffold with silicon and fibronectin enhances osteoblast activity in vitro. *Applied Surface Science* 279(0):13-22.
- Kweon H, Yoo MK, Park IK, Kim TH, Lee HC, Lee H-S, Oh J-S, Akaike T, Cho C-S. 2003. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials* 24(5):801-808.
- LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF, McCoy JM. 1993. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (NY)* 11:187-193.
- LeGeros JP, LeGeros RZ, Edwards B, Zitelli J, Burgess A. 1993. X-ray diffraction method for the quantitative characterization of calcium phosphate coatings. Parr EHAJE, editor. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- Lévesque J, Mantovani D. 2003 Les biomatériaux métalliques : de l'industrie à la salle d'opération. . Le Médecin du Québec
- Lewandowska K, Pergament E, Sukenik CN, Culp LA. 1992. Cell-Type- Specific adhesion mechanisms mediated by fibronectin adsorbed to chemically derivatized substrata. *Journal of Biomedical Materials Research* 26(10):1343-1363.
- Li Y. 2011. Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production. *Biotechnology Letters* 33(5):869-881.
- Liang S, Shen G, Xu X, Xu Y, Wei Y. 2009. Affinity Purification Combined with Mass Spectrometry-Based Proteomic Strategy to Study Mammalian Protein Complex and Protein-Protein Interactions. *Current Proteomics* 6(1):25-31.
- Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S. 2005. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification* 41(1):98-105.
- Lim Y-B, Han S-O, Kong H-U, Lee Y, Park J-S, Jeong B, Kim S. 2000. Biodegradable Polyester, Poly[ϵ -(4-Aminobutyl)-L-Glycolic Acid], as a Non-Toxic Gene Carrier. *Pharmaceutical Research* 17(7):811-816.
- Luo B-H, Carman CV, Springer TA. 2007. Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annu Rev Immunol* 25:619-647.
- Magnusson MK, Mosher DF. 1998. Fibronectin Structure, Assembly, and Cardiovascular Implications. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 18:1363-1370.
- Malhotra A. 2009. Tagging for protein expression. *Methods Enzymol* 463:239-58.
- Mao Y, Schwarzbauer JE. 2005. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biology* 24(6):389-399.
- Mardon HJ, Grant KE. 1994. The role of the ninth and tenth type III domains of human fibronectin in cell adhesion. *FEBS Lett* 340(3):197-201.
- markets ma. 2013. Biomaterials Market [By Products (Polymers, Metals, Ceramics, Natural Biomaterials) & Applications (Cardiovascular, Orthopedic, Dental, Plastic Surgery, Wound Healing, Tissue Engineering, Ophthalmology, Neurology Disorders)] – Global Forecasts to 2017. Dallas, Texas: market research company and consulting firm. Report nr BT 1556.

- Matsui T, Sato H, Yamamuro H, Misawa S, Shinzato N, Matsuda H, Takahashi J, Sato S. 2008. High cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* for hirudin variant 1 production. *J Biotechnol* 134(1-2):88-92.
- Miladi B, Bouallagui H, El. Dridi C, Marjou A, Di. Boeuf G, Martino P, Elm'selmi A. 2011. A new tagged-TEV protease: Construction, optimisation of production, purification and test activity. *Protein Expression and Purification* 75:75–82.
- Miladi B, Dridi C, El Marjou A, Boeuf G, Bouallagui H, Dufour F, Di Martino P, Elm'selmi A. 2013. An improved strategy for easy process monitoring and advanced purification of recombinant proteins. *Mol Biotechnol.* 55(3):227-35.
- Mitra A, Chakrabarti KS, Hameed MSS, Srinivas KV, Kumar GS, Sarma SP. 2005. High level expression of peptides and proteins using cytochrome b5 as a fusion host Protein Expression and Purification 41(1):84-97.
- Molpeceres J, Guzman M, Aberturas MR, Chacon M, Berges L. 1996. Application of central composite designs to the preparation of polycaprolactone nanoparticles by solvent displacement. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85(2):206-213.
- Mosher DF, Furcht LT. 1981. Fibronectin: Review of its Structure and possible Functions. *The journal of investigative dermatology* 77(2):175-180.
- Nakamura CE, Whited GM. 2003. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Current Opinion in Biotechnology* 14(5):454 - 459.
- Napier J, Smith M, Stobart A, Shewry P. 1995. Isolation of a cDNA encoding a cytochrome b5 specifically expressed in developing tobacco seeds. *Planta* 1(197):200-2.
- O'Brien FJ. 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* 14(3):88-95.
- Obara M, Kang MS, Rocher-Dufour S, Kornblihtt A, Thiery JP, Yamada KM. 1987. Expression of the cell-binding domain of human fibronectin in *E. coli*: Identification of sequences promoting full to minimal adhesive function. *FEBS Letters* 213(2):261-264.
- Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. 2014. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 9(18).
- Ozols J, Gerard C. 1977. Primary structure of the membranous segment of cytochrome b5. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74(9):3725-3729.
- Paleyanda RK, Velander WH, Lee TK, Scandella DH, Gwazdauskas FC, Knight JW, Hoyer LW, Drohan WN, Lubon H. 1997. Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nat Biotech* 15(10):971-975.
- Panavas T, Sanders C, Butt T. 2009. SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Methods Mol Biol* 497:303-17.
- Pankov R, Yamada KM. 2002. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115(20):3861-3.
- Patel NR, Gohil PP. 2012. A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering* Volume 2,(Issue 4):2250-2459.
- Patino MG, Neiders ME, Andreana S, Noble B, Cohen RE. 2002. Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. *J Oral Implantol* 28(5):220-5.
- Peisley AA, Gooley PR. 2007. High-level expression of a soluble and functional fibronectin type II domain from MMP-2 in the *Escherichia coli* cytoplasm for solution NMR studies. *Protein Expression and Purification* 53(1):124-131.
- Perler FB, Davis EO, Dean GE, Gimble FS, Jack WE, Neff N, Noren CJ, Thorner J, Belfort M. 1994. Protein splicing elements: inteins and exteins--a definition of terms and recommended nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 22(7):1125-1127.
- Petrie TAC, Jeffrey R. Reyes, Catherine D. Garcia, Andrés J. 2006. Integrin specificity and enhanced cellular activities associated with surfaces presenting a recombinant fibronectin fragment compared to RGD supports. *Biomaterials* 27(31):5459-5470.
- Phipps MC, Clem WC, Catledge SA, Xu Y, Hennessy KM, Thomas V, Jablonsky MJ, Chowdhury S, Stanishevsky AV, Vohra mail YK and others. 2011. Mesenchymal Stem Cell Responses to Bone-

- Mimetic Electrospun Matrices Composed of Polycaprolactone, Collagen I and Nanoparticulate Hydroxyapatite. *PLoS ONE* 6(2):16813.
- Plesniak LA, Mahalakshmi R, Rypien C, Yang Y, Racic J, Marassi FM. 2011. Expression, refolding, and initial structural characterization of the *Y. pestis* Ail outer membrane protein in lipids. *Biochim Biophys Acta* 1808(1):482-9.
- Porro D, Sauer M, Branduardi P, Mattanovich D. 2005. Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology* 31(3):245-259.
- Potts JR, Campbell ID. 1996. Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biology* 15(5):313-320.
- Rahmany MB, Van Dyke M. 2013. Biomimetic approaches to modulate cellular adhesion in biomaterials: A review *Acta Biomaterialia* 9:5431-5437.
- Raksakulthai R, Haard N. 2003. Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 43(4):401-45.
- Rezania A, Healy K. 1999. Biomimetic peptide surfaces that regulate adhesion, spreading, cytoskeletal organization, and mineralization of the matrix deposited by osteoblast-like cells. *. Biotechnol Prog.* 15(1):19-32.
- Rezania A, Healy K. 1999 Biomimetic peptide surfaces that regulate adhesion, spreading, cytoskeletal organization, and mineralization of the matrix deposited by osteoblast-like cells. *Biotechnol Prog.* 15((1)):19-32.
- Romberger DJ. 1997. Fibronectin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29(7):939-943.
- Roy DC, Wilke-Mounts SJ, Hocking DC. 2010. Chimeric fibronectin matrix mimetic as a functional growth- and migration-promoting adhesive substrate. *Biomaterials* 32(8):2077-87.
- Rücker E, Schneider G, Steinhäuser K, Löwer R, Hauber J, Stauber R. 2001. Rapid evaluation and optimization of recombinant protein production using GFP tagging. *Protein Expr Purif* 21(1):220-3.
- Ruoslahti E, Pierschbacher M. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and Integrins. *Science* 238(4826):491-497.
- Schmidt R, Healy K. 2013. Effect of avidin-like proteins and biotin modification on mesenchymal stem cell adhesion. *Biomaterials* 34(15):3758-62.
- Schwarzbauer JE. 1991. Fibronectin: from gene to protein. *Current Opinion in Cell Biology* 3(5):786-791.
- Sharma SS, Chong S, Harcum SW. 2006. Intein-mediated protein purification of fusion proteins expressed under high-cell density conditions in *E. coli*. *Journal of Biotechnology* 125:48-56.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. 1962. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59 (3):223-240.
- Sørensen HP, Mortensen KK. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115(2):113-128.
- Stevens MM. 2008. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today* 11(5):18-25.
- Stoop R. 2008. Smart biomaterials for tissue engineering of cartilage. *Injury* 39(1, Supplement):77-87.
- Takashi Y, Chie Kanei-Ishii, Toshio Maekawa, Jiro Fujimoto, Tadashi Yamamoto, and Shunsuke Ishi. 1995. Increase of Solubility of Foreign Proteins in *Escherichia coli* by Coproduction of the Bacterial Thioredoxin. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 270(43):25328 -25331.
- Terpe K. 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:523-533
DOI 10.1007/.
- To WS, Midwood KS. 2011. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 4:21.

- Tomomi A, Yoichi S, Masahiro M, Fusako T, Hiroshi H, Motonari T. 2010. Direct electrochemical analyses of human cytochromes b5 with a mutated heme pocket showed a good correlation between their midpoint and half wave potentials. *J Biomed Sci.* 17(1):90.
- Tsien RY. 1998. The green fluorescent protein *Annu. Rev. Biochem.* 67:509-44.
- Underwood P, Bennett F. 1989. A comparison of the biological activities of the cell-adhesive proteins vitronectin and fibronectin. *J Cell Sci* 93(4):641-9.
- van Wachem P, van Luyn M, Olde Damink L, Dijkstra P, Feijen J, Nieuwenhuis P. 1994. Biocompatibility and tissue regenerating capacity of crosslinked dermal sheep collagen. *J Biomed Mater Res.* 28(3):353-63.
- Vasita R, Shanmugam IK, Katt D. 2008. Improved biomaterials for tissue engineering applications: surface modification of polymers. *Curr Top Med Chem.* 8(4):341-53.
- Vavrova L, Muchova K, Barak I. 2010. Comparison of different *Bacillus subtilis* expression systems. *Research in Microbiology* xx:1-7.
- Ventini DC, Damiani R, Sousa AP, de Oliveira JE, Peroni CN, Ribela MT, Bartolini P, Tonso A, Soares CR, Pereira CA. 2010. Improved bioprocess with CHO-hTSH cells on higher microcarrier concentration provides higher overall biomass and productivity for rhTSH. *Appl Biochem Biotechnol* 164(4):401-9.
- Vibe-Pedersen K, Kornblihtt AR, Baralle FE. 1984. Expression of a human alpha-globin/fibronectin gene hybrid generates two mRNAs by alternative splicing. *EMBO J.* 3(11):2511-2516.
- Waugh D. 2005. Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol* 23(6):316-20.
- Wong BS. 2012. Porous Polycaprolactone Scaffold as Targeted Drug Delivery System and Cell Attachment Platform. National Undergraduate Research Opportunities Programme (NUROP) Congress. Singapore.
- Wu S-C, Wong S-L. 2013. Structure-Guided Design of an Engineered Streptavidin with Reusability to Purify Streptavidin-Binding Peptide Tagged Proteins or Biotinylated Proteins *PLOS ONE* 8(7):69530.
- Xu J, Mosher D. 2011. Fibronectin and Other Adhesive Glycoproteins. Springer:426.
- Yamada KM. 2000. Fibronectin peptides in cell migration and wound repair. *The Journal of Clinical Investigation* 105(11):1507-1509.
- Yewdell J, Bennink J. 2001. Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol* 13:13-8.
- Yin J, Lin JH, Li WT, Wang DIC. 2003. Evaluation of different promoters and host strains for the high-level expression of collagen-like polymer in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol* 100:181-191.
- Zhang Y, Xiang Q, Dong S, Li C, Zhou Y. 2010. Fabrication and characterization of a recombinant fibronectin/cadherin bio-inspired ceramic surface and its influence on adhesion and ossification in vitro. *Acta Biomaterialia* 6(3):776-785.
- Zhao X, Li G, Liang S. 2013. Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2013:8.