

UNIVERSITE PARIS XIII

Laboratoire de Biomatériaux et Polymères de Spécialité (Institut Galilée)
Laboratoire de recherches Orthopédiques (Faculté de médecine Lariboisière)

Année 2010

THESE

Provisoire

Pour l'obtention du
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XIII

Discipline : **Sciences de l'Ingénieur**
Spécialité : **Génie Biologique et Médical**

Présentée et soutenue publiquement le 08/07/2010 par

Anas ALCHEIKH

**Réponse des ostéoblastes sur des surfaces en titane
modifiées par greffage des groupements ioniques
pour des applications cliniques en odontologie
(Chirurgie, orthodontie et implantologie)**

JURY

- | | |
|--|--------------------|
| • Mr. Pascal COLLIN | Rapporteurs |
| • Mr. Assem SOUEIDAN | Rapporteurs |
| • Mme. Véronique MIGONNEY | Examineurs |
| • Mr. Gérard HELARY | Examineurs |
| • Mme. Delphine LOGEART-AVRAMOGLU | Examineurs |
| • Mme. Fani ANAGNOSTOU | Examineurs |

J'adresse mes remerciements à mon cher pays, la Syrie, qui m'a financé mon séjour en France et permis d'effectuer ce travail.

A mes très chers parents, merci pour votre patience et votre soutien. Je vous souhaite une longue vie en bonne santé, et pleine de bonheur.

A mes sœurs et mes frères, je vous souhaite une vie pleine de succès et de bonheur.

A ma femme, merci de m'avoir aidée et soutenue tout au long de ce travail.

Et enfin à notre petit fils Jade, qui illumine nos journées avec ses sourires....

Remerciements

Je tiens tout d'abord à rendre hommage à **Monsieur le Professeur Michel DEGRANGE** qui avait gentiment accepté d'être rapporteur de ce travail mais qui nous a subitement quitté le mois d'avril. A titre posthume, je tiens à le remercier de sa gentillesse à mon égard.

Je voudrai aussi exprimer toute ma gratitude à **Madame le Docteur Anagnostou Fani** qui a dirigé cette thèse dans la continuité de mon stage de DEA. Je la remercie de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet et pour son aide permanente tant au niveau scientifique que personnel.

Madame le Professeur Véronique MIGONNEY

Vous nous avez accueilli dans votre laboratoire et nous avez fait l'honneur d'avoir accepté de faire partie du jury. Recevez ici les marques de notre profond respect et de notre gratitude.

Monsieur le Professeur Pascal COLLIN

Vous nous avez fait l'honneur, malgré vous nombreuses obligations universitaires, d'avoir accepté de rapporter ce travail. Recevez ici les marques de notre respect et de notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Assem SOUEIDAN

Vous nous avez fait l'honneur d'avoir accepté de rapporter ce travail malgré vous nombreuses obligations universitaires. Recevez ici les marques de notre respect et de notre profonde gratitude.

Monsieur le Docteur Gérard HELARY

Vous nous avez fait l'honneur d'avoir accepté de faire partie du jury. Vos conseils et votre gentillesse ont accompagné notre parcours. Recevez ici les marques de notre respect et de notre profonde gratitude.

Madame le Docteur Delphine LOGEART-AVRAMOGLOU

Vous nous avez fait l'honneur d'avoir accepté de faire partie du jury. Recevez ici les marques de notre respect et de notre profonde gratitude.

J'exprime toute ma reconnaissance au **Monsieur le Professeur Laurent SEDEL** et **Monsieur le Docteur Hervé PETITE**, respectivement ancien et actuel Directeur du Laboratoire de Recherches Orthopédiques, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je tiens également à remercier **Madame le Docteur Graciela PAVON-DJAVID**, pour son implication dans ce travail et pour les discussions enrichissantes que nous avons échangées.

Madame le Professeur Rena BIZIOS

We wish to send our special thanks to Professeur Rena BIZIOS, for her invaluable help.

Monsieur le Docteur Morad BENSIDHOUM

Vos précieux conseils nous ont souvent sorti de l'ornière, et vos compétences multiples ont souvent été mises à contribution. Recevez ici nos sincères remerciements.

Merci à **Messieurs Jean Emmanuel SOFFER** et **Mickael DESCHEPPER** pour avoir relu ce manuscrit attentivement afin d'en chasser les fautes d'orthographe malicieuses et autres étourderies qui se cachaient à mes yeux.

Je remercie tous les membres du Laboratoire de Biomatériaux et Polymères de Spécialité (Institut Galilée) et Laboratoire de recherches Orthopédiques.

Résumé

Le titane est un matériau de choix pour des applications orthopédiques et dentaires. Afin de conférer aux surfaces de titane des propriétés antibactériennes et améliorer son potentiel d'ostéointégration l'équipe de LBPS a proposé la fonctionnalisation par greffage de polymères « bioactifs ». Notre travail s'intègre dans cette thématique ; Nous avons étudié à la fois l'adhérence de *S. aureus* et la réponse des ostéoblastes sur des surfaces de titane greffées de poly(styrène sulfonate de sodium) polyNaSS. Les surfaces en titane bioactives ont été réalisées par greffage de polyNaSS obtenues par copolymérisation radicalaire. Trois types de surface en titane ont été utilisées pour les tests biologiques : titane non modifié, titane oxydé, titane greffé. L'adhérence bactérienne a été étudiée sur les surfaces de titane greffées et non greffées, pré-adsorbées ou non de protéines plasmatiques. Le comptage des bactéries était suivi par marquage des bactéries à la fluorescéine puis quantification par analyse d'images. En effet, nous avons montré que la modification des surfaces de titane par greffage d'un polymère « bioactif » tel que le poly(styrène sulfonate de sodium) permet d'inhiber (> 70 %) l'adhérence de *S. aureus*. Cette propriété inhibitrice implique probablement la quantité et/ou la conformation des protéines adsorbées qui sont susceptibles de médier l'adhérence bactérienne. Parallèlement, nous avons exploré la réponse ostéoblastique à l'aide de cellules de calvaria de fœtus de rat en culture. Les résultats ont montré que le greffage de poly(styrène sulfonate de sodium) n'altère pas le nombre de cellules adhérentes sur le titane, ni leur morphologie. Il n'interfère pas non plus avec la prolifération, comme l'atteste la cinétique de la prolifération des cellules similaire sur les trois surfaces testées. En revanche, l'activité spécifique de la phosphatase alcaline sur la surface greffée est significativement supérieure ($p < 0,01$) à celles observées sur les surfaces contrôles. Les nodules de minéralisation ont été visibles sur les trois surfaces de titane testées. Toutefois, la somme des aires de la surface sur le titane greffé était significativement ($p < 0,05$) supérieure à celle observée sur la surface de titane oxydé et non modifié. En conclusion, le greffage de surfaces en titane avec ces polymères bioactifs sulfonates d'une part inhibe l'adhésion de *S. aureus* et d'autre part non seulement n'interfère pas avec l'adhésion et la prolifération mais stimule la différenciation des cellules ostéoblastiques. Ces surfaces pourraient donc être intéressantes en application clinique pour les revêtements des implants en particulier dans le domaine de l'orthopédie afin de prévenir les infections peri-implantaires.

Mots clés

Titane greffé, PolyNaSS, Polymères Bioactives, Ostéoblaste, Calvaria, Adhérence Bactérienne, Staphylocoque Aureus, Infection Peri-implantaire.

Sommaire

ABREVIATIONS	10
1. INTRODUCTION	11
2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	18
2.1. Biomatériaux	18
2.2. Le Titane	25
2.3. Modifications de surfaces en titane et en alliages de titane pour des applications bio-médicales	28
2.4. Colonisation des surfaces des biomatériaux par des bactéries.....	31
2.4.1. <i>Adsorption des protéines sur les surfaces des biomatériaux</i>	<i>32</i>
2.4.2. <i>L'adhésion des bactéries sur les surfaces de biomatériaux.....</i>	<i>33</i>
2.4.3. <i>La formation du biofilm.....</i>	<i>34</i>
2.5. Modification de surface en Titane proposée pour éviter l'infection bactérienne	35
2.6. Interface Os-Implant	39
2.7. Les influences des modifications de la surface en titane sur la réponse ostéoblastique	41
2.7.1. <i>Modèles des cultures utilisés pour l'étude de la réponse des</i>	

<i>ostéoblastes sur des matériaux in vitro</i>	44
2.7.2. Caractéristiques de surface et fonctions ostéoblastiques	45
2.7.2.1. L'adhésion ostéoblastique.....	45
2.7.2.2. La prolifération ostéoblastique.....	48
2.7.2.3. La différenciation ostéoblastique	50
2.8. Objectifs de l'étude	52
3. MATERIELS ET METHODES	54
3.1.Préparation des carrés de titanes greffés avec de polymères bioactifs 54	
3.1.1. <i>Greffage par polymérisation radicalaire</i>	54
3.1.1.1. Préparation de la surface.....	55
3.1.1.2. Greffage et polymérisation	56
3.1.1.3. Caractérisation des surfaces greffées.....	57
3.1.1.3.1. Dosage colorimétrique au Bleu Toluidine (BT).....	57
1) Principe.....	57
2) Protocole de coloration et de dosage.....	58
3.1.1.3.2. Spectroscopie Infrarouge a Transformée de Fourier (IRTF)	59
1) Principe.....	59
3.1.2. <i>Conditionnement et conservation</i>	67
3.2.L'adhérence bactérienne avec coloration à l'iodure de propidium	67
3.2.1. <i>Préparation des suspensions bactériennes</i>	67
3.2.2. <i>Ensemencement des bactéries sur les carrés de titane</i>	68
3.2.3. <i>Coloration au iodure propidium et comptage des bactéries sur les surfaces de titane</i>	68

3.3.Culture cellulaire de Calvaria de fœtus de rat	69
3.3.1. <i>Prélèvement</i>	69
3.3.2. <i>Culture primaire</i>	69
3.3.3. <i>Culture secondaire</i>	70
3.3.4. <i>Culture sur les carres de titane</i>	70
3.3.5. <i>Culture avec la présence de polyNaSS dans le milieu</i>	71
1) La dialyse	71
2) Caractérisation de polymère.....	72
3) Préparation de polymère pour les manipulations	73
3.3.6. <i>Récupération des extraits cellulaire (extraction d'ADN)</i>	73
3.4.Etude de l'adhérence cellulaire	74
3.4.1. <i>Comptage</i>	74
3.4.2. <i>Comptage et morphologie : Coloration de l'actine</i>	75
3.4.3. <i>Morphologie : observation au Microscopie électronique à balayage</i> <i>MEB</i>	76
1) Principe	76
2) Protocole de préparation des échantillons.....	77
3.5.Etude de la prolifération cellulaire	77
3.5.1. <i>Quantification de l'ADN</i>	77
3.6.Etude de la différenciation cellulaire	78
3.6.1. <i>Mesure de l'activité phosphatase alcaline</i>	78
3.6.2. <i>Mise en évidence des nodules de minéralisation</i>	79
3.6.3. <i>Dosage des protéines totales</i>	79
3.6.4. <i>Quantification de collagène</i>	80

4. RESULTATS	81
4.1. Greffage de polymère polyNaSS.....	81
4.2. Caractérisation des surfaces de titane greffées.....	81
4.2.1. <i>Dosage colorimétrique au bleu toluidine (BT).....</i>	81
4.2.2. <i>Spectroscopie infrarouge a transformée de Fourier (IRTF).....</i>	82
4.3. L'Adhérence bactérienne avec coloration à l'Iodure de propidium	84
4.4. Les comportements cellulaires sur des surfaces greffées avec polyNaSS.....	85
4.4.1. <i>Adhésion des cellules de calvaria de fœtus de rat fœtal sur les différentes surfaces en titane</i>	85
4.4.1.1. Comptage des cellules adhérentes.....	85
4.4.1.2. Morphologie : observation en Microscopie électronique à balayage MEB.	88
4.4.1.3. Morphologie : Coloration de l'actine	91
4.4.2. <i>Prolifération des cellules de calvaria de rat sur les différentes surfaces en titane</i>	97
4.4.3. <i>Différenciation des cellules de calvaria de fœtus de rat sur les différentes surfaces en titane</i>	99
4.4.3.1. Activité phosphatase alcaline.....	99
4.4.3.2. Formation des nodules de minéralisation	101
4.4.3.3. Quantification de collagène	104
4.5. Effet du polyNaSS sous forme soluble sur le comportement des cellules de calvaria de rat sur des surfaces en titane.....	106
4.5.1. <i>Adhésion.....</i>	106
4.5.1.1. Comptage	106

4.5.2. Prolifération des cellules de calvaria de rat avec la présence de polyNaSS dans le milieu	108
4.5.3. Différenciation des cellules de calvaria de rat avec la présence de polyNaSS dans le milieu	110
4.5.3.1. Activité phosphatase alcaline.....	110
5. DISCUSSION.....	112
6. CONCLUSION.....	121
BIBLIOGRAPHIE	122
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	130

Abréviations

AMP : (2-amino-2-méthyl- 1 -propanol 10mM, paranitrophénylphosphate 20 mM, MgCl₂ 2mM, H₂O distillée, pH 10)

ATB : Solution Antibiotique (50 UI/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine)

ALP : Activité de la phosphatase alcaline

β-GP : β-GlycéroPhosphate

BMP-2 : Protéine Morphogénétique Osseuse

BSP : Bone Sialo-Protein

β-TCP : Béta-phosphate tricalique

DMEM : Dulbecco Modified Eagle Medium

HAP : Hydroxyapatite

MC3T3-E1 : Lignée cellulaire qui dérive de la calvaria de nouveau-né de souris

MG-63 : Référencées CRL-1427 à l'American type Culture collection dérivant d'un ostéosarcome humain (donneur de 14 ans)

MHB : Milieu de culture (Muller Hinton Broth)

NaSS : Styrène Sulfonate de Sodium

PBS: Tampon Phosphate (Phosphate Buffered Saline)

PIA : Adhésine Polysaccharidique Intercellulaire

PMMA : Poly(méthacrylate de méthyle).

PS/A : Adhésine Polysaccharidique Capsulaire

RGD : Arginine-Glycine-Aspartate (Arg-Gly-Asp)

rhTGF-β1: Recombinant human Transforming Growth Factor-β1

Saos-2 : Référencée HTB-85 à l'American Type Culture Collection dérivant d'un ostéosarcome humain (donneur de 11 ans)

SVF : Sérum de Veau Fœtal

1. Introduction

Que ce soit Biomatériaux ou Biocompatibilité, l'amplitude des domaines situés derrière ces vocables n'a d'égale que leur diversité interne. Il en résulte que les verrous et les défis technologiques sont de taille, notamment dans les domaines qui mettant en jeu des biomatériaux implantables définitivement, résorbables à fonctionnalité limitée dans le temps, ou pour la délivrance locale de principes actifs (antibiotiques, hormones, gènes), voire hybrides, pour bénéficier de l'activité de cellules étrangères. Un des obstacles le plus rencontré, résumé par le mot "biocompatibilité", est l'existence de difficultés liées à la présence d'une interface entre les biomatériaux utilisés et les tissus de l'hôte.

Depuis toujours, la stratégie du thérapeute a été de tester le potentiel thérapeutique et de composer ou matériaux nouveaux. Cette stratégie a conduit à des succès importants qui sont largement exploités de nos jours et sont à la base des exploits de la chirurgie moderne. Pendant longtemps, la biocompatibilité a été recherchée sous la forme d'un minimum d'interactions avec les tissus avoisinants et de leurs réactions. C'est généralement ce qui est recherché pour les systèmes prothétiques à usage de remplacement définitif (**C. Janot et L. Sedel Cahier de synthèse du CNRS., 2000**).

De nouvelles stratégies font actuellement l'objet de prospections importantes. Elles reposent toutes sur les interactions entre la matière artificielle (alliages, céramiques, polymères) et les milieux vivants (molécules, tissus, cellules, organes) et visent une intégration dans (ou un remplacement) par les tissus naturels. Ces stratégies chirurgicales et/ou pharmacologiques reposent en général sur l'aptitude d'un organisme vivant à s'autoréparer.

La notion de « biomatériaux » est entièrement contenue dans le nécessaire pris en compte du contact de ces matériaux avec des tissus ou fluides vivants. Cet aspect de contact, qui est évident dans le cas d'implants.

En relation directe avec l'aspect « contact », la notion de biocompatibilité est essentielle dans le domaine des biomatériaux. Soit, classiquement, biocompatibilité "négative", définie par les propriétés que le matériau ne doit pas avoir (pas de réaction inflammatoire, pas de toxicité, ...), soit, à la suite d'une évolution plus récente, biocompatibilité élargie (et si possible mesurable), définie comme "la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse de l'hôte appropriée dans une application spécifique". Cette biocompatibilité "élargie" débouche sur la notion très actuelle de "bioactivité", par laquelle l'on souhaite que le matériau ne soit pas nécessairement le plus inerte possible, mais au contraire fasse réagir le tissu vivant. C'est par exemple les matériaux ostéoconducteurs qui facilitent la croissance osseuse.

Par essence pluridisciplinaire, le domaine des biomatériaux recouvre le champ du handicap sous toutes ses formes. Dans une première vision, "verticale", définie par les pathologies concernées, le domaine inclut les systèmes artificiels, implantables ou au moins au contact d'une muqueuse, visant à suppléer une fonction défaillante.

On peut dire que quatre grandes catégories de biomatériaux peuvent être utilisées :

- les métaux et alliages métalliques
- les céramiques au sens large
- les polymères et la matière "molle"
- les matériaux d'origine naturelle.

Par comparaison aux autres matériaux, métalliques ou non - métalliques, et au regard des différents critères de biofonctionnalité, le titane et les alliages de titane représentent des

biomatériaux de choix. En effet, leurs propriétés, aussi bien mécaniques que biologiques, justifient l'intérêt du monde chirurgical, et scientifique. Ces dernières années, l'utilisation des implants pour la réadaptation fonctionnelle complète ou partielle (prothèses articulaires, implants dentaires) a connu un progrès significatif. L'implantation d'une surface métallique dans un site osseux engendre une multitude d'évènements à l'interface os-implant qui sont cruciaux pour la biointégration de la prothèse. En effet, une des principales causes d'échec est le descellement par décohésion de l'interface os-implant, due à une destruction progressive des tissus biologiques au contact de la prothèse ; Cette destruction est liée à l'évolution d'une zone fibreuse autour de l'implant. Lorsqu'un contact intime os-implant est obtenu, on parle d' "ostéointégration" de la prothèse, ce terme se réfère à l'incorporation d'un implant dans l'os et à l'absence de tissu fibreux à son interface.

L'ostéointégration d'un implant dépend de nombreux facteurs, d'une part les propriétés physico-chimiques de la surface, incluant sa composition chimique, son énergie, sa topographie, sa rugosité (**Puleo et al., 1999**) et d'autre part des facteurs extrinsèques, comme la technique chirurgicale et la réponse de l'hôte. L'adhésion cellulaire initiale au matériau semble être dépendante de plusieurs facteurs dont la topographie de sa surface, sa stabilité, sa mouillabilité, son énergie de surface. Par ailleurs la mouillabilité et l'énergie de surface influencent l'adsorption des protéines sur lesquelles les cellules s'attachent.

Plusieurs approches des modifications de surface ont été proposées pour améliorer l'ostéointégration des implants en titane.

- Modifications topographiques (surfaces lisses, sablées, mordancées, plasma-spray et la surface modifiée par l'hydroxyapatite) (**Knabe et al. 2004 ; Wieland et al., 2005**).
- Modifications chimiques obtenues par modifications de la mouillabilité et de la composition atomique (**MacDonald et al., 2004**).

- Modifications biochimiques obtenues par implantation des molécules comme les facteurs de croissance BMP-2 (protéine morphogénétique osseuse) (**Seol et al., 2006 ; Becker et al., 2006**) ou des peptides RGD à la surface (**Kroese-Deutman et al., 2005 ; Rammelt et al., 2006**).

En plus du problème posé par la repousse de l'os au contact de l'implant se pose le problème de l'infection du matériel implanté. L'infection des implants en titane utilisés en chirurgie orthopédique et en odontologie amène à un échec thérapeutique, morbidité, perte de fonction, ou amputation. Les bactéries prolifèrent et s'organisent sous forme de biofilm résistant souvent à l'antibiothérapie. Plusieurs approches ont été proposées pour prévenir le risque d'infection sur les prothèses ostéoarticulaires. Pour éviter les infections plusieurs approches ont été proposées, il a été envisagé de libérer des antibiotiques localement (**Luke et al., 2003**), ou de modifier la surface implantaire en utilisant des ions de chlore (**Shibata et al., 2004**). Une autre approche consistait à rendre hydrophiles les surfaces pour diminuer l'adsorption des protéines plasmatiques qui peuvent servir de substrat à l'adhésion bactérienne (**Desai et al., 1992**). Sur les surfaces en titane des modifications chimiques de la surface avec des ions d'argent et de cuivre (**Wan et al., 2007 I ; Wan et al., 2007 II**), ou l'incorporation d'oxyde de zinc (**Petrini et al., 2006**) ont été proposées.

Pour prévenir l'infection en site osseux, des surfaces composites pourraient être réalisées, alliant le polymère bioactif antibactérien à un alliage métallique. En effet ce projet a été développé par le Laboratoire de Biomateriaux et Polymères de Spécialité (LPBS). Il est né à partir de l'idée qu'il est possible de modifier des matériaux existant par greffage de groupements chimiques proches des ceux portés par des molécules naturelle (OSO_3^- , $-\text{NSO}_3^-$, COO^-), de façon à mimer ces molécules et ainsi de créer des sites d'interaction capables d'être

reconnus par les systèmes vivant. Une étude approfondie réalisée par l'équipe de Professeur **V. Migonney** a montré qu'il était possible de préparer un polymère bioactif portant des groupements chimiques, qui inhibent l'adhésion de Staphylocoque doré (*S. aureus*), les groupements chimiques utilisés sont les radicaux sulfonates et carboxylates. Certains copolymères à la base de poly(méthacrylate de méthyle), obtenus par polymérisation radicalaire de monomères porteurs de groupements sulfonates et carboxylates diminuent l'adhésion du *S. aureus in vitro* (**Berlot et al., 2002**). L'originalité de ces copolymères réside dans leur capacité à modifier certaines fonctions des bactéries en induisant des interactions spécifiques avec les protéines d'adhésion. Ces groupements sont capables d'inhiber l'adhésion de différentes souches bactériennes (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*). D'après des études *in vitro*, l'inhibition de l'adhésion du *S. aureus* sur les copolymères varie en fonction de la composition en sulfonate/carboxylate, et peut atteindre 90% (**Berlot et al., 2002**). Des résultats récents d'études *in vivo* sur un modèle d'infection chez le lapin, montrent que des prothèses en silicone greffées de polymères bioactifs diminuent l'adhésion de *S. aureus* de façon significative (**Creminieux et al., 2003**).

Le travail de ma thèse s'intègre donc dans cette thématique développée au LBPS par **Pr. Migonney V** qui vise la mise au point de surfaces de titane réalisées par greffage de polymères bioactifs polyNaSS (styrène sulfonate de sodium). En effet, il s'agit des surfaces de titane commercialement pur, greffées avec de polyNaSS, pour les rendre à la fois capable de prévenir l'infection, et compatible avec le tissu osseux.

Pour se faire, les surfaces en titane sont oxydées dans un mélange d'acide sulfurique et de peroxyde d'hydrogène. L'acide sulfurique attaque chimiquement la surface en enlevant la couche d'oxyde natif, qui se forme spontanément lorsque le titane est exposé à l'air libre, le

peroxyde d'hydrogène, quant à lui, va permettre de créer des hydroperoxydes de titane à la surface du matériau (ces entités seront des donneurs de radicaux libres). Les surfaces en titane sont ensuite mis au contact d'une solution de polyNaSS et chauffées, cette élévation de la température provoque la rupture homolytique de la liaison peroxyde (O-O) et donne des radicaux libres. Ces radicaux servent à amorcer la polymérisation radicalaire des monomères vinyliques polyNaSS.

Il a été démontré que les groupements sulfonate/carboxylate des polymères bioactives à la base de PMMA sont susceptibles, de modifier non seulement l'adhésion bactérienne mais aussi l'adhésion et la prolifération des cellules eucaryotes telles que les cellules épithéliales (**Latz et al., 2003**), et les fibroblastes (**El Khadali et al., 2002 ; Anagnostou et al., 2006**). Donc il était important de caractériser le comportement ostéoblastique (l'adhésion cellulaire, prolifération et /ou différenciation cellulaire de ces surfaces bioactives). Ainsi, parallèlement à l'étude de l'adhésion de *S. aureus* nous avons exploré l'effet des polyNaSS greffés sur des surfaces en titane commercialement pur sur le comportement de cellules osseuses.

Pour cette étude le modèle de culture de calvaria de fœtus de rat de 18 jours a été choisi. Ce modèle permet d'étudier en culture la différenciation cellulaire menant à la minéralisation. Les cellules cultivées en présence de la vitamine C et de β -glycérophosphate expriment le collagène de type I, l'ostéocalcine, la phosphatase alcaline et forment des nodules de minéralisation (**Anagnostou et al., 1996**).

Ce travail, a été réalisé au seins de deux laboratoires (LRO et LPBS), comporte trois parties :

- I. Obtention d'une matériau spécifique : Synthèse des surfaces bioactives réalisées par greffage de polyNaSS obtenues par copolymérisation radicalaire et leur caractérisation.
- II. Analyse de la propriété antibactérienne : Etude de l'adhésion de *S. aureus* sur des surfaces bioactives greffées par polyNaSS.
- III. Analyse *in vitro* la biocompatibilité : Etude *in vitro* de la réponse des ostéoblastes de calvaria de fœtus de rat sur des surfaces bioactives de titane greffées par polyNaSS.

2. Revue Bibliographique

2.1. Biomatériaux

Les biomatériaux représentent des enjeux économiques et sociaux importants si l'on se réfère, au marché mondial estimé à plus de 25 milliards d'euros par an et 1,295 milliards d'euros en France (**Bio SantéInfo N°6, 2007**) (avec un taux de croissance annuel estimé à 12%) (**Tableau 1**).

<i>Chiffres 2005</i>	Estimation monde (M€)	Estimation France (M€)
Implants pour la chirurgie orthopédique	12 500	700
Implants pour la chirurgie des tissus mous (hors stents et implants actifs)	5 000	250
Stents	5 000	185
Implants actifs	3 400	160
TOTAL	25 900	1 295

Tableau 1 : Evaluation du marché mondial/français des implants (Bio SantéInfo N°6, 2007)

À la population concernée (**Tableau 2**). En effet, leurs champs d'applications sont nombreux: ophtalmologie, odontologie, chirurgie orthopédique, chirurgie cardio-vasculaire, et sont appelés à se développer du fait, en particulier, de l'allongement de la durée de vie et de l'exigence de plus en plus grand d'une bonne qualité de vie.

Application	Population concernée
Prothèses de hanche	80 000
Prothèses de genou	30 000
Hémodialyses	15 000
Valves cardiaques	9 000
Prothèses vasculaires	15 000
Stimulateurs cardiaques	40 000
Lentilles de contact	1 200 000
Implants oculaires	140 000

Tableau 2 : Applications des biomatériaux en France par année.

C. Janot et L. Sedel : Les Biomatériaux. Cahier de synthèse du CNRS (2000)

Qu'appelle-t-on biomatériaux? La conférence de Chester de la Société Européenne des Biomateriaux (**Williams et al., 1988**) a, en 1986, retenu la définition suivante: « Matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical destinés à interagir avec les systèmes biologiques ». Au-delà de toute définition formelle, la notion de biomatériaux est entièrement contenue dans la prise en compte du contact de ces matériaux avec des tissus ou fluides chez le vivant. Cet aspect de contact, qui est évident dans le cas d'implants, doit être étendu aux contacts intervenant à la surface ou à l'extérieur du corps comme ceux, par exemple, qui se produisent avec le sang dans l'hémodialyse ou avec la cornée dans les lentilles de contact.

Inhérente à l'aspect de contact, la notion de biocompatibilité est essentielle dans le domaine des biomatériaux. De manière simple, la biocompatibilité peut être définie comme la compatibilité entre un système technique et un système biologique. Un matériau

biocompatible est un matériau ayant la capacité de remplir sa fonction avec une réponse appropriée de l'hôte receveur pour une application spécifique.

Les différentes classes de biomatériaux utilisés sont :

- Matériaux biotolérés : induisent une interposition fibreuse entre l'os et l'implant, et ne peuvent être retenus dans les processus d'ostéointégration.
- Matériaux bioinertes : céramiques d'alumine, le titane.
- Matériaux bioactifs : entraînent une liaison chimique os-implant (appelée biointégration), par exemple l'hydroxyapatite.

Mise en forme : Puces et numéros

On peut dire que quatre grandes catégories de biomatériaux peuvent être utilisées :

a) Les céramiques : Les céramiques se caractérisent par une température de fusion élevée et un comportement fragile, qui déterminent leurs domaines d'application. Elles incluent des oxydes, des sulfures, des borures, des nitrures, des carbures, des composés intermétalliques, ...

Dans le domaine des biomatériaux, on rencontre principalement l'alumine et la zirconie utilisées dans les têtes de prothèses de hanche, ainsi qu'en odontologie pour les implants dentaires. Il faut signaler tout particulièrement les utilisations et les développements de deux céramiques à base de phosphate de calcium : l'hydroxyapatite (HAP) et le phosphate tricalcique (β -TCP). En effet, ces matériaux présentent l'avantage d'être β -ostéoconducteurs, c'est-à-dire de favoriser la repousse osseuse au contact et la colonisation par le tissu osseux ; 65 % de la matière constituant le tissu osseux est par ailleurs une forme de phosphate tricalcique dont la formule chimique s'apparente à l'hydroxyapatite, mais dont l'agencement spatial en diffère notablement puisque des cristaux d'hydroxyapatite y sont accolés à des fibres de collagène. En outre, l'HAP poreuse et les céramiques à base de TCP sont biorésorbables. Le principal problème avec l'HAP est d'arriver à synthétiser une HAP ayant juste la bonne taille de pores pour que la colonisation se fasse bien. On trouve donc des

utilisations de l'HAP dans les implants et matériaux de comblement dentaires et dans la chirurgie orthopédique. Des vaisseaux artificiels à base d'HAP frittées ont même été élaborés. On peut ajouter à cette catégorie de matériaux, bien qu'ils s'en distinguent par maints aspects, les bioverres de Hench, qui assurent un accrochage de type quasichimique avec le tissu osseux. Les principaux problèmes mal résolus avec les céramiques sont :

- les mécanismes de dégradation
- la durabilité
- la résistance à la fracture
- l'activité de surface
- l'adhésion des protéines ou des cellules en surface.

En ce qui concerne des questions sur les céramiques biorésorbables: La mesure et le contrôle de la biorésorption et l'effet sur le tissu local, la calcification, la connaissance des effets des enzymes sur la dégradation et les effets sur la cicatrisation et la formation de l'os se posent.

b) les polymères: Les utilisations des polymères dans le domaine des biomatériaux sont extrêmement nombreuses. On distingue les polymères fonctionnels et les polymères résorbables.

1. **les polymères fonctionnels**, c'est-à-dire susceptibles d'avoir une fonction chimique particulière à l'interface matériau-tissu vivant, à savoir par exemple la capacité d'interaction avec les ostéoblastes (et/ou les fibroblastes) qui favorise la repousse osseuse ou ligamentaire. Ceci est envisagé par la fixation sur le polymère de groupements ionisés tels que orthophosphate, carbonate, carboxylate, etc. La "fonctionnalité" peut notamment être obtenue par la modification de l'état de surface du polymère par implantation ionique ou par greffage.
2. **les polymères résorbables** tels que les copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique qui sont utilisables en chirurgie orthopédique traumatologique. Les principaux problèmes mal

résolus avec les polymères actuellement mis en oeuvre ne concernent pas que la biocompatibilité à l'interface matériau- tissu. Par exemple, pour les polymères non résorbables on peut citer :

- instabilité au rayonnement gamma
- réactivité à certains types de médicaments
- stabilité hydrolytique
- manque de standards.

Pour les polymères biorésorbables on a de même :

- manque de mesures de dégradation et de biorésorption
- effets biologiques des produits de dégradation
- effets des enzymes sur la dégradabilité
- érosion de surface ou érosion de la masse

Pour les polymères biostables, également :

- stabilisation biologique
- vieillissements physique et chimique
- effet de la stérilisation.

Ou encore pour les systèmes macromoléculaires actifs :

- interactions avec les éléments vivants (macromolécules, cellules, organes, etc...)
- devenir en cas d'utilisation limitée dans le temps
- effets biologiques positifs ou négatifs.

Et enfin, pour les matériaux de libération contrôlée de principes actifs :

- matrices polymères ou minérales ou mixtes
- devenir des parties matériaux
- altérations réciproques des propriétés des parties artificielles et des parties vivantes
- mise en évidence des propriétés biologiques spécifiques.

Les polymères, par la nature de leur construction moléculaire à base d'éléments de répétition, sont des candidats du futur pour l'élaboration de prothèses permanentes ou temporaires sophistiquées, ou encore pour remplacer des matériaux actuellement d'origine naturelle, comme de programmation nécessite alors une recherche en consortium pluridisciplinaire.

c) Les matériaux d'origine naturelle : Le souci de biocompatibilité des implants a orienté les chercheurs vers des matériaux logiquement biocompatibles puisque d'origine naturelle. Outre les tissus biologiques retraités (valves porcines, carotide de boeuf, veine ombilicale, ...), le sulfate de chondroïtine et l'acide hyaluronique, on trouve parmi ceux-ci :

- les greffes en général (autogreffes, allogreffes, hétérogreffes)
- la **chitine**, polysaccharide extrait des coquilles de crabe, qui est susceptible d'application pour les fils de suture, la chirurgie reconstructive et la peau artificielle
- les **fucanes**, polysaccharides extraits des algues marines (anticoagulants - anticomplémentaires, etc...)
- les **dextranes** et autres polysaccharides fonctionnalisés (le dextrane est préparé par transformation de saccharose par des bactéries)
- la **cellulose**, traditionnellement utilisée pour les membranes de dialyse, mais dont d'autres applications sont à l'étude, notamment comme ciment de prothèse de hanche
- le **corail**, qui pourrait être utilisé en chirurgie orthopédique et/ou maxillo-faciale, grâce à la possibilité de recolonisation de ce matériau par les cellules osseuses
- le **collagène**, d'origine animale (extrait de la peau) ou humaine (extrait du placenta humain) et dont les applications existantes ou envisageables sont très nombreuses :

d) Les métaux et alliages métalliques : Ce sont en quelque sorte les "ancêtres" des biomatériaux puisque ce sont les premiers à avoir été utilisés pour faire des implants. Le plus important est sans doute **l'acier inoxydable**, encore largement utilisé en chirurgie orthopédique. L'intérêt de l'acier inoxydable dans ce domaine réside dans ses propriétés mécaniques. Il faut également mentionner particulièrement le titane, qui est utilisé principalement en chirurgie orthopédique et pour réaliser des implants dentaires. On le trouve également dans les stimulateurs cardiaques et les pompes implantables. L'un des avantages principaux du titane est sa bonne biocompatibilité. Les alliages à mémoire de forme sont une variante intéressante de cette catégorie. On utilise également des alliages cobalt, chrome, molybdène, du tantale, etc. Les principaux problèmes mal résolus avec les métaux et alliages métalliques sont les suivants :

- corrosion électrochimique et durabilité
- mécanismes de dégradation non électrochimiques incluant les interactions protéine/métal
- réactions immunitaires et d'hypersensibilité
- adaptation des propriétés mécaniques
- propriétés de frottements et problèmes de débris. (**C. Janot et L. Sedel Cahier de synthèse du CNRS., 2000**).

Les métaux et alliages sont depuis longtemps utilisés pour des applications biomédicales. De nos jours, les biomatériaux métalliques sont principalement utilisés (**Planell et al., 1997 ; Schmidt et al., 1999**) en chirurgie orthopédique (clous, vis, plaques, articulations), en chirurgie maxillo-faciale (implants endo-osseux, vis, plaques) et en chirurgie (instruments).

Les champs d'application des biomatériaux en odontologie et orthopédie :

Odontologie – Stomatologie :

- matériaux de restauration et comblement dentaire et osseux
- traitements prophylactiques
- orthodontie
- traitement du parodonte et de la pulpe
- implants
- reconstruction maxillo-faciale

Chirurgie Orthopédique

- prothèses articulaires (hanche, coude, genou, poignet, ...)
- orthèses
- ligaments et tendons artificiels
- cartilage
- remplacement osseux pour tumeur ou traumatisme
- chirurgie du rachis
- réparation de fractures (vis, plaques, clous, broches)
- matériaux de comblement osseux injectable

2.2. Le Titane

Bien que le titane soit un métal abondant sur la terre (neuvième élément dans l'ordre d'abondance dans l'écorce terrestre), les difficultés de sa métallurgie extractive ont retardé le développement de ses applications industrielles. Aujourd'hui, le titane et ses alliages sont utilisés dans les secteurs aussi distincts que l'aéronautique, la chimie et le biomédical. Du fait de leur haute résistance spécifique (résistance mécanique/densité), et au regard des différents

critères de biofonctionnalité, le titane et ses alliages représentent des matériaux de choix pour les applications biomédicales. En effet, leurs caractéristiques, aussi bien mécaniques que biologiques, justifient l'intérêt du monde chirurgical, et scientifique.

Le titane pur est un métal de la colonne IV B de la classification périodique des éléments présentant deux structures cristallographiques différentes stables respectivement à basse et à haute température : la phase α et la phase β . La phase α est stable à température ambiante, la structure cristalline est de type hexagonale compacte et la phase β est la phase stable à haute température dans le titane, elle présente une structure cubique centrée. Les alliages de titane présentent des caractéristiques mécaniques (module d'élasticité, résistance mécanique, résistance à la fatigue) nettement supérieures à celles de leurs concurrents polymères, céramiques et même métalliques (**Tableau 3**).

Biomatériau	R_f^1 (Mpa)	$E \times 10^3$ (Mpa)	$(R_f/E) \times 10^{-3}$	
<i>Substantia corticalis</i> (os)	-	20	-	
FeCrNiMo (316L)	250	210	1,2	
Co-29Cr-5Mo, coulé	300	200	1,5	
CoNiCr, forgé	500	220	2,3	
Alliages de Ti ($\alpha+\beta$)	550	105	5,2	
Ti _{cp}	200	100	1,8	
Ta _{cp}	200	200	1,3	
Al ₂ O ₃	0 / 400 ²	380	0 / 1,05	¹ en flexion
ZrO ₂	0 / 450 ²	170	0 / 2,6	² en compression
Hydroxyapatite (HAP)	30-170 ²	-	-	cp : commercialement pur
PMMA	30	25	1,2	
UHMWPE	16	1,2	13,3	

Tableau 3 : Caractéristiques mécaniques de différents biomatériaux (Breme et al., 1998)

L'extraordinaire résistance à la corrosion du titane et des alliages de titane résulte de la succession de plusieurs étapes qui confèrent à l'implant une inertie biologique idéale. Tout

d'abord, possédant un potentiel normal très négatif, le titane tends spontanément à s'oxyder à l'air mais aussi en milieu aqueux du fait de la présence de protons issus de la dissociation de l'eau ou/et de l'oxygène dissous dans le liquide. La couche passivante TiO_2 , épaisse de quelques nanomètres, alors observée à la surface de l'alliage (**Schutz., 1997**) provoque l'arrêt brutal du processus de corrosion en réduisant à l'extrême les échanges électroniques. La couche de TiO_2 est chimiquement stable, de plus, après dégradation (par usure ou lors de l'implantation chirurgicale), la reconstruction de la couche est immédiate (temps de repassivation voisin de 40 ms) (**Breme et al., 1989**).

Toutefois, au contact du liquide physiologique, la couche d'oxyde TiO_2 subit des agressions qui peuvent être continues (réaction d'hydrolyse) ou ponctuelles (usure par frottement mécanique, variation locale de pH ou de potentiel électrique). C'est en réponse à ces agressions que le titane révèle sa supériorité vis-à-vis des autres métaux, ses propriétés étant adéquates aux applications biologiques. Du fait des propriétés isolantes de la couche d'oxyde TiO_2 qui limite les échanges électroniques et ioniques, les alliages de titane ne sont pas reconnus comme des corps étrangers par l'organisme. La couche d'oxyde TiO_2 dont la constante diélectrique est élevée ($\epsilon_{\text{TiO}_2} = 110$), par exemple très supérieure à celle des oxydes de chrome (**Breme et al., 1989**) ($\epsilon_{\text{Cr}_2\text{O}_3} = 12$), favorise les liaisons de type Van der Waals avec les molécules organiques environnantes (protéines, etc) qui prennent alors le rôle d'adhésif entre les ostéoblastes et la surface du matériau (**Anselme., 2000**). L'implant n'étant donc pas reconnu comme un corps étranger ($\epsilon_{\text{H}_2\text{O}} = 78$).

Les alliages de titane représentent des biomatériaux de choix en raison de leurs caractéristiques physiques et biologiques. Vis-à-vis des autres biomatériaux métalliques concurrents, la supériorité des alliages de titane se manifeste par :

- une biocompatibilité liée à la formation d'une couche passivante chimiquement stable

et biologiquement active.

- des propriétés mécaniques modulables.

2.3. Modifications de surfaces en titane et en alliages de titane pour des applications bio-médicales

De nombreuses modifications de surface ont été développées et sont actuellement utilisées dans le but d'améliorer la performance clinique des implants en titane. Ces principales propriétés, tels que la non-toxicité, résistance à la corrosion, les propriétés mécaniques sont depuis longtemps reconnus pour sélectionner des biomatériaux pour une application biomédicale spécifique. Les événements après l'implantation sont principalement axés sur les interactions entre l'environnement biologique et la surface du matériau implanté. La surface du matériau joue un rôle extrêmement important dans la réponse de l'environnement biologique.

Pour améliorer l'ostéointégration sur les surfaces en titane ainsi que sur les alliages en titane tels que le TiAl6V4, des modifications chimiques, topographiques et biochimiques de la surface ont été proposées :

Modifications chimiques : La relation liant la modification chimique ou thermique de la surface des alliages de titane TiAl6V4, (incluant les modifications de la mouillabilité et la composition atomique) et ces influences sur l'adsorption des protéines et des récepteurs cellulaires induisant l'attachement des cellules MG63 a été étudié par MacDonald *et al.*, (2004). Les résultats ont montré que la quantité de ces récepteurs est corrélée avec la composition spécifique en Al (MacDonald *et al.*, 2004). Le nombre de cellules des ostéoblastes de lapin attachées est plus élevé sur les surfaces avec plus d'énergie, plus de

rugosité et plus hydrophiles (**Feng et al., 2003**). Feng *et al.*, (**2004**) ont montré sur des surfaces de titane pur modifiées par des ions calcium, que le nombre des ostéoblastes de lapin adhérents est plus élevé que sur les surfaces modifiées par des ions phosphates (**Feng et al., 2004**). L'influence de la modification de l'énergie de surface sur l'adhérence des ostéoblastes a été étudiée *in vitro* avec des surfaces rendues hydrophiles par l'ajout d'hydroxyapatite à la couche d'oxyde du titane modifié. Les auteurs montrent un meilleur taux initial d'adhérence des cellules MC3T3-E1 sur les surfaces oxydées et les surfaces modifiées hydrothermiquement avec l'hydroxyapatite par rapport au titane non modifié (**Zhang et al., 2004**). Par ailleurs l'apport de l'hydroxyapatite a été évalué dans un modèle *in vivo*. Le revêtement des fils en titane avec une fine couche d'hydroxyapatite (2µm) a permis une meilleure croissance de l'os au contact os-implant lorsqu'il est inséré dans la cavité médullaire du fémur droit de rats en comparaison avec des fils en titane non modifiés (**Schmidmaier et al., 2002**).

Modifications topographiques : Il est connu que les ostéoblastes préfèrent les surfaces rugueuses (**Kunzler et al., 2007**), et les ostéoblastes en culture sur ces surfaces améliore la dureté et le module d'élasticité des tissus minéralisés (**Takeuchi et al., 2005**). Toutes les surfaces (lisses, sablées, mordancées, plasma-spray et la surface modifiée par l'hydroxyapatite) ont des effets significatifs sur la prolifération cellulaire et sur l'expression temporelle de certains gènes et de protéines à la connexion os-surface (**Knabe et al., 2004**).

Modifications biochimiques : Des modifications biochimiques de la surface ont été jugées très prometteuses pour l'amélioration des fonctions des ostéoblastes. La surface implantaire peut être modifiée par incorporation de molécules qui jouent un rôle important dans la régulation de l'adhésion des ostéoblastes. L'attachement des cellules est une étape importante

dans les interactions cellules-implants. Depuis l'identification de la séquence RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) comme médiatrice de l'attachement cellulaire sur des protéines de la matrice extra-cellulaire et des protéines plasmatiques, la dépose des peptides contenant cette séquence RGD sur les biomatériaux a été proposée pour favoriser l'attachement cellulaire. La séquence RGD se trouve, entre autre, sur la fibronectine, la vitronectine, le collagène I, l'ostéopontine, la BSP (**Puleo et al., 1999**). Des récepteurs cellulaires spécifiques appartenant à la superfamille des intégrines reconnaissent cette séquence et s'y attachent. Des molécules comme les peptides contenant séquence RGD (Arginine-Glycine-Aspartate, Arg-Gly-Asp) (**Kroese-Deutman et al., 2005 ; Rammelt et al., 2006**) sont fixés à la surface des implants en titane dans le but d'améliorer l'attachement, la prolifération et la différenciation ostéoblastique.

D'autres méthodes associant des facteurs ostéoinducteurs avec les surfaces en titane ont été proposés (**Clokie et al., 2003**). Clokie *et al.*, trouvent que l'application de rhTGF β -1 au niveau des sites implantaires augmente la quantité de formation osseuse à la surface implantaire dans les mandibules de cochons nains au bout de 6 semaines. Des facteurs de croissance BMP-2 (protéine morphogénétique osseuse) sont fixés à la surface des implants en titane dans le but d'améliorer l'ostéointégration (**Seol et al., 2006 ; Becker et al., 2006**). Mais la perte rapide de la protéine adsorbée est un désavantage pour maintenir l'activité prolongée (**Jansen et al., 2005**). Dans cette étude, des treillis en fibre de titane a été chargé soit avec rhTGF- β 1 (recombinant human Transforming Growth Factor- β 1) ou avec BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein), et ils ont trouvé que dans les 2 premières heures, 70% du TGF- β 1 a été libéré.

Une des causes principales d'échec de l'ostéointégration sont les infections péri-implantaires. Celles-ci sont induites par les bactéries de la peau et /ou de la muqueuse du patient présentes dans le site de la plaie chirurgicale lors de l'insertion d'un implant ou par les bactéries qui arrivent via la circulation sanguine. En orthopédie les bactéries sont les *coagulase negative Staphylococci*, *Staphylococcus aureus*, *Diphtheroids* et *Streptococcus species*. Dans la cavité buccale des bactéries de la flore impliquées sont les *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* et les *Staphylococcus aureus*.

2.4. Colonisation des surfaces des biomatériaux par des bactéries

Quelle que soit le type de surface, les bactéries adhèrent facilement et rapidement aux biomatériaux. Une fois que les bactéries ont adhéré, des modifications phénotypiques ont lieu et conduisent à la formation de microcolonies puis d'un biofilm bactérien, qui correspond à la colonisation du biomatériau (Costeron., 1999). Mieux connaître ce processus, peut permettre de mieux l'appréhender pour arriver à le contrôler, voire à l'éviter.

L'idée que les bactéries croissent préférentiellement sur des surfaces a été avancée à intervalles réguliers au cours des 150 dernières années (Costeron., 1999). Parallèlement, certains microbiologistes ont constaté que les bactéries planctoniques poussaient différemment après avoir adhéré à une surface et initié la formation d'un biofilm. Les termes de bactéries sessiles et planctoniques décrivent des micro-organismes respectivement adhérents à une surface et libres dans une suspension. La surface d'adhésion des organismes sessiles peut être abiotique (les matériaux inertes) ou biotique (les tissus ou cellules vivantes) (Dunne et al., 2002).

Costeron *et al.*, (1999) ont défini le biofilm comme une « communauté structurée de cellules bactériennes incluses dans une matrice polymérique auto-produite et adhérentes à une surface inerte ou vivante ». Les 3 éléments de base nécessaires à la constitution d'un biofilm sont les micro-organismes, le glycocalyx, et la surface d'adhésion, et le milieu environnemental. Si un de ces composants manque, le biofilm ne peut pas se développer. Le glycocalyx maintient les bactéries entre elles et le biofilm à la surface colonisée ; c'est un complexe d'exopolysaccharides d'origine bactérienne qui emprisonne les substances exogènes présentes dans l'environnement local, y compris les acides nucléiques, les protéines, les minéraux, les aliments, les constituants de la membrane cellulaire, etc. (Costeron *et al.*, 1987).

2.4.1. Adsorption des protéines sur les surfaces des biomatériaux

L'adsorption des protéines à la surface d'un biomatériau est déterminante pour leur devenir et elle peut contrôler plusieurs processus. Elle favorise l'adhérence des bactéries et des cellules et contribue à la réponse de l'hôte à l'implantation. Les interactions bactéries-surface donc sont indirectes et se font via une couche de protéines adsorbées.

L'événement immédiat qui survient suite à l'implantation du biomatériau dans un milieu biologique est l'adsorption des protéines. De façon générale, la surface implantaire est recouverte d'une couche de composants organiques et inorganiques d'origine plasmatique tels que des protéines, des lipides, des sucres et des ions. Ces protéines proviennent dans un premier temps du plasma et des fluides interstitiels au niveau de la plaie, et dans un deuxième temps de l'activité métabolique de cellules dans le site péri-implantaire (Puleo *et al.*, 1999). Les protéines s'adsorbent en fonction de leur affinité pour la surface et de leur concentration dans les fluides biologiques. Les protéines les plus rapides à s'adsorber à la surface sont

l'albumine, les immunoglobulines G et le fibrinogène. La fibronectine est aussi une protéine qui se lie instantanément à de nombreux matériaux.

2.4.2. L'adhésion des bactéries sur les surfaces de biomatériaux

L'adhésion initiale, réversible au départ, puis progressivement irréversible, est régie par l'équilibre entre trois forces physico-chimiques fondamentales non spécifiques (Van der Waals ou hydrophobes, électrostatiques, et interactions acide/base), par l'expression des adhésines polysaccharidique capsulaire (PS/A) et/ou de différentes protéines de surface (protéines de surface staphylococciques, protéines adhérentes au fibrinogène, protéines de la matrice, etc.) (Vafidis et al., 1984).

Des facteurs spécifiques sont impliqués dans l'attachement de *S. epidermidis*, dont des protéines bactérienne agencées en structures de type fimbriae (Mack et al., 1999). Les bactéries peuvent ainsi acquérir de nouvelles structures adhésives comme les pili, flagelles latéraux, exopolymères (Sutherland et al., 1983). L'adhérence spécifique due aux fimbriae n'est pas forte parce que basée sur l'interaction des structures protéiques, mais elle est néanmoins considérée comme irréversible. Les bactéries à gram positif se caractérisent par la présence sur leur membrane de récepteurs de surface appelés adhésines, ces récepteurs permettent l'adhésion de bactéries sur les tissus et sur les surfaces par l'intermédiaire des protéines plasmatiques. Dans le cas de certaines souches de *Staphylococcus* deux récepteurs à la fibronectine (FnBP1 et FnBP2) ont été décrits ainsi que deux récepteurs pour le fibrinogène (Clf1 et Clf2) (Foster et al., 1994 ; Francois et al., 1996 ; Ni Eidhin et al., 1998).

2.4.3. La formation du biofilm

La seconde phase du processus d'adhérence de bactéries est plus prolongée et médiée par la production bactérienne d'un glycocalyx polysaccharidique à la surface des biomatériaux (Kadry et al., 1999) et par l'expression d'un autre antigène appelé l'adhésine polysaccharidique intracellulaire (PIA) (Pinna et al., 2000). Le biofilm est connu pour être composé de multicouches de microcolonies bactériennes englobées dans une matrice (Figure 1) (Mack et al., 1999). PIA contrôle l'adhérence intercellulaire et est ainsi responsable de l'accumulation des bactéries en microcolonies et de la maturation du biofilm (Mack et al., 1999).

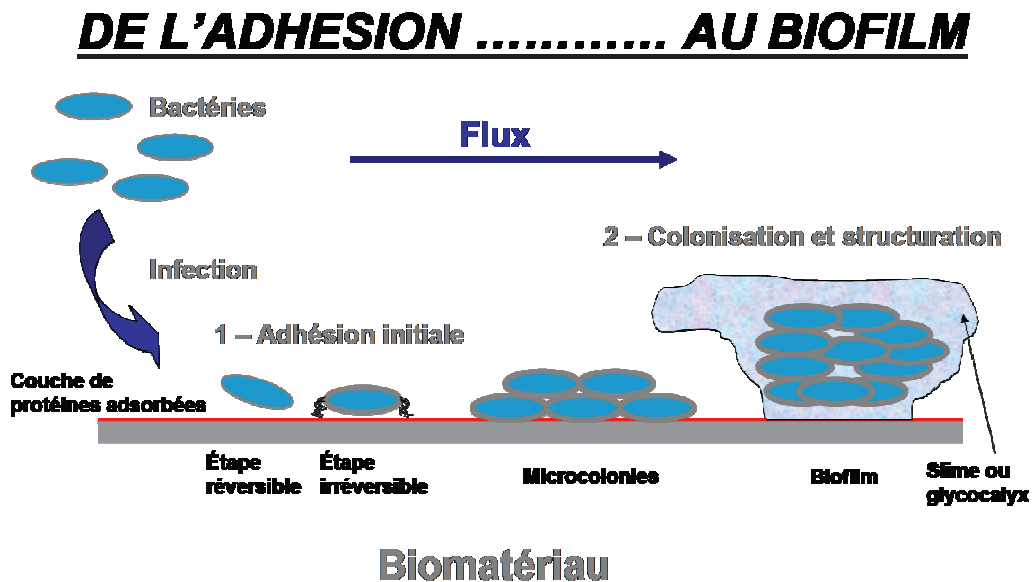


Figure 1 : Représentation schématique des différentes phases de la formation du biofilm

Pour résumer, après qu'une cellule bactérienne planctonique ait « senti » et « exploré » une surface, la cellule peut s'engager d'elle-même dans le processus actif d'adhérence et de formation du biofilm. Les bactéries attachées doivent synthétiser des exopolysaccharides « pour cimenter » leur adhérence entre elles et à la surface, afin de progresser de l'étape réversible d'attachement à la phase irréversible d'adhérence puis de maturation du biofilm avec multiplication bactérienne, formation de microcolonies et finalement colonisation bactérienne de la surface du biomatériau (**Figure 1**). L'expérience clinique a montré que les défenses de l'organisme ainsi que les traitements antibiotiques sont insuffisants pour éliminer un biofilm mature (**Kodjikian et al., 2005**).

Après avoir longtemps utilisé des matériaux en se référant uniquement à leurs propriétés physico-chimiques et/ou mécaniques, il est apparu plus judicieux de modifier des matériaux en surface afin de leur permettre d'induire une réponse de l'hôte sinon favorable et prévenir le risque d'infection. Ainsi, les recherches se sont orientées vers des modifications de surface des biomatériaux implantables utilisés. Ces modifications visent à améliorer d'une part la qualité du tissu formé à l'interface os-implant pour obtenir une meilleure ostéointégration et d'autre part à conférer à la surface des propriétés anti-bactériennes. (**Shibata et al., 2004 ; Crémieux et al., 2003**).

2.5. Modification de surface de titane proposée pour éviter l'infection bactérienne

Pour prévenir le risque d'infection sur les prothèses ostéoarticulaires en évitant les limites de l'antibiothérapie deux approches ont été développées : les surfaces de biomatériaux dotées des effets anti-bactériens et des surface dotées des effets anti-adhésifs. L'inhibition de la

colonisation des bactéries peut être réalisée soit en tuant les bactéries présentes dans le voisinage ou sur le contact avec la surface, ou en empêchant les bactéries d'adhérer sur le substrat. Dans le premier cas les surfaces ont été modifiées, de façon de posséder ou de libérer des agents anti-bactérienne localement.

L'adhésion des bactéries sur un substrat est reconnue comme première étape dans l'infection. Les propriétés anti-adhésif peut être obtenu en modifiant la surface de biomatériau avec chaînes de molécules hautement hydratée, comme l'oxyde de polyéthylène, les polyacrylamides, ou de l'héparine. Ces chaînes hydraté fournir une stérique barrière physique qui minimise les interactions non-covalentes et réduit l'adhérence bactérienne (**Vacheethasane et al., 2000 ; Morra et al., 1999**). Un certain nombre de techniques de modification ont été développés à la base de ces principes pour les surfaces en titane.

Plusieurs approches des modifications de surface ont été proposées. Pour éviter les infections, il a été envisagé de modifier la surface implantaire en utilisant des antibiotiques. Luke *et al.*, (2003) ont montré que des surfaces de titane recouvertes de poly(D,L-lactide) et 10% de gentamicine (group IV) présentaient des propriétés inhibitrices de l'adhésion et de la prolifération bactérienne (**Luke et al., 2003**). Et l'immobilisation des antibiotiques (gentamicin, pencillin et vancomycin) (**Zhang et al., 2007 ; Antoci et al., 2007**), et des peptides antimicrobiens (**Gabriel et al., 2006**) sur des surfaces en titane ont été montrés des propriétés antibactériennes. Le choix de l'antibiotique, le mode de libération et le risque d'induction d'une résistance bactérienne, sont les questions qui se posent face aux surfaces ainsi modifiées.

Des modifications chimiques de surface en titane avec des ions de chlore ont été proposées (Shibata et al., 2004) ainsi qu'avec des ions d'argent et de cuivre (Wan et al., 2007(I) ; Wan et al., 2007(II)). Les charges positives des ions d'argent et de cuivre sont libérées ses lient avec les charges négatives de la cellule bactérienne, causant la mort des bactéries. Une autre approche consiste à rendre hydrophile les surfaces pour diminuer l'adsorption des protéines plasmatiques qui peuvent servir de substrat à l'adhésion bactérienne (Desai et al., 1992). Il a été décrit que l'anodisation et le traitement thermique de surface en titane, modifient la surface en anatase cristalline qui, après traitement par UV, réduit l'adhésion des bactéries à travers le mécanisme de TiO₂ photocatalytique (Del Curto et al., 2005).

Afin de prévenir indirectement l'adhésion bactérienne, des modifications de surface des polymères ont également été proposées. Certains copolymères dérivés de poly(méthacrylate de méthyle), obtenus par polymérisation radicalaire de monomères porteurs de groupements sulfonates et carboxylates (Hélary et al., 2000), diminuent l'adhésion du *Staphylococcus aureus in vitro* (Berlot et al., 2002). L'originalité de ces copolymères réside dans leur capacité à modifier certaines fonctions des bactéries en induisant des interactions spécifiques avec les protéines d'adhésion. Ces groupements ioniques sont capables d'inhiber l'adhésion de différentes souches bactériennes (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*). D'après des études *in vitro*, l'inhibition de l'adhésion du *S. aureus* sur les copolymères varie en fonction de la composition chimique (en sulfonate/carboxylate), et peut atteindre 90% (Berlot et al., 2002). Des résultats récents d'études *in vivo* sur un modèle d'infection chez le lapin, montrent que des prothèses en silicone greffées de polymères bioactifs diminuent l'adhésion de *S. aureus* de façon significative (Cremieux et al., 2003). Zhou et al., (2007) ont montré que la présence du polymère bioactif permet de diminuer l'adhérence bactérienne de manière significative, les surfaces de titane greffées présentent une surface trois fois plus importante à l'échelle

protéique que les surfaces non greffées, l'inhibition est observée quelles que soient les conditions de pré-incubation des surfaces (en l'absence ou en présence de protéines). Néanmoins, l'inhibition de l'adhérence de *P. gingivalis* sur le titane greffé est de l'ordre de 20 %, mais si on tient compte de la surface réellement accessible aux protéines, en présence de fibronectine, elle est de l'ordre de 73 %.

L'effet de ces polymères a été évalué *in vitro* sur des films puis sur des polymères sous forme de tubulures. Enfin des essais *in vivo* ont été réalisés sur des prothèses greffées des polymères bioactifs. Les résultats de ces expérimentations montrent que pour certaines compositions chimiques bien définies des polymères, un effet bactériophobe important ainsi qu'un effet inhibiteur de la prolifération bactérienne sont observés sur les différentes souches étudiées (**Pavon-Djavid et al., 2005**). L'ensemble des résultats a permis de mettre en évidence que la modification chimique de la surface des biomatériaux à l'aide de polymères bioactifs porteurs des groupements fonctionnels carboxylate et sulfonate permet d'induire une diminution sensible de l'adhérence bactérienne tant *in vitro* qu'*in vivo* (**Pavon-Djavid et al., 2005**). L'utilisation de ces polymères et/ou leur greffage sur des surfaces prothétiques permet d'envisager la préparation de surfaces bioactives inhibitrices de l'adhérence bactérienne et de prévenir l'infection sur prothèse.

2.6. Interface Os-Implant

Plusieurs réactions et divers processus biochimiques ont lieu à l'interface implant-os. Dès que l'implant métallique est inséré dans le site osseux, sa surface est le siège d'interactions dynamiques avec les molécules environnantes. D'une part, du côté surface implantaire les atomes d'oxygène peuvent diffuser des couches profondes vers la surface et /ou de la surface vers les couches plus profondes et des ions du milieu environnants peuvent s'incorporer. D'autre part, les interactions de molécules biologiques (protéines, enzymes) avec la surface implantaire peuvent changer leur conformation et par conséquent leur fonction. En effet, entre le premier contact des molécules biologiques avec la surface implantaire et le remodelage final autour d'un implant, le processus de la cicatrisation passe par de nombreuses étapes aboutissant à la formation de l'interface os-implant.

L'os est un tissu qui présente une physiologie dynamique, il est principalement constitué de 3 types de cellules : l'ostéoblaste, l'ostéocyte et l'ostéoclaste. **L'ostéoblaste** est la cellule centrale responsable de chacune des étapes de l'ostéointégration. C'est une cellule sur laquelle on peut agir, car elle possède plusieurs caractéristiques qui peuvent être modulables. Ainsi les ostéoblastes proviennent des cellules ostéoprogénitrices du mésenchyme et se différencient finalement en ostéoblastes matures puis en **ostéocytes**, et elles sont des cellules sécrétrices avec une grande capacité à synthétiser des protéines. Ils synthétisent les constituants de la matrice tels que le collagène I, des protéines osseuses spécifiques, et régulent la minéralisation de la matrice en un tissu hautement spécialisé. Les ostéoblastes sont des cellules qui synthétisent des facteurs de croissance dans la matrice osseuse et répondent à ces facteurs quand ils sont relargués pendant les phases de résorption de réparation et de remodelage osseux et peuvent moduler les signaux systémiques et physiques pour le

recrutement et l'activité des ostéoclastes qui font partie intégrante du processus de remodelage et de réparation qui maintiennent l'os sur l'implant (**Puzas et al., 1992**).

L'ostéoclaste est une cellule géante multi nucléée, responsable de la résorption du tissu osseux. La cellule précurseur de l'ostéoclaste est une cellule mononuclée provenant des cellules progénitrices myéloïdes hématopoïétiques (CFU-GMO), lignage partagé avec les granulocytes et les monocytes. L'ostéoclaste mature est une cellule qui peut migrer le long des surfaces osseuses, repère les régions à résorber, s'attache à ces régions, établit une zone définissant le périmètre à résorber. La résorption lacunaire se fait par la sécrétion de protéines et des enzymes hydrolytiques, affectant les constituants minéraux et organiques de l'os.

Les paramètres biologiques et les paramètres de surface impliquer dans Interface Os-Implant :

Les cellules s'attachent à la surface implantaire après l'adsorption des composants du fluide biologique, et plus particulièrement les protéines. L'adhésion des protéines dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la surface. Les protéines adsorbées influencent la morphologie cellulaire et la capacité de prolifération et de différenciation. Lorsque les cellules adhérentes à la surface, adoptent un comportement selon le type de surface qui va plus ou moins induire la prolifération et la différenciation cellulaire pour aboutir à la formation osseuse à l'interface (**Figure 2**) (**Anselme et al., 2006**).

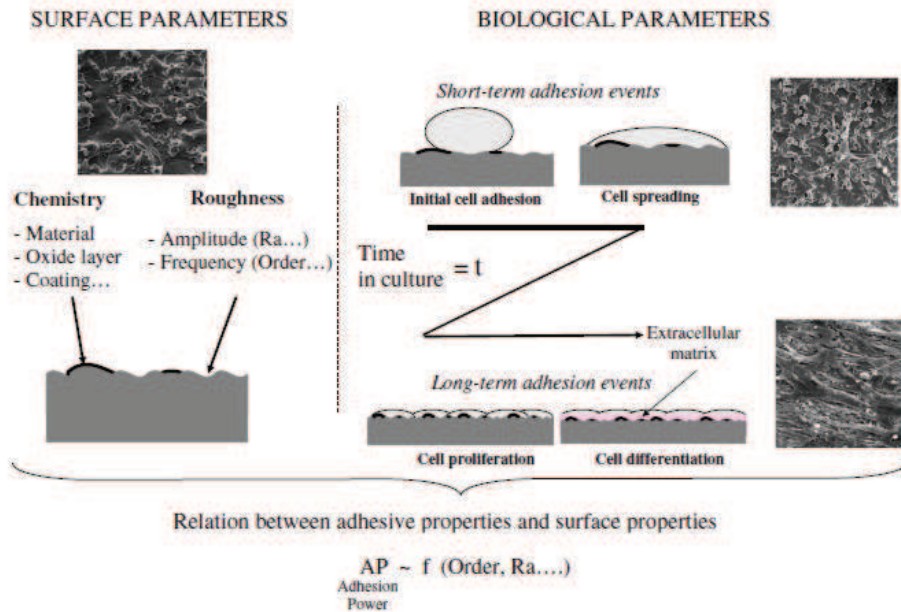


Figure 2 : Les paramètres biologiques et les paramètres de surface impliqués dans l'Interface Os-Implant (Anselme et al., 2006)

2.7. Les influences des modifications de la surface en titane sur la réponse ostéoblastique

Comme les interactions os / biomatériau ont lieu à la surface du matériau, les ostéoblastes qui colonisent la surface de l'implant sont les cellules qui déterminent la réponse des tissus à la surface du biomatériau. Les interactions cellules-matériau sont des processus dynamiques qui dépendent de divers paramètres influençant la réponse des cellules (Figure 3) (Meyer et al., 2005).

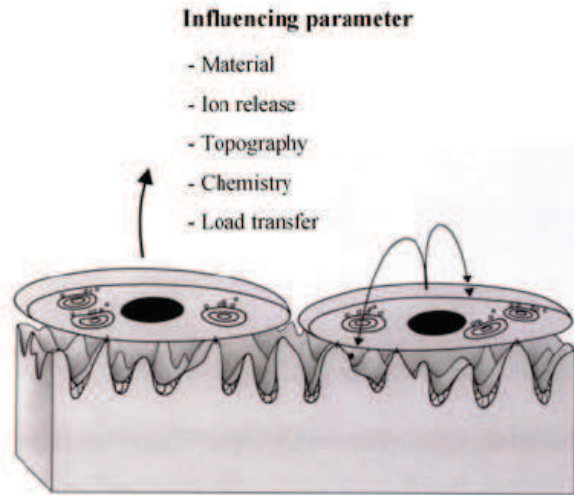


Figure 3 : Les paramètres de surface Influencer le comportement des ostéoblastes (Meyer et al., 2005)

Meyer *et al.*, (2005) ont montré les différents stades d'interactions ostéoblastes / surface du titane en images à l'aide d'un microscope électronique (Figure 4).

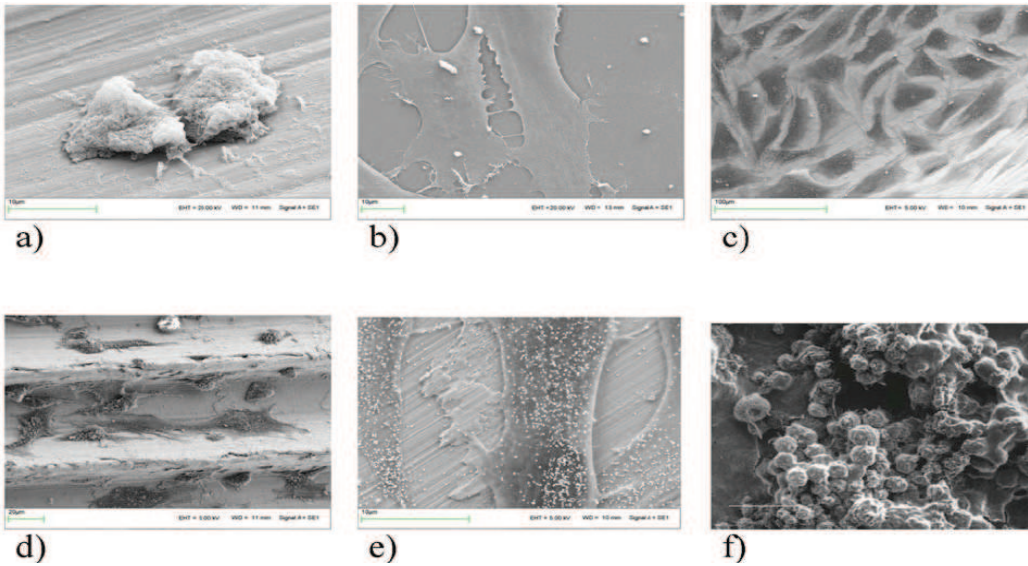


Figure 4 : Les différents stades d'interaction ostéoblastes / titane surface, a) l'adhésion cellulaire, b) l'étalement, c) prolifération, d) migration, e) synthèse de matrice, f) formation de minéraux (Meyer et al., 2005)

L'adsorption des protéines à la surface du matériau est suivie par la phase d'adhésion qui se produit rapidement. Les interactions physico-chimiques entre les cellules et les matériaux font intervenir des interactions ioniques, des forces de Van der Waals, et d'autres forces régissent ce processus d'adhésion. L'adhésion à long terme des ostéoblastes sur les surfaces des matériaux implique plusieurs molécules biologiques qui interagissent ensemble pour induire la transduction puis la régulation du signal. Il est important de noter que les étapes mentionnées décrivent les comportements de la cellule de façon simple, alors qu'en réalité ils sont complexes et interconnectés (**Meyer et al., 2005**).

L'adhésion cellulaire engendre d'importants signaux informant la cellule sur l'environnement local. Les signaux induits par les intégrines peuvent influencer, la prolifération et la différenciation cellulaires. Les interactions de la cellule avec les protéines adhésives de la matrice extra-cellulaire contribuent aux processus de néo-formation osseuse.

Les cellules ostéoblastiques, une fois attachées, prolifèrent. La prolifération cellulaire est influencée par divers stimuli incluant : des cytokines, des facteurs de croissance, des hormones. Puis, les ostéoblastes recrutés passent par une phase de différenciation pour acquérir le phénotype ostéoblastique, caractérisé par l'expression de la phosphatase alcaline, de l'ostéonectine, ostéopontine, ostéocalcine et BSP.

La différenciation ostéoblastique est induite par des signaux médiés par des molécules solubles tels que les hormones, facteurs de croissance, cytokines et des signaux via les interactions de l'ostéoblaste avec la matrice extracellulaire et/ou par des contraintes mécaniques.

Les cellules ostéogéniques différenciées secrètent les constituants d'une matrice extracellulaire, qui donnent des sites de nucléation de minéralisation. L'ostéopontine et la

bon-sialoprotéine ont été identifiées dans cette matrice. Les cristaux de calcium et de phosphate croissent en suivant la nucléation, et parallèlement à la croissance du cristal à l'interface, il y aura initiation de l'assemblage des fibres de collagène. Finalement la calcification se fait au niveau des fibres de collagène et entre les fibres. Puis l'os immature se transforme en os lamellaire, os qui résiste aux contraintes physiques et présente une architecture haversienne.

Différentes propriétés des matériaux sont susceptibles d'influencer la réponse biologique. La topographie et les caractéristiques physico-chimiques de la surface sont les paramètres les plus importants. Les relations entre les propriétés topographiques et physico-chimiques des matériaux et leurs effets sur l'adsorption de protéines sont complexes et généralement mal connus (**Le Guehennec et al., 2007**).

2.7.1. Modèles des cultures utilisés pour l'étude de la réponse des ostéoblastes sur des matériaux *in vitro*

Les modèles de culture cellulaire permettent d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires des cellules en réponse aux modifications de surface des implants. Les études *in vitro*, permettent d'étudier les différentes fonctions cellulaires (l'adhésion, la prolifération, la différenciation, l'apoptose) sur les surfaces des implants en titane. Par ailleurs, elles permettent de réduire les expériences *in vivo* chez l'animal.

Parmi les modèles des cultures cellulaires d'ostéoblastes, il existe des cultures primaires et secondaires de cellules osseuses qui forment une matrice minéralisable et les lignées stables de cellules qui expriment des marqueurs de phénotype ostéoblastique. Pour étudier la réponse

des ostéoblastes sur des surfaces modifiées, différentes cellules ostéoblastiques ont été utilisées: des ostéoblastes humains (**Anselme et al., 1999**), des cellules de calvaria des fœtus de rat (**Viornerly et al., 2002 ; Wieland et al., 2005**), des cultures de MC3T3-E1 (lignée cellulaire qui dérive de la calvaria de nouveau-né de souris) (**Shibata et al., 2004 ; Zhang et al., 2004**), des cultures de MG-63 référencées CRL-1427 à l'American type Culture collection dérivant d'un ostéosarcome humain (donneur de 14 ans) (**MacDonald et al., 2004**) et des cultures de Saos-2 référencée HTB-85 à l'American Type Culture Collection dérivant d'un ostéosarcome humain (donneur de 11 ans) (**Postiglione et al., 2003**).

2.7.2. Caractéristiques de surface et fonctions ostéoblastiques

2.7.2.1. L'adhésion ostéoblastique

L'attachement cellulaire implique plusieurs molécules biologiques, telles que les protéines de la matrice extracellulaire, les protéines membranaires et les protéines du cytosquelette. L'adhésion entre les cellules et la surface de l'implant se fait par l'intermédiaire de points focaux (**Figure 5**). Il s'agit d'une jonction étroite (10 à 15 nm) entre la cellule et le substrat. La face externe du contact focal est représentée par des récepteurs membranaires, les intégrines. Sur la face intracellulaire, on trouve des protéines telle que la taline, la paxilline, la vinculine, la tensine, qui régulent les interactions entre les filaments d'actine et les intégrines. Ces protéines sont impliquées dans la transduction du signal. La formation de points focaux *in vitro* est favorisée par les protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine ou la vitronectine. Les protéines contenant une séquence RGD sont importantes dans la mesure où ces séquences favorisent l'adhésion des cellules osseuses. Pour cette raison, plusieurs auteurs essayent de immobiliser la séquence RGD sur des surfaces de titane avec différentes

méthodes et différents matériaux (Anselme., 2000 ; Meyer et al., 2005).

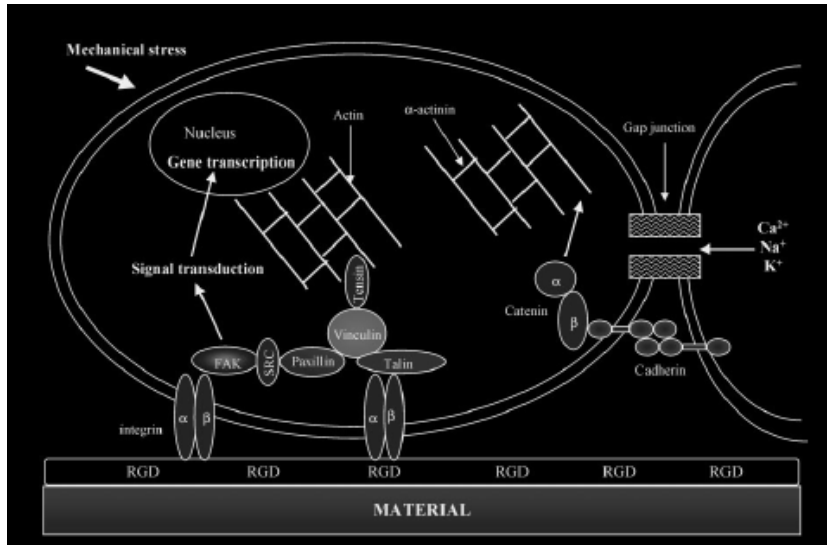


Figure 5: représentation des protéines cellulaires impliquées dans l'adhésion cellulaire sur les biomatériaux (D'après Anselme., 2000)

Les interactions cellule-matériau dépendent des caractéristiques de la surface du matériau comme : la topographie, les caractéristiques chimiques et l'énergie de la surface. Ces caractéristiques déterminent comment les molécules biologiques vont s'adsorber sur la surface et plus particulièrement l'orientation des molécules adsorbées.

Le comportement des cellules et des tissus à l'interface d'un implant peut être influencé par la topographie, aussi bien macroscopique que microscopique, de la surface. La topographie de surface joue un rôle fondamental dans la régulation du comportement des cellules (morphologie, orientation et adhésion, prolifération et différenciation). De toutes les caractéristiques d'un matériau, il semble que la topographie de surface soit la plus étudiée. La réaction des cellules à la topographie de la surface sur laquelle elles adhèrent est un des premiers phénomènes observés dans la culture du tissu et joue un rôle majeur sur l'évolution et les propriétés de l'interface implant-tissu (par exemple, l'ostéointégration).

La surface d'un implant de titane peut être considérée lisse, si la rugosité moyenne Ra est inférieure à 1 µm, et rugueuse dans le cas contraire. Wennerberg *et al.*, (1995) ont suggéré que la surface est lisse si la rugosité est comprise entre 0,5 et 1 µm, moyennement rugueuse si elle est comprise entre 1 et 2 µm, et rugueuse si elle supérieure à 2 µm. Les expériences réalisées au cours des années, ont montré que la réponse des cellules à la surface du titane varie selon le type et l'état de maturation des cellules. Des tests *in vitro* et *in vivo* ont amené plusieurs auteurs à conclure que l'attachement des ostéoblastes est renforcé par le caractère rugueux de la surface (Ronold *et al.*, 2003 ; Rosa *et al.*, 2003). Des études approfondis de cultures cellulaires sur des surfaces de rugosités variées ont débouché sur des conclusions non concordantes. Les différences dans les observations viennent probablement de la diversité de lignée cellulaire et du choix qui a été fait. Par exemple, dans le cas d'ostéoblastes, des auteurs ont utilisé une culture de cellules primaires (Jayaraman *et al.*, 2004), tandis que d'autres utilisent la lignée d'ostéosarcomes MG63 (Schwartz *et al.*, 1999 ; Zhao *et al.*, 2005). L'effet de la rugosité sur l'adhésion cellulaire résulte entre autres du fait que les surfaces rugueuses sont capables d'absorber plus de fibronectine (une protéine présente dans le sérum) que les surfaces lisses (Weiss *et al.*, 1981). Cette protéine est impliquée dans l'attachement et l'étalement des cellules sur le substrat, par interaction avec les glycosaminoglycanes et le cytosquelette (Pearson *et al.*, 1989), en préservant la synthèse des protéines extracellulaires (Martin *et al.*, 1995).

La réponse des cellules montre qu'elles sont sensibles à de petites différences de taille des pores. Stangl *et al.*, (2001) ont étudié l'adhésion des ostéoblastes sur un implant de titane de géométrie poreuse et ont conclu que le facteur important n'est pas tant la surface spécifique mais la microstructure de l'implant.

Les caractéristiques chimiques de la surface influencent l'adhésion cellulaire. L'adhésion est plus élevée sur les substrats métalliques comparé à l'adhésion sur du polystyrène de culture de tissu (**Anselme et al., 1999**). La relation entre la modification chimique ou thermique de la surface des alliages de titane TiAl6V4, et les influences sur l'adsorption des protéines et des récepteurs cellulaires impliqués dans l'adhésion des cellules MG63 a été étudié par MacDonald *et al.*, (**2004**), ils ont montré que la quantité de ces récepteurs est corrélée avec la composition spécifique en Al. Bierbaum *et al.*, (**2003**) ont étudié les différentes réponses des ostéoblastes de calvaria de rat sur des surfaces modifiées par des composants de la matrice extracellulaire, la surface de l'alliage de titane TiAl6V4 a été modifiée par adsorption directe du collagène de type I, et III et de la fibronectine (**Bierbaum et al., 2003**).

2.7.2.2. La prolifération ostéoblastique

L'adhésion cellulaire engendre d'importants signaux qui informent les cellules de l'environnement local. Les cellules ostéoblastiques, une fois attachées, prolifèrent. Les signaux induits via les intégrines peuvent influencer la prolifération cellulaire. La phase de prolifération est importante pour les ostéoblastes et influe de manière directe sur la différenciation. En effet, la prolifération en multicouches est nécessaire pour la formation des sites de nucléation et le dépôt du minéral.

Plusieurs études ont évalué la prolifération des ostéoblastes sur des surfaces en titane modifiées. La prolifération d'ostéoblastes n'est pas affectée par l'acide phosphonique greffé sur la surface lisse de titane (**Viornerly et al., 2002**). Le nombre des ostéoblastes sur les surfaces de titane modifiées par les ions de calcium est plus élevé que sur les surfaces modifiées par les ions phosphates (**Feng et al., 2004**). Toutes les surfaces (lisses, sablées,

mordancées, plasma-spray) ont des effets significatifs sur la prolifération cellulaire. D'après des données d'une revue systématique sur la réponse des cellules MG63 il n'y a pas de différence dans la prolifération des surfaces traitées par sablage ou mordantage (**Bachle et al., 2004**). Les modifications des caractéristiques physiques et chimiques de la surface par l'oxydation de couche TiO₂ influent sur la prolifération des cellules MC3T3-E1. Après trois jours de culture le nombre de cellules sur les surfaces modifiées était inférieur à celui observé sur les surfaces non modifiées (**Zhang et al., 2004**). D'autres études ont essayé d'analyser le comportement de cellules fibroblastes et de cellules ostéoblastes sur des surfaces identiques (**Harris et al., 2005 ; Park et al., 2005**). Les deux types cellulaires prolifèrent de manière semblable lorsque la rugosité est comprise entre 0,4 et 1,15 µm. Li *et al.*, (1997) ont montré qu'une surface présentant des pores de 140 µm permet une croissance maximale des cellules osseuses et Pilliar *et al.*, (1998) ont proposé une dimension minimale de 50 µm. Une dimension de 100 µm est fréquemment citée comme la limite pour la dimension des pores quand il s'agit de la croissance d'ostéoblastes.

Dans la phase initiale de prolifération, les cellules prolifèrent mieux sur une surface lisse que sur une surface rugueuse, grâce à une croissance rapide. Mais une fois la prolifération bien établie, c'est sur une surface poreuse qu'elle se poursuit le mieux. La **Figure 6** montre un exemple de deux morphologies de surface différentes sur lesquelles ont été cultivées des ostéoblastes.

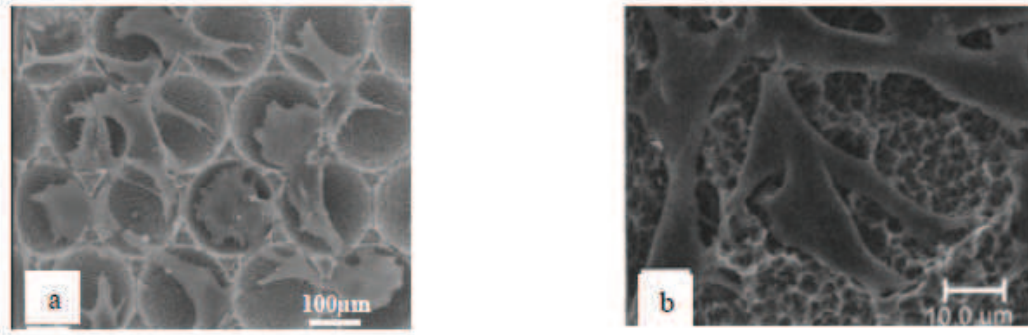


Figure 6 : Exemples des cellules attachées sur différentes topographies de surface : a) des ostéoblastes étalées sur une surface faite de cavités (Zinger et al., 2005) b) des ostéoblastes sur une surface de titane sablée ; les cellules sont accrochées dans des microcavités (Zhao et al., 2005)

2.7.2.3. La différenciation ostéoblastique

Lors des différents stades de différenciation ostéoblastique, le phénotype est caractérisé par l'expression des marqueurs spécifiques tels que la phosphatase alcaline, l'ostéonectine, l'ostéopontine, l'ostéocalcine, et la Bone Sialo-Protein (BSP). La séquence de développement du phénotype ostéoblastique comporte trois étapes: la prolifération cellulaire et la biosynthèse de la matrice extracellulaire, la maturation de cette matrice et la minéralisation (Stein et al., 1996). In vitro, la durée de ces étapes varie d'un modèle à l'autre et parmi les facteurs déterminants on cite la méthode de la récupération des cellules et les conditions de culture.

Plusieurs études ont évalué le phénotype des ostéoblastes sur des surfaces en titane modifiées. Les modifications topographiques de surface influent sur le phénotype ostéoblastique. Postiglione *et al.*, (2003) ont étudié l'expression de certains marqueurs de phénotype de Saos-2 sur les surfaces en titane lisses, sablées et plasma spray. Leurs travaux ont montré que sur les surfaces TPS (plasma-spray), l'activité de la phosphatase alcaline et la synthèse des

protéines de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, le collagène type I, et la vitronectine sont augmentées. En opposition, l'activité de la phosphatase alcaline et l'expression d'ostéocalcine n'était pas modifiées pour les cellules dérivées de l'os mandibulaire humain. La différenciation des ostéoblastes, sur les surfaces en titane modifiées par les ions calcium, est plus élevée que sur les surfaces modifiées par les ions phosphates (**Feng et al., 2004**). La technique d'obtention des modifications topographiques de surface en titane influe également sur le phénotype ostéoblastique. Les ostéoblastes de calvaria de rat ont été cultivés sur des surfaces en titane polies, sablées et mordancées. Le nombre et les dimensions des nodules minéralisés ont augmentés sur les surfaces sablées et mordancées (**Wieland et al., 2005**).

L'influence des modifications biochimiques de surface en Ti6Al4V a été étudiée à l'aide de cellules de calvaria de rat (**Bierbaum et al., 2003**). Des différences de l'activité phosphatase alcaline, et du dépôt de minéral ont été observées en fonction du collagène utilisé pour recouvrir les surfaces. Les résultats obtenus avec une surface recouverte de collagène de type III ont montré une augmentation de l'activité phosphatase alcaline, et des dépôts minéraux.

En conclusion lorsque les cellules adhèrent à la surface, elles ont un comportement différent selon le type de surface qui va induire la prolifération et/ou la différenciation cellulaire. Plusieurs surfaces ont été testées à l'aide d'une multitude des modèles des cultures cellulaires et le processus d'adhésion, de la prolifération et de la différenciation cellulaire varie aussi d'un modèle cellulaire à l'autre. Les variétés des titanes utilisées, leurs différences d'usinages ainsi que les différences dans les temps de cultures rendent les comparaisons entre les études difficiles.

2.8. Objectifs de l'étude

Les cellules s'attachent à la surface implantaire après l'adsorption du fluide biologique. L'adsorption des protéines du fluide dépend des caractéristiques chimiques de la surface. Le profil des protéines adsorbées et leur conformation tridimensionnelle influencent le comportement de cellules procaryotes et eucaryotes.

Le titane et ces alliages représentent des matériaux de choix pour les applications biomédicales mais le problème d'infection est une des causes principales d'échec de l'ostéointégration. Certains polymères à la base de PMMA porteurs de groupements sulfonates et carboxylates diminuent significativement ($\geq 90\%$) l'adhésion du *S. aureus in vitro*, l'inhibition de l'adhésion du *S. aureus* sur les copolymères varie en fonction de la composition en sulfonate/carboxylate (Berlot et al., 2002).

Ces polymères sont capables selon leur composition chimique, de modifier non seulement l'adhésion bactérienne mais aussi l'adhésion et la prolifération des cellules eucaryotes telles que les cellules épithéliales (Latz et al., 2003), et les fibroblastes (El Khadali et al., 2002), et ou les ostéoblastes en culture primaire. Nous avons aussi formulé l'hypothèse que le greffage de polyNaSS sur les surfaces en titane peut donner des surfaces dotées à la fois des propriétés antibactériennes et cytocompatibles.

Pour cette étude le modèle de culture de calvaria de fœtus de rat de 18 jours a été choisi. Ce modèle permet d'étudier en culture la différenciation cellulaire menant à la minéralisation (Collin et al., 1992). Les cellules cultivées en présence de la vitamine C et de β -glycérophosphate expriment le collagène de type I, l'ostéocalcine, la phosphatase alcaline et

des nodules de minéralisation (**Anagnostou et al., 1996**).

Les travaux de thèse portent sur l'adhérence de *S. aureus* et les fonctions des ostéoblastes de calvaria de rat (l'adhésion, prolifération et la différenciation des ostéoblastes sur des surfaces de titane greffée des polyNaSS).

3. Matériels et méthodes

3.1. Préparation des carrés de titanes greffés avec de polymères bioactifs

Les tests biologiques ont été réalisés sur des carrés de titane pur commercial (*alfa aesar*) de 1 cm² de surface et de 1 mm d'épaisseur. Trois types de surface en titane ont été utilisées :

1-Titane (Ti) : carrés de titane pur qui n'ont subi aucun traitement chimique (surface référence).

2-Titane oxydé (Ti Ox) : ont subi des attaques chimiques qui créent des groupements TiOH et TiOOH de type peroxyde à la surface du titane.

3-Titane greffé (Ti G) : Par chauffage à 70°C, on décompose les groupements TiOOH en radicaux libres $TiO\bullet$ qui serviront d'amorceur pour polymériser par voie radicalaire un monomère de styrène sulfonate de sodium polyNaSS (*Fluka*). L'objectif est de greffer à la surface du titane un polymère porteur de fonctions sulfonate.

3.1.1. Greffage par polymérisation radicalaire

L'ensemble des étapes du greffage par polymérisation radicalaire ont été fait dans une boîte à gants où il règne une atmosphère exempte d'oxygène, sous argon. En effet, des traces d'oxygène inhibent la polymérisation radicalaire.

3.1.1.1. Préparation de la surface

Avant de procéder à l'oxydation puis au greffage, les carrés ont lavées à l'acétone dans un bain à ultrasons, afin de nettoyer leur surface, et elles ont été séchées dans une étuve pendant 1 heure. Puis les carrés de titane sont attaquées chimiquement et oxydées dans un mélange d'acide sulfurique (*Acros organics*) et de peroxyde d'hydrogène 30% M. (*Aldrich*), en proportion 50/50 en volume. L'acide sulfurique attaque chimiquement la surface en enlevant la couche d'oxyde natif, qui se forme spontanément lorsque le titane est exposé à l'air libre. Le peroxyde d'hydrogène, quant à lui, va permettre de créer des hydroperoxydes de titane à la surface du matériau ; ces entités seront des donneurs de radicaux libres (**Figure 7**)

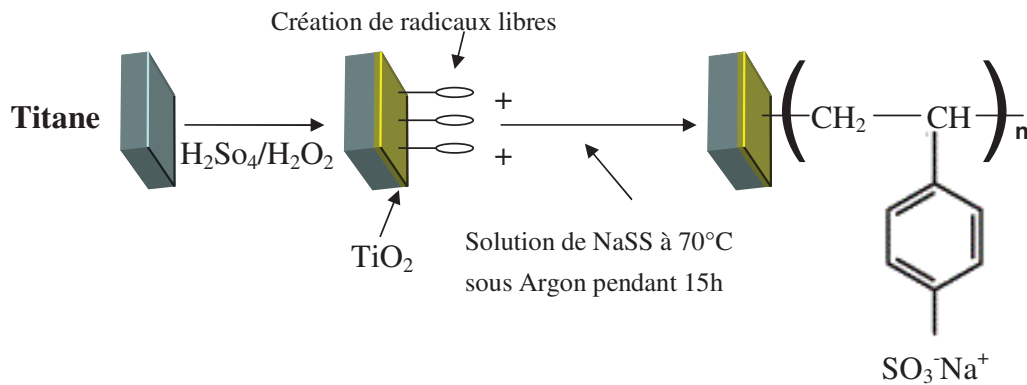


Figure 7 : Polymérisation radicalaire du polyNaSS sur le titane

Les deux réactifs sont versés l'un après l'autre ; d'abord l'acide (1min) puis le peroxyde d'hydrogène (3min). La réaction est exothermique et s'accompagne d'un dégagement gazeux. Parallèlement, la solution d'oxydation prend une coloration allant du jaune au rouge brique. Le matériau, ainsi oxydé, subit plusieurs lavages à l'eau distillée.

3.1.1.2. Greffage et polymérisation

Les échantillons ainsi oxydés et rincés sont ensuite mis au contact d'une solution de polyNaSS à 0,7 M. Les carrés de titane et la solution de monomère polyNaSS sont ensuite chauffées à 70°C pendant 17h (**Figure 7 et 8**).

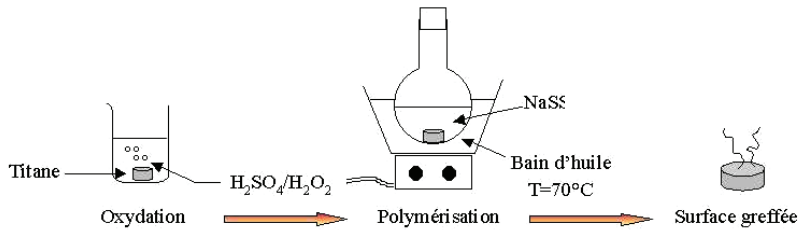


Figure 8 : Schéma du protocole de greffage par polymérisation radicalaire

La chaleur provoque la rupture homolytique de la liaison peroxyde (O-O) et donne des radicaux libres $TiO\bullet$. Ces radicaux servent à amorcer la polymérisation radicalaire des monomères vinyliques polyNaSS. A la fin de la polymérisation, les échantillons sont lavés abondamment à l'eau distillée afin d'éliminer l'homopolymère formé en solution, susceptible d'être mêlé avec les chaînes de polymère greffées. Ils sont ensuite conditionnés par des lavages dans différentes solutions.

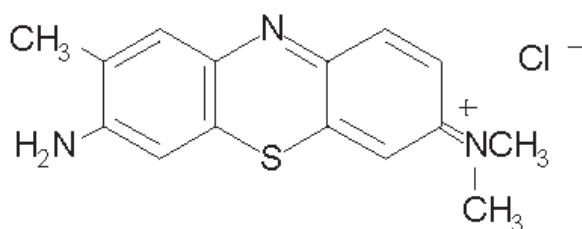
3.1.1.3. Caractérisation des surfaces greffées

La technique la plus couramment utilisée au LBPS pour caractériser le greffage de polyNaSS est une technique de colorimétrie dont la molécule chromophore est le Bleu de Toluidine (*Acros Organics*). Il s'agit, en effet, d'une technique peu onéreuse et facile à mettre en œuvre.

3.1.1.3.1. Dosage colorimétrique au Bleu Toluidine (BT)

1) Principe

Le Bleu de Toluidine est une molécule chromophore qui absorbe dans le visible autour de 633 nm. Cette molécule a la particularité de se complexer, via son groupement $N^+(CH_3)_2$, avec les groupements anioniques ($-COO^-$) (Sano et al., 1993). Une mole de Bleu de Toluidine se complexe avec une mole de groupement carboxylate (Ciobanu et al., 2006). Ceci nous permet donc, à partir de la quantité de BT dosée, d'en déduire la quantité de monomère greffé. Nous avons transposé cette propriété au polyNaSS, qui possède un groupement sulfonate ($-SO_3^-$).



Molécule de Bleu de Toluidine

2) Protocole de coloration et de dosage

Les échantillons sont mis au contact d'une solution de Bleu de Toluidine à $5.10^{-4}M$, ajustée à pH 10. L'ensemble échantillons/BT est incubé à $30^{\circ}C$ pendant 6h. Cette étape permet de complexer le Bleu de Toluidine aux molécules greffées. Les échantillons sont ensuite rincés abondamment avec une solution d'hydroxyde de sodium $1.10^{-4}M$, jusqu'à obtenir une solution de rinçage limpide. Ces rinçages permettent d'éliminer tout le Bleu de Toluidine qui ne se serait pas complexé lors de l'incubation.

Le Bleu de Toluidine complexé est ensuite décomplexé au moyen d'une solution d'acide acétique 50% (*Sigma*). Les échantillons restent au contact de cette solution pendant 24h.

La solution de décomplexation est ensuite dosée par spectrophotométrie à l'aide d'un spectrophotomètre de type SAFAS XENIUS piloté par son logiciel. A partir de la droite étalon du Bleu de Toluidine, nous avons calculé son coefficient d'extinction. La loi de Beer-Lambert (*équation 1*) nous permet de calculer la concentration en Bleu de Toluidine de la solution dosée, et donc la concentration en monomère greffé, si l'on applique l'hypothèse formulée précédemment.

$$A = \varepsilon * l * c \quad \text{équation 1}$$

Avec A= absorbance à 633 nm

ε = le coefficient d'extinction du BT (ici $\varepsilon = 51230.mol^{-1}.cm^{-1}$)

l = la longueur de trajet optique (ici $l=1cm$)

c = la concentration de la molécule qui absorbe.

A partir de la concentration ainsi calculée et de l'équation 2, il est possible d'en déduire la

densité de greffage.

$$d(\text{greffage}) = \frac{(\text{Monomère}) * V * M_{\text{monomère}}}{m_{\text{éch}} \cdot \text{ou} \cdot S_{\text{éch}}} \quad (\text{en g/g Ti ou en g/cm}^2) \quad \text{équation 2}$$

avec V = volume de la solution dosée

$M_{\text{monomère}}$ = masse molaire du monomère

$m_{\text{éch}}$ = masse de l'échantillon greffé (g)

$S_{\text{éch}}$ = surface de l'échantillon greffé (cm²)

En revanche, la densité de greffage reflète le nombre de motifs unitaires greffés mais ne nous donne pas sa répartition. La densité de greffage est donnée en g/cm² de pastille de titane.

3.1.1.3.2. Spectroscopie Infrarouge a Transformée de Fourier (IRTF)

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau.

1) Principe

Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchié ou transmise. Le domaine infrarouge entre 4000 cm⁻¹ et 400 cm⁻¹ (2.5 – 25 μm) correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules.

Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. Pour une géométrie donnée on peut déterminer les modes de vibration actifs en infrarouge grâce à la Théorie des Groupes. La position de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse.

Par conséquent à un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau.

L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités de l'absorption. La **Figure 9** décrit le schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier.

Le faisceau infrarouge provenant de la source A est dirigé vers l'interféromètre de Michelson qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Dans l'interféromètre le faisceau lumineux arrive sur la Séparatrice. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe, le reste passe à travers la séparatrice et est dirigé sur le miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinent, des interférences destructives ou constructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique.

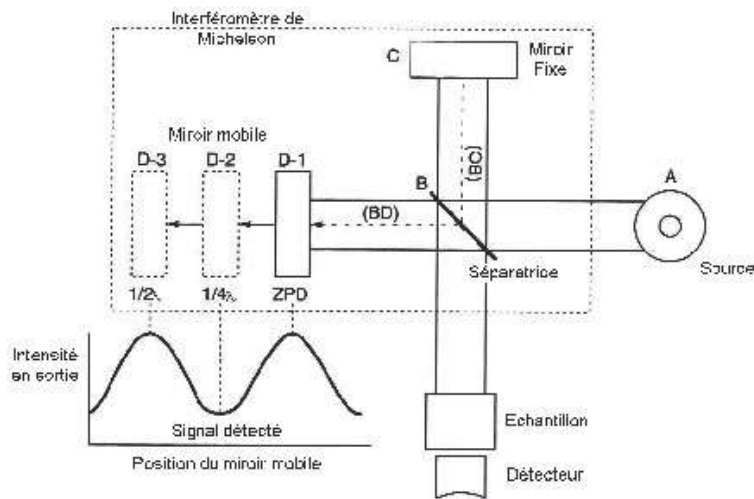


Figure 9 : Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier

Le signal du détecteur apparaît comme un interférogramme (**Figure 10**), c'est à dire une signature de l'intensité en fonction de la position du miroir. L'interférogramme est la somme de toutes les fréquences du faisceau.

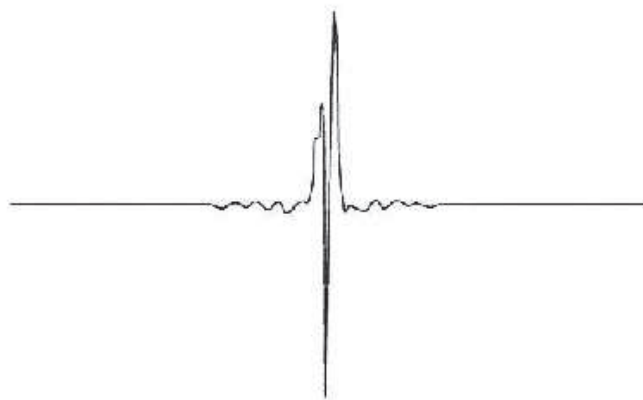


Figure 10 : Interférogramme en sortie du détecteur

Cet interférogramme est ensuite converti en un spectre infrarouge par une opération mathématique appelée transformée de Fourier. Des exemples de spectres ainsi obtenus sont montrés sur les **Figures 9 et 10**.

Les informations tirées des spectres sont de deux sortes :

- A) **Informations qualitatives** : Les longueurs d'onde auxquelles l'échantillon absorbe, sont caractéristiques des groupes chimiques présents dans le matériau analysé. Des tables permettent d'attribuer les absorptions aux différents groupes chimiques présents. Le **Tableau 4** présente les bandes de vibrations caractéristiques des principales fonctions rencontrées dans les composés organiques. Les spectres de quelques composés organiques sont montrés sur la **Figure 11**.

Composé	Vibrations caractéristiques	Fréquence de vibration (cm ⁻¹)
Alcane	CH _x <i>stretching</i>	2950-2850
	CH _x <i>déformation</i>	1500-1400
Insaturé	CH _x <i>stretching</i>	3050-3000
	C=C <i>stretching</i>	1600-1500
	Aromatique substitué (CH)	1900-1700
	Aromatique <i>bending</i>	800-750
Alcool	OH <i>stretching</i>	3400 (large)
	C-O <i>stretching</i>	1050-1250
	OH <i>déformation</i>	(1 ^{aire} <2 ^{aire} <3 ^{aire} <Phénol)
Cétone	C=O <i>stretching</i>	1690-1680
Aldéhyde	H-C=O	2800-2650
	C=O <i>stretching</i>	1710-1700
Acide	OH (avec liaison hydrogène)	3200-2500 (large)
	C=O <i>stretching</i>	1725-1700
	C-O	1440-1395, 1320-1210
	OH <i>déformation</i>	950-900
Sel de l'acide	COO ⁻ <i>stretching antisymétrique</i>	1615-1650
	COO ⁻ <i>stretching symétrique</i>	1400-1300
Ester	C=O	1775-1720
	Aromatique	1250-1100
Amine	NH <i>stretching</i>	3400-3300 (1 ^{aire} >2 ^{aire})
	NH <i>déformation</i>	1650-1550 (1 ^{aire} >2 ^{aire} >Arom.)
	C-N <i>stretching</i>	1350-1250 (1 ^{aire} <2 ^{aire} <Arom.)
Amide	NH <i>stretching</i>	3350-3070 (1 ^{aire} >2 ^{aire})
	C=O	1680-1630
	NH <i>déformation</i>	1650-1515 (1 ^{aire} >2 ^{aire})
	C-N <i>stretching</i>	1180-1040 (1 ^{aire} <2 ^{aire})
Nitrile	C≡N	2250
Isocyanate	N=C=O	2275
Sulfone	S=O	1100-1000
	C-S <i>stretching</i>	740-690
	SO ₂	1380-1300
Halogénure	C-F	1400-1000
	C-Cl	1175-650
	C-Br	590-510
	C-I	525-485

Tableau 4 : Fréquences de vibrations des principales fonctions rencontrées dans les composés organiques.

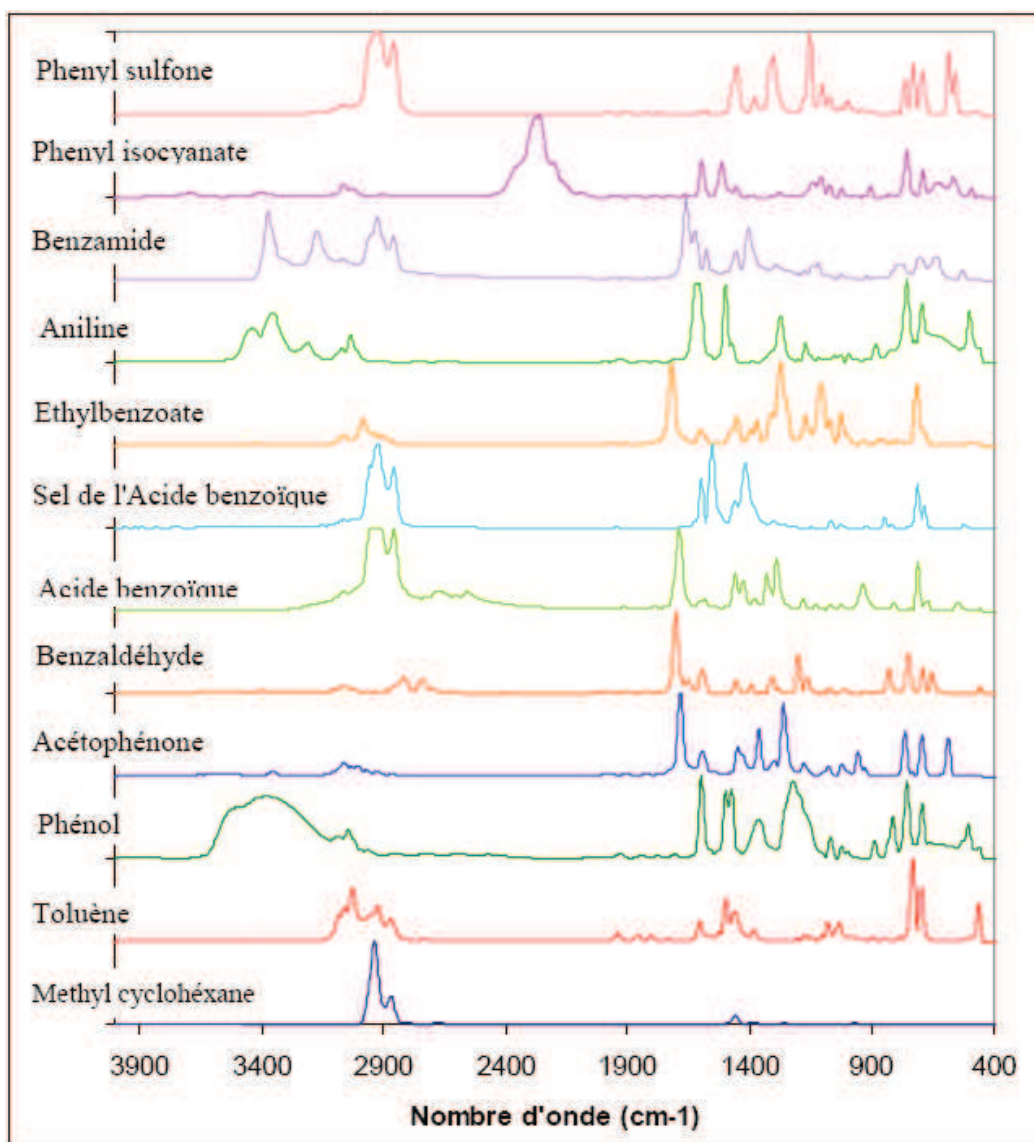


Figure 11 : Spectres de différents composés organiques

Un même groupe peut donner lieu à plusieurs types de vibrations et donc à des absorptions à différentes fréquences. Ainsi le silicium lié à 4 atomes d'oxygène de la silice donne trois type de vibrations : Si-O stretching (1080 cm^{-1}), Si-O bending (805 cm^{-1}), Si-O rocking (450 cm^{-1}) comme le montre la **Figure 12**.

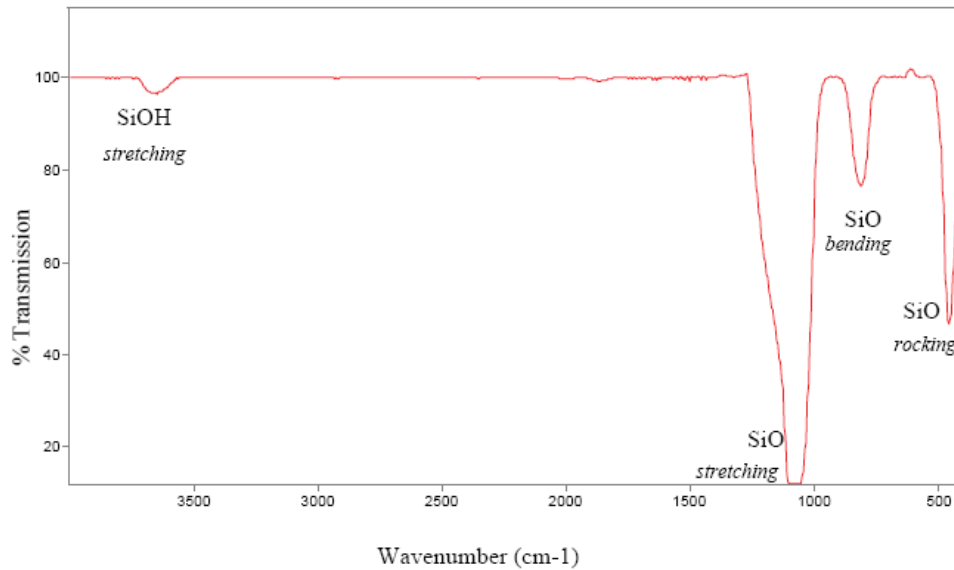


Figure 12 : Exemple de spectre infrarouge d'une couche de type silice

B) Informations quantitatives : L'intensité de l'absorption à la longueur d'onde caractéristique est reliée à la concentration du groupe chimique responsable de l'absorption. En mesurant l'aire du signal caractéristique on peut, si on connaît l'épaisseur de la couche, comparer la proportion d'un groupement chimique donné dans plusieurs échantillons ou si on a une composition constante avoir une idée de l'épaisseur des films les uns par rapport aux autres. Pour avoir une mesure absolue il convient d'étalonner auparavant les couches par une autre technique pour pouvoir établir une relation expérimentale entre intensité du signal et proportion ou épaisseur.

Un exemple est montré dans la **Figure 13**. Sur cette figure nous avons représenté les spectres infrarouge de couches de type $\text{SiO}_x\text{C}_y\text{H}$ déposées par plasma d'héxaméthylsiloxane ($(\text{CH}_3)_3\text{Si-O-Si}(\text{CH}_3)_3$) dans des conditions différentes. Le spectre A montre que la couche obtenue a conservé en partie la structure du précurseur avec la présence des liaisons Si-CH_3 et $\text{Si}-(\text{CH}_3)_3$ alors que sur le spectre B ces liaisons ont pratiquement disparu.

Si on fait le rapport Aire Si-CH₃ / Aire Si-(O,C) on obtient ainsi une grandeur caractérisant le caractère plus ou moins organique de la couche.

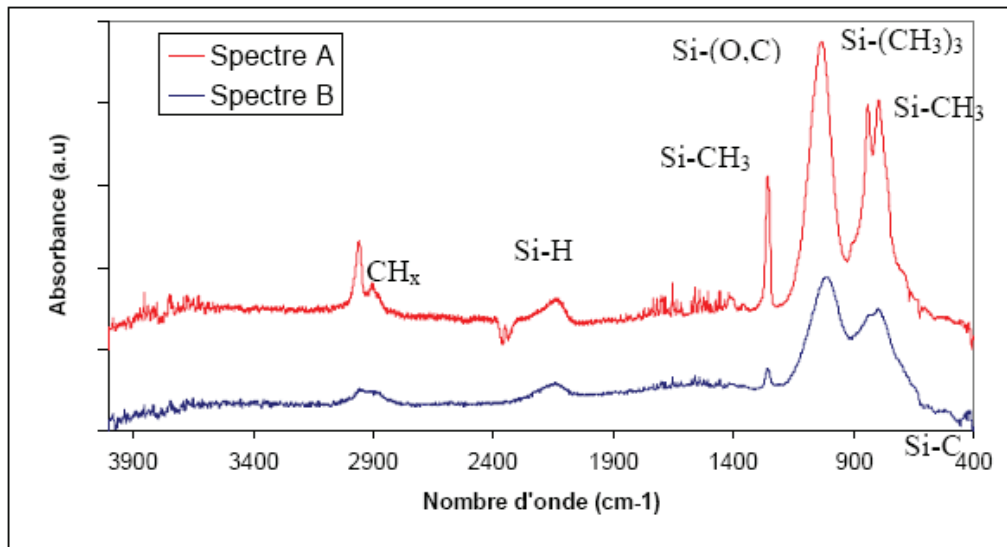


Figure 13 : Spectres infrarouge de films réalisés par plasma de HMDSO

Cette méthode d'analyse est simple à mettre en oeuvre et non destructrice. Elle permet d'analyser aussi bien les matériaux organiques que les matériaux inorganiques. La grande diversité des montages expérimentaux permet la caractérisation de pratiquement tout type d'échantillon, quel que soit leur état physique ou de surface :

- Couches déposées sur un substrat transparent en infrarouge : montage en transmission.
- Couches déposées sur un substrat non-transparent en infrarouge : montage de Réflexion Totale Atténuée (ATR).
- Films polymères : montage en transmission (si épaisseur faible <10μm), montage de Réflexion Totale Atténuée (ATR).
- Poudres (dispersée dans une pastille de KBr) : montage en transmission

Cependant, dans le cas de couches inférieures à 500 Å d'épaisseur, la spectroscopie IRTF conventionnelle atteint ses limites de sensibilité et de détection.

La préparation des disques, le greffage et la caractérisation ont été réalisées au LBPS.

3.1.2. Conditionnement et conservation

Le conditionnement des pastilles de titane a consisté en une série de lavages dans différentes solutions sous agitation :

-3 fois 3h dans du NaCl 1.5M

-3 fois 3h dans du NaCl 0.15M

-3 fois 3h dans de l'eau ultra pure

-3 fois 3h dans du PBS (*Eurobio*) stérile

Après le dernier lavage les disques sont soit stérilisés sous une lampe U.V. (254 nm), 15 minutes par face puis repartis par groupe de trois dans des boîtes de culture. Pour une utilisation ultérieure, des disques sont stockés à -80 °C.

3.2. L'adhérence bactérienne avec coloration à l'iodure de propidium

3.2.1. Préparation des suspensions bactériennes

Pour cette étude nous avons utilisé le *Staphylocoques aureus* Cowan I (ATCC No.12598), les bactéries ont été conservées au -80°C dans lait écrémé (*DIFCO Laboratories*) contenant 10% de glycérol (*Sigma*). Puis elles ont été transférées du cryotube à la gélose à l'aide d'une loop stérile et elles ont étéensemencées à de grands intervalles afin d'obtenir des colonies séparées, elles étaient ensuite conservées à 4°C. Pour chaque expérience une colonie a été prélevée et mise dans un tube contenant 1 ml de milieu de culture MHB (*Mueller Hinton Broth, Sanofi-Pastur*) puis incubée toute la nuit à 37°C (**François et al., 1997**).

Après une centrifugation (15 min, à 3500 rpm) les bactéries ont été re-suspendues dans 1ml de PBS. A partir de cette suspension on prélève 160 µl et on les ajoute dans 1ml du milieu de la culture et après une incubation de 3h à 37°C (culture exponentielle), le culot est récupéré par une centrifugation (15 min à 3500 rpm) et il est re-suspendu dans 20ml PBS.

Afin d'évaluer le nombre de bactéries/ml de cette solution, l'absorbance a été mesurée par rapport à une courbe standard d'absorbance versus le nombre de bactérie sur gélose. La suspension bactérienne a été diluée afin d'obtenir 5×10^6 bactéries/ml (D1), $2,5 \times 10^6$ bactéries/ml (D1/2), $1,25 \times 10^6$ bactéries/ml (D1/4) et $0,625 \times 10^6$ bactéries/ml (D1/8).

3.2.2. Ensemencement des bactéries sur les carrés de titane

On place les carrés de titane dans des puits d'une plaque de culture (24 puits). Sur chaque carré on ajoute 1ml de solution de séralbumine bovine BSA (*Sigma*) à 0,4g/l, et on laisse incuber 30min à 37°C sous agitation. Les carrés sont ensuite lavés 3 fois au PBS, et incubés avec 1ml de la solution protéique (Fibrinogène 300µg/ml ou Plasma humain), 30min à 37°C sous agitation, et lavés 3 fois au PBS/BSA (0,4 g/l). Puis, elles sont incubées avec 1ml de suspension bactérienne, pendant 1h à 37°C sous agitation et lavés 3 fois au PBS.

3.2.3. Coloration au iodure propidium et comptage des bactéries sur les surfaces de titane

Les bactéries adhérentes sur chaque surface de titane sont visualisées à l'aide d'iodure de propidium PI. Les bactéries sont fixées avec 400µl de formaldéhyde à 4% (*Sigma*), 30 min à 4°C, et lavées au PBS 3 fois. Les bactéries ainsi fixées sont marquées avec 200 µl de PI à 0,05mg/ml pendant 5 min, ensuite les surfaces sont lavées 3 fois au PBS.

Pour l'observation au microscope les surfaces en titane sont montées entre lame et lamelle et pour chaque surface étudiée 15 photos ont été prises, et le nombre de bactéries sur chaque photo a été compté.

3.3. Culture cellulaire de Calvaria de fœtus de rat

Cette étude est effectuée à l'aide de modèle d'ostéoblastes de calvaria de fœtus de rats de 18 jours. (Nefussi et al., 1985 ; Anagnostou et al., 1996).

3.3.1. Prélèvement

Après la dissection des crânes de fœtus de 18 jours de rats Wistar les os frontaux et pariétaux sont prélevés et incubés dans une solution de PBS/collagénase (*Sigma*) (10 ml) à 2,5 mg / ml, 1h30 à 37°C. Les cellules sont dissociées par pipetage répété puis lavées par 3 centrifugations à 1500 tours/minute, dans un milieu de culture (Dulbecco Modified Eagle Medium) DMEM (*Gibco*) contenant du sérum de veau foetal SVF (*biowest*) pour désactiver et éliminer la collagénase. Le culot cellulaire est re-suspendu dans du milieu de culture DMEM supplémenté par 10% de SVF et 1% de solution antibiotique ATB (50 UI/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine) (*Eurobio*).

3.3.2. Culture primaire

Les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Mallassez etensemencées à une densité de 2×10^4 /cm² dans des boites de culture (75 ou 175 cm² de surface). Elles sont cultivées dans du milieu de culture supplémenté de 10% de SVF, 50 µg/ml d'acide ascorbique

(Vitamine C) (*Sigma*), 10 mM de β -GlycéroPhosphate β -GP (*Sigma*) et 1% de ATB (milieu complet), à 37°C, en atmosphère humide (95% H₂O) contenant 5% de CO₂. Les cellules sont lavées 4 heures après l'ensemencement afin d'éliminer les cellules hématopoïétiques puis elles sont cultivées jusqu'au stade de confluence, atteint au bout de 48 –72 h.

3.3.3. Culture secondaire

Une fois la confluence atteinte, les cellules sont détachées par trypsinisation. Après lavage (deux fois au PBS), les cellules sont trypsinisées pendant 3 minutes à 37°C avec une solution de trypsine EDTA à 0,005% (*Sigma*). Le culot cellulaire récupéré par centrifugation (5 minutes à 1500g/m), puis re-suspendu dans du milieu complet. Par la suite, les cellules sont comptées et ensemencées soit en fond de puits de 2 cm² de surface (boîtes de culture de 24 puits) soit sur les carrés de titane modifiées ou non de 1 cm² de surface, pré incubées 24h dans du milieu DMEM et 24h dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal durant. Les cellules sont ensemencées à une densité variable comme est indiqué pour chaque expérience. Les cellules sont cultivées dans le milieu complet, à 37°C, en atmosphère humide (95% H₂O) contenant 5% de CO₂. Le milieu est changé toutes les 48h.

3.3.4. Culture sur les carrés de titane

Des carrés de titanes (titane non modifié, titane oxydé et titane greffé) ont été placés au fond des puits 24 heures avant l'ensemencement.

-Le fond de puit a été utilisé en surface contrôle (Fp)

Les disques de titane et les contrôles ont été pré-incubés 24 heures avec du milieu DMEM et 24 heures avec du milieu DMEM contenant 10% de SVF.

3.3.5. Culture avec la présence de polyNaSS soluble dans le milieu

1) La dialyse

Pour préparer la dialyse, on utilise une membrane perméable. La taille des pores de la membrane est de 1000 Da, ce qui permettra un échange avec le milieu dans lequel se trouve la membrane.

Seules les petites molécules (impuretés) pourront sortir, alors que les macromolécules de polymère resteront dans la membrane.

Cependant, avant d'effectuer la dialyse de polymères, il est nécessaire de nettoyer la membrane. En effet, cette dernière est conservée dans l'azide de sodium toxique qu'il convient d'éliminer.

On a Nettoyé la membrane avant son utilisation pendant 30 min dans bain de l'eau distillée, puis on remplace le bain de l'eau distillée par du PBS à pH= 7,4 et on mis la solution de polymère à 50 mg/ml dans la membrane.

Le but de dialyse est, éliminer les impuretés de la synthèse des polymères et amener le pH de la solution de polymère à pH physiologique (7,4) afin de reconstituer au mieux l'environnement biologique des cellules.

On mesure alors le pH du bain de la dialyse afin de vérifier sa stabilisation à pH = 7,4, et jusqu'à l'obtention de ce pH le bain de PBS est changé plusieurs fois.

2) Caractérisation de polymère

Le polymère est caractérisé grâce à la spectrométrie UV. Cette étude est faite pour le polymère avant la dialyse, après la dialyse et après la filtration.

La spectrométrie est réalisée, grâce au spectromètre UV (Perkin Elmer), sur des longueurs d'ondes allant de 262 nm, car le polyNaSS possède un pic d'absorbance vers 262 nm, pics évoluant selon la concentration de la solution.

Pour faire l'étude de polyNaSS par spectrométrie, on doit tout d'abord diluer la solution de polymère de manière à avoir des concentrations voisines de 0,4 mg/ml permettant d'obtenir des concentrations quantifiables par UV.

Au préalable, nous avons du procéder à un étalonnage UV pour polyNaSS afin de déterminer leur coefficient d'extinction molaire (ϵ en L/mol/cm) : $DO = \epsilon * l * c$ ($l = 1\text{cm}$).

Une gamme de différentes concentrations connues a été réalisée. Pour déterminer la concentration expérimentales, on mesure l'absorbance pour polyNaSS à 262 nm. Les résultats obtenus sont reliés aux courbes d'étalonnage correspondantes. Chaque droite d'étalonnage possède une équation de droite de la forme $y = a*x$, 'y' représente la densité optique et 'x' représente la concentration, ceci d'après la relation $DO = \epsilon * l * c$, on peut alors directement déterminer la concentration du polymère.

Pour déterminer leur concentration théorique, on se sert de la masse molaire de polymère et de la masse initiale incorporée. La dissolution de polymère a été faite en ajoutant 750 mg de polymère en poudre à 15 ml l'eau distillée.

D'où, $\text{concentration} = (m/M) / V = (0,750/M) / 0,015$

(M = masse molaire en g/mol du polymère dont on veut calculer la concentration)

La concentration de polymère est calculée avant la dialyse, après la dialyse et après la filtration.

3) Préparation de polymère pour les manipulations

Après la filtration, on prépare des solutions de polymères à différentes concentrations : 0,1 – 0,33 – 1 – 3,3 – 10 et 33 µg/ml. Ce sont ces solutions qui seront introduites avec les ensemencements cellulaires. Pour obtenir les solutions de polymère aux concentrations indiquées ci-dessus, on effectue les dilutions nécessaires avec du PBS.

3.3.6. Récupération des extraits cellulaire (extraction d'ADN)

Les cellules sont ensemencées dans des puits en triplicate. La culture est arrêtée dans des temps variables comme est indiqué pour chaque expérience. Après l'aspiration du milieu, les disques de titane et le fonds de puits (contrôles) ont été lavés 3 fois avec du PBS et conservés à -80°C.

Pour le dosage de l'activité de la phosphatase alcaline et des protéines, les cellules ont été récupéré dans un tampon d'extraction constitué de NaHCO₃/Na₂CO₃ 100mM, MgCl₂ 1mM, Triton 100X 0,1%, pH 10,2. Afin d'extraire l'ADN, les cellules ont été incubées pendant 1 heure à 4°C avec 200µl du tampon de lyse (0,5% Triton, 150 mM NaCl, 1mM PMSF, 0,02% Sodium Azide, 2mM EDTA). Les extraits cellulaires ont été récupérés, après avoir gratté mécaniquement les surfaces de titane et les fonds de puits. Le culot récupéré par centrifugation (1500g/min pendant 3 minutes) est re-suspendu avec un petit volume de NaCl à 0,1M (100µl), puis ils ont été vortexés et soniqués (puissance 45 W, 2 pulsations /seconde pendant 30 secondes).

3.4. Etude de l'adhérence cellulaire

3.4.1. Comptage

Les surfaces contrôles et les carrées de titane modifiées ou non ont été pre-incubés 24h dans du milieu DMEM et 24h avec du milieu DMEM contenant 10% de SVF avant l'expérience. Les cellules ont étéensemencées en triplicate sur les différents supports pré incubés à deux densités, une densité de 25×10^3 cellules par cm^2 dans des boites de culture des 24 puits pour le comptage automatique, et une densité de $0,5 \times 10^4$ pour le comptage manuel sur le microscope à fluorescence (*Axiolab, Zeiss, Germany*) (2.4.2.) Les cultures ont été arrêtées à 1h et 4h après l'ensemencement. Les milieux contenant les cellules non adhérentes ont été récupérées et mis en suspension dans une solution de l'Isoton II (une solution à la fois isotonique et conductrice (*Beckman Coulter*)) pour comptage automatique (*Coulter Z1, Beckman*). Le fond de puits et les titanes ont été lavés 2 fois au PBS et les solutions de lavage ont été ajoutées aux solutions qui contiennent les cellules non adhérentes.

Les cellules adhérentes ont été incubées avec de la trypsine-EDTA à 0,05% pendant 3 minutes à 37°C à l'incubateur puis dissociées par pipetages et transférées dans une solution de l'Isoton II pour comptage automatique. Le fond de puits et les disques de titane ont été lavés deux fois au PBS et les solutions de lavage ont été ajoutées aux solutions qui contiennent les cellules adhérentes. Le pourcentage des cellules adhérentes sur le titane a été calculé à partir du nombre de cellules récupérées après trypsinisation sur les disques de titane, ensuite rapportés au nombre totale de cellules comptées (non adhérentes et adhérentes sur les titanes et les fonds de puits).

3.4.2. Comptage et morphologie : Coloration de l'actine

Une technique histochimique a été utilisée pour colorer les filaments d'actine en vert (*Molecular Probes*). Pour cette série d'expérimentation, des « disques » *Permanox* ont été utilisées en surfaces contrôle (Fp) permettant après coloration le montage sur lame. Et les cellules sontensemencées à une densité de 5×10^3 . Le microscope à fluorescence a permis l'étude de la morphologie cellulaire sur les différents substrats.

Pour la première expérimentation, à chaque temps étudié (1h, 4h), après lavage deux fois au PBS, les cellules ont été fixées par une solution de PBS contenant 4% de formaldéhyde pendant 30 minutes à 4°C. Puis elles ont été lavées par une solution de PBS contenant 4 g/l de BSA, perméabilisées à l'aide du Triton X100 (*Sigma*) à 0,1% dans du PBS, pendant 5 minutes, à température ambiante. Après blocage des sites non spécifiques, les cellules ont été lavées et incubées en présence du colorant BOPIDY Phalloïdine (*Molecular Probes*) et d'une solution de méthanol. La présence des cellules endommagées sur les différents supports, lors des deux points de la cinétique (1 heure et 4 heures) nous a obligé à changer le protocole, les cellules ont été fixées par une solution de PBS contenant 4% de formaldéhyde directement après la prélèvement de la moitié du milieu de culture. Les disques de titane et les *Permanox* ont été récupérés et montés entre deux lames en présence d'un réactif prolongeant la fluorescence (*Molecular Probes*). L'analyse est effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence.

Pour chaque surface (titane modifier ou non et *Permanox*), 5 photos ont été prises pour le comptage manuel sur le microscope afin d'évaluer le nombre des cellules adhérents sur les différentes surfaces testées.

3.4.3. Morphologie : observation au Microscopie électronique à balayage MEB

1) Principe

Le séchage à l'air ambiant provoque une déshydratation de l'enveloppe cellulaire qui se déforme sous l'effet des tensions de surface lors de l'évaporation de l'eau qu'elle contient. Il s'agit donc par la baisse du point critique d'annuler ces tensions de surface en faisant passer le liquide contenu dans la membrane cytoplasmique à l'état gazeux sans variation de volume.

Pour cela, après avoir fixé les cellules sur la surface des carrés de titane (avec une solution de glutaraldéhyde, qui fixe les protéines de la membrane via les groupes amine), on gélifie les protéines de la membrane cellulaire pour « rigidifier » la structure morphologique des cellules (via le tetroxyde d'osmium, qui est aussi un ultra fixateur des cellules, via leurs phospholipides). On déshydrate ensuite les cellules, en remplaçant progressivement l'eau et le tampon (au pH neutre) qu'elles contiennent par l'éthanol, puis on remplace à nouveau cet éthanol par un solvant (proche de l'acétone et miscible avec l'éthanol), l'acétate d'isoamyle. Ce solvant est miscible au CO₂ liquide : au sein de la chambre de l'appareil à point critique dans laquelle l'échantillon est placé, l'acétate d'isoamyle est progressivement remplacé à son tour par le CO₂ liquide. La chambre monte alors en température à 31,1°C et en pression à 74 bars et atteint le point critique du CO₂, qui passe à l'état gazeux. Il est ensuite évacué de la membrane cellulaire, qui reste « figée » en l'état.

L'échantillon est ensuite métallisé à l'or/palladium pour observation au MEB.

2) Protocole de préparation des échantillons

Les cellules sontensemencées à une densité de $25 \times 10^3 / \text{cm}^2$ sur les surfaces de titane non modifié et modifié, et deux points sont étudiés, 1h et 4h après l'ensemencement.

Après lavage deux fois au tampon cacodylate à 0,05M, pH 7,3, les cellules ont été fixées par 500 μ l de solution de glutaraldéhyde à 3,75% pendant 60min, et en suite on rince soigneusement avec le tampon cacodylate (3 à 4 fois, 10 min/lavage), après la fixation on mis 500 μ l de la solution OsO₄ à 2% sur chaque puits et laisser incubé 1h à 4°C, deux lavage au tampon cacodylate a été fait avant la déshydratations (2 bains de 5min avec les solutions à 15, 30, 50, 70% d'éthanol, puis 3 bains de 10min à 100% d'éthanol), on laisse les surfaces dans bain à 70% d'éthanol pendant 48h, un dernier bain de 5min à 95% d'éthanol a été fait avant les bains acétate d'isoamyle/éthanol 25, 50, 75 et 100% d'acétate d'isoamyle et en fin un séchage au point critique sous CO₂ liquide.

Les photos sont prises à l'UFR 968 de Stomatologie et de chirurgie maxillo-faciale à l'Hôpital Salpêtrière à Paris.

3.5. Etude de la prolifération cellulaire

3.5.1. Quantification de l'ADN

La prolifération cellulaire a été évaluée par quantification de l'ADN cellulaire. Le contenu en ADN double brin a été déterminé par fluorimétrie en utilisant Hoechst (*Sigma*), une molécule qui s'intercalant entre les bases de la double hélice de l'ADN émet une fluorescence. L'émission (460nm) du Hoechst est davantage plus importante quand celui ci est lié à l'ADN que s'il était mesuré librement. Ceci est dû au fait que cet agent intercalant modifie la

conformation structurale de l'ADN. L'intensité de la fluorescence mesurée est directement corrélée au nombre des cellules, on estime qu'une cellule contient environ 6 pg d'ADN. Les extraits cellulaires ont été récupérés comme cités précédemment dans du tampon de lyse qui n'interfère pas avec le dosage de l'ADN cellulaire. Des aliquotes de 10µl d'extraits cellulaires ont été ajoutés à 1ml d'une solution de Hoechst à 1µg/ml (Tris HCL 100mM, EDTA 10mM, NaCl 1M, pH 8). Les échantillons ont été par la suite excités à 365nm et l'intensité de la fluorescence émise a été mesurée à 460 nm à l'aide du spectrofluorimètre (*appareil FL600, Bio-Tek mc*).

3.6. Etude de la différenciation cellulaire

3.6.1. Mesure de l'activité phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline est une monoestérase « phosphohydrolase alcaline » capable de catalyser l'hydrolyse des liaisons P-O, P-S et P-N. Elle peut hydrolyser les phosphomonoesters de hauts poids moléculaires tels que les phospholipides et les phosphoprotéines. Des substrats artificiels tels que le para-nitrophénylphosphate, le phénylphosphate et le β-naphtyl phosphate sont utilisés pour détecter son activité. Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser comme substrat le para-nitrophénylphosphate. La réaction d'hydrolyse s'effectue à pH alcalin, et le résidu déphosphorylé à ce pH est le paranitrophénol, un composé anionique jaune. Celui absorbe fortement à 410 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de produit formé.

Des cultures cellulaires ont été arrêtées à des temps variables, et les cellules ont été extraites, des aliquotes d'extraits cellulaires ont été dilués dans du tampon d'extraction. On ajoute 50 µl d'échantillons et 50 µl de tampon réactionnel AMP (2-amino-2-méthyl- 1 -propanol 10mM,

paranitrophénylphosphate 20 mM, $MgCl_2$ 2 mM, H_2O distillée, pH 10) dans une plaque de 96 puits. La réaction s'est effectuée à 37°C pendant 30 minutes, puis une gamme de paranitrophénol de concentration connue a été établie. L'absorbance a été mesurée à 405 nm (spectrophotomètre appareil μ Quant, *Bio-tek*) et les unités enzymatiques correspondantes ont été calculées. L'unité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzymes qui permet la transformation d'une nanomole de substrat déphosphorylé par minute à 37°C. L'activité spécifique a été mesurée par le nombre d'unités enzymatiques par mg de protéines (nmol de p-NP/min/mg de protéine).

3.6.2. Mise en évidence des nodules de minéralisation

Au 16ème jour de culture, le milieu de culture est aspiré et les cellules (sur les disques de titane ou sur les *Permanox*) sont incubées avec de calcéine (25 μ g/ml) dans du milieu complet à 37°C, pendant 4 heures en atmosphère humide (95% H_2O) contenant 5% CO_2 . Puis elles sont fixées avec une solution de formaldéhyde à 3,7% dilué dans du PBS pendant 10 minutes, à température ambiante. Afin d'éliminer toute cellule non fixée, les puits sont lavés 3 fois au PBS stérile. Les carrés de titane et les *Permanox* sont récupérés puis montés sur lame. L'observation des nodules de calcéine est effectuée au microscope à fluorescence à un agrandissement x10 ou x20. La surface minéralisée a été calculée sur 12 photos au moins pour les trois échantillons de chaque support.

3.6.3. Dosage des protéines totales

La teneur en protéines des extraits cellulaires a été déterminée par la méthode utilisant l'acide bicinchoninique (BCA). Elle est basée sur la réduction d'ion Cu^{2+} en ions Cu^+ par les

protéines en milieu alcalin. Les ions Cu^+ sont détectés grâce à la formation d'un complexe coloré (par chélation d'un ion cuivre avec deux molécules de BCA) qui absorbe à 563 nm. La réaction a été effectuée avec le kit « BCA protein assay reagent» (*Sigma*). Le tampon d'extraction utilisé pour récupérer l'extrait cellulaire, contenant du Triton, n'interfère pas avec la mesure de la teneur en protéines par cette technique. La gamme étalon a été établie à l'aide d'une solution d'albumine de sérum bovin.

3.6.4. Quantification de collagène

La teneur en collagène a été déterminée par quantification colorimétrique utilisant le Sirius Red. La technique Sirius Red F3BA dans l'acide picrique a été utilisée depuis plusieurs années (**Jimenez et al., 1985**).

Le Sirius Red est un colorant anionique fort, colore le collagène en réagissant ses groupes d'acide sulfonique avec des groupes de base présentes dans la molécule de collagène (groupes aminés de lysine et hydroxylysine et groupes guanidine de arginine) (**Junqueira et al., 1979**).

Les cultures ont été arrêtées à des temps variables. Les cellules sont lavées 3 fois au PBS et fixées avec de Bouin (15ml acide picrique saturée + 5ml 35% formaldéhyde + 1ml glacial acétique acide) pendant 1h, puis lavées à l'eau du robinet 15min, et séchées 12 heures, et incubées avec de Sirius Red dilué dans l'acide picrique saturée (1mg sirius red/1ml d'acide picrique saturée) pendant 1h sous agitation, lavées 5 fois à l'acide hydrochlorique (0,01N), et incubées au NaOH (0,01) pendant 30 min sous agitation à température ambiante.

La gamme étalon a été établie à l'aide d'une solution de collagène connue. L'absorbance a été mesurée à 540 nm (spectrophotomètre appareil μ Quant, *Bio-tek*) (**Tullberg-Reinert et al., 1999**).

4. Résultats

4.1. Greffage de polymère polyNaSS

Les différents carrés de titane ont été préparés au LBPS (Institut Galilée). Le monomère polyNaSS portant des groupements anioniques sulfonate ($-\text{SO}_3^-$) a été greffé à la surface de titane par polymérisation radicalaire. L'oxydation des échantillons de titane dans un mélange d'acide sulfurique pur et de peroxyde d'hydrogène (30%) produit à la surface de titane une couche des hydroperoxydes de titane. Et en suit l'immersion des échantillons de titane dans une solution aqueuse chauffée des monomères, décompose les hydroperoxydes de titane en radicaux libres et initie la polymérisation des monomères (**Hélary et al., 2009**).

4.2. Caractérisation des surfaces de titane greffées

La présence de polymère greffé sur la surface en titane a été vérifiée par deux méthodes : dosage colorimétrique au bleu de toluidine et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).

4.2.1. Dosage colorimétrique au bleu toluidine (BT)

La concentration de polymère greffé a été mesurée à l'aide d'une technique de colorimétrie comme décrit dans matériels et méthodes, et a été considérée comme le rendement de la réaction de greffage. Les carrés en titane non modifiés et en titane oxydés ont été utilisés comme surfaces contrôles. Aucune coloration n'a pu être observée au niveau des échantillons

de contrôle, Ceci confirme par ailleurs que le bleu toluidine observé il est uniquement due à la décomplexation de bleu toluidine à partir des unités monomères du polymère bioactifs, et par conséquent, à la présence de polyNaSS à la surface du titane greffé. La concentration de polyNaSS mesurée par la concentration du bleu de toluidine sur les carrées de titane greffé a été $2 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

4.2.2. Spectroscopie infrarouge a transformée de Fourier (IRTF)

La présence du polymère polyNaSS sur la surface en titane a été caractérisée par IRTF. Le spectre IRTF pour les échantillons de titane greffés montre la présence des pics caractéristiques des groupes sulfonates à 1010 cm^{-1} 1041 cm^{-1} sur leur surface. En revanche il n'y a pas de pic sur les surfaces en titane non modifié et en titane oxydé.

La **Figure 14A** présente l'analyse des groupements chimiques polyNaSS par IRTF, et la **Figure 14B** montre l'analyse de la surface en titane greffé avec les pics caractéristiques des groupes sulfonates en surface.

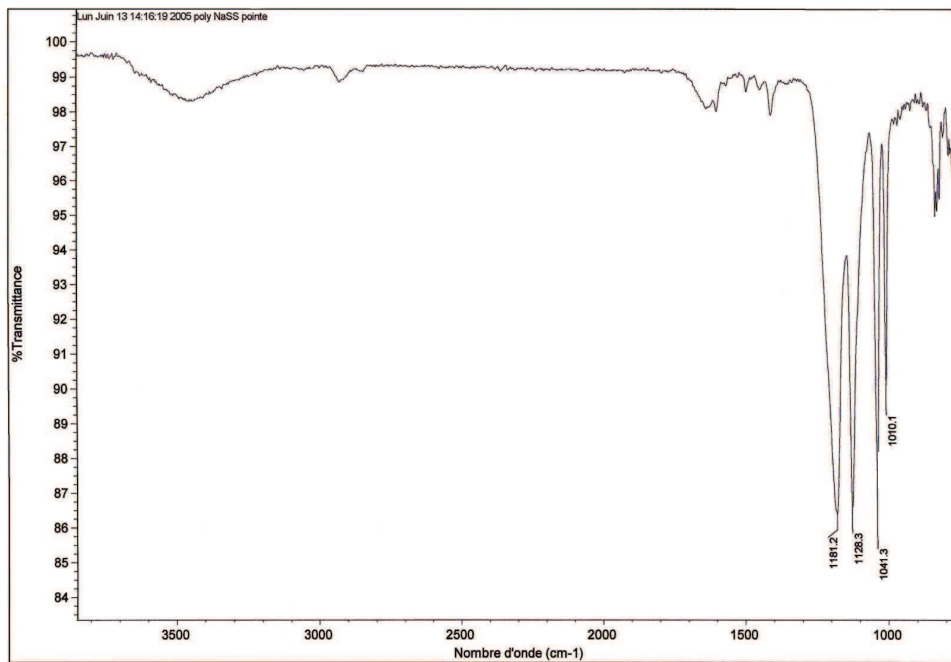


Figure 14A : Spectre IRTF des groupements chimiques sulfonates

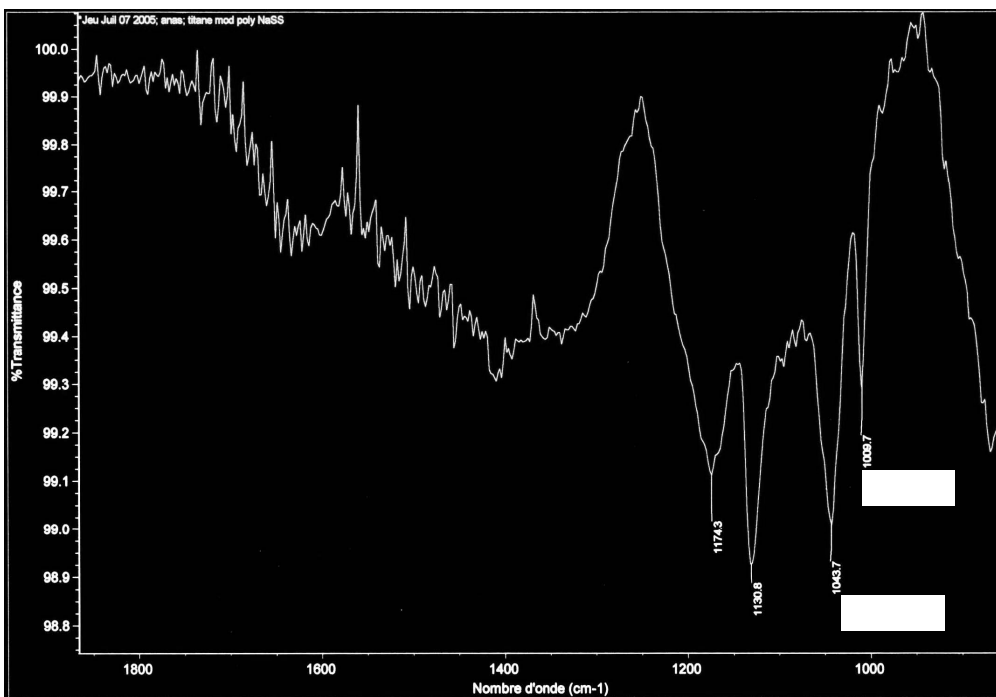


Figure 14B : Spectre IRTF de la surface en titane greffée avec la présence les pics caractéristiques des groupements sulfonates en surfac

4.3. L'Adhérence bactérienne avec coloration à l'Iodure de propidium

Les surfaces de titane testées, on été pre-incubées avec plasma humain ou du fibrinogène, puis nous avons ensemencées des concentrations croissantes de *Staphylocoques aureus* Cowan I (ATCC No.12598) sur les échantillons de trois surfaces testées. Le nombre des bactéries adhérentes après 1 heure sur les supports en titane (le titane non modifié, le titane oxydé et le titane greffé avec des groupements sulfonates) est illustré à la **Figure 15**.

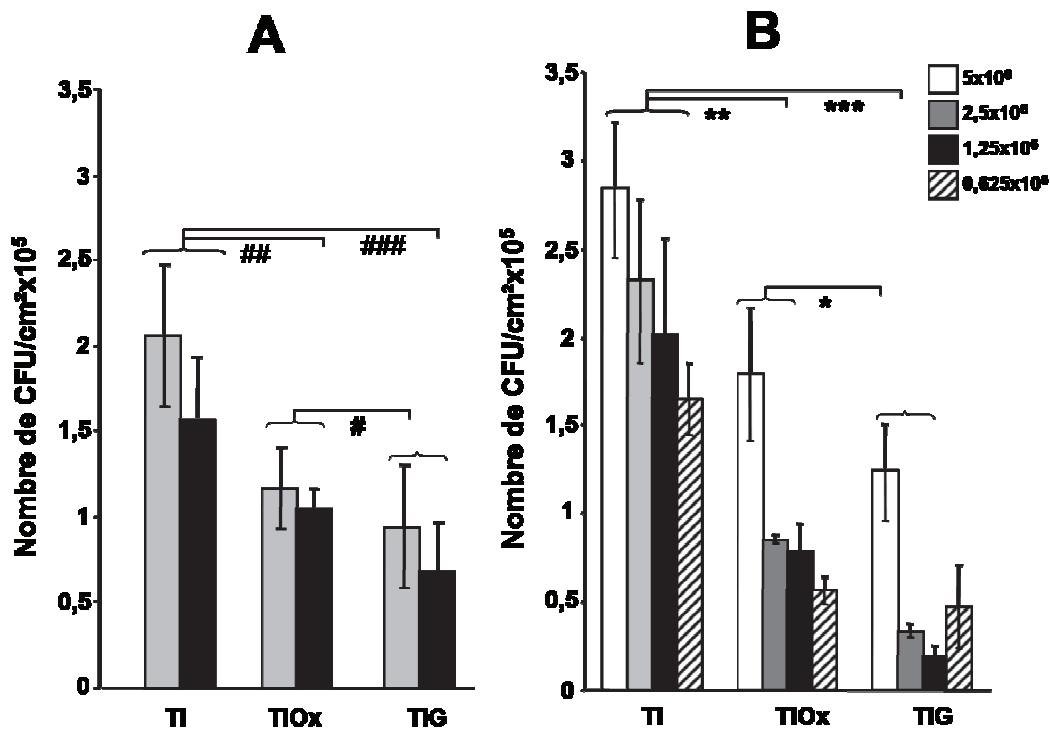


Figure 15 : Nombre des bactéries adhérentes sur les différentes surfaces en titane

(A : Pre-incubées avec Fibrinogène ; B : Pre-incubées avec Plasma humain) avec différents concentrations bactérienne.

- ### Différence significative par rapport au TiG (ANOVA, p < 0,01)
- ## Différence significative par rapport au TiOx (ANOVA, p < 0,01)
- # Différence significative par rapport au TiG (ANOVA, p < 0,05)
- *** Différence significative par rapport au TiG (ANOVA, p < 0,01)
- ** Différence significative par rapport au TiOx (ANOVA, p < 0,01)
- * Différence significative par rapport au TiG (ANOVA, p < 0,01)

Dans le cas des surfaces pre-incubées avec le fibrinogène, l'inhibition de l'adhésion du *S aureus* sur les surfaces greffées est de l'ordre de 57% et de 36 % comparé a celle observée sur les surfaces non modifiés et surfaces oxydées respectivement. Cette inhibition est observée uniquement avec la concentration de la suspension de $1,25 \times 10^6$ CFU/ml (**Figure 15A**). Quant aux surfaces pre-incubées avec du plasma humain, l'inhibition de l'adhésion du *S aureus* est pour les deux surfaces, oxydées et greffées 75% et 90% respectivement (**Figure 15B**). Cette inhibition très importante est observée pour toutes les concentrations testées.

4.4. Les comportements cellulaires sur des surfaces greffées avec polyNaSS

4.4.1. Adhésion des cellules de calvaria de fœtus de rat fœtal sur les différentes surfaces en titane

4.4.1.1. Comptage des cellules adhérentes

Une première série d'expérimentations a été réalisée afin d'établir la cinétique de l'adhésion des cellules de calvaria de foetus rat et de déterminer le temps d'incubation nécessaire pour que le nombre de cellules adhérentes soit maximal. Les cellules ont étéensemencées à 25×10^3 c/cm² sur les fonds de puits pre-incubées (24 heures avec du milieu DMEM et 24 heures avec du milieu DMEM contenant 10% de SVF) pendant de temps variant de 15min à 5h 30min. Pour chaque puit, les cellules adhérentes et les cellules dans le surnageant ont été comptées et les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules adhérentes. Le pourcentage de cellules adhérentes est de l'ordre de 20% après 15 min, et il augmente de façon linéaire, de 30 min à 2 heures et atteint un plateau (70% de cellules adhérentes) (**Figure 16**).

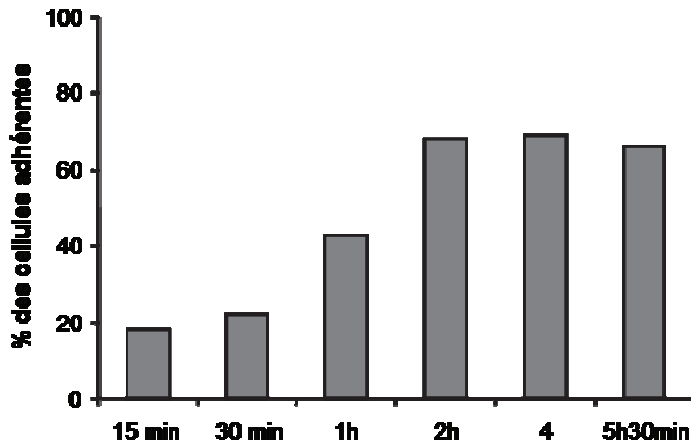


Figure 16 : Cinétique d'adhérence des ostéoblastes de calvaria de rat sur les fonds de puits

Après l'analyse de la cinétique d'adhésion des cellules, les temps d'observation d'1 heure et de 4 heures ont été choisis pour étudier les effets de la modification de la surface en titane par le greffage de la polyNaSS sur l'adhésion cellulaire. Le pourcentage des cellules adhérentes sur les trois surfaces en titane (le titane non modifié, le titane oxydé et le titane greffé avec des groupements sulfonates) après 1 heure et 4 heures sont illustrés à la **Figure 17**.

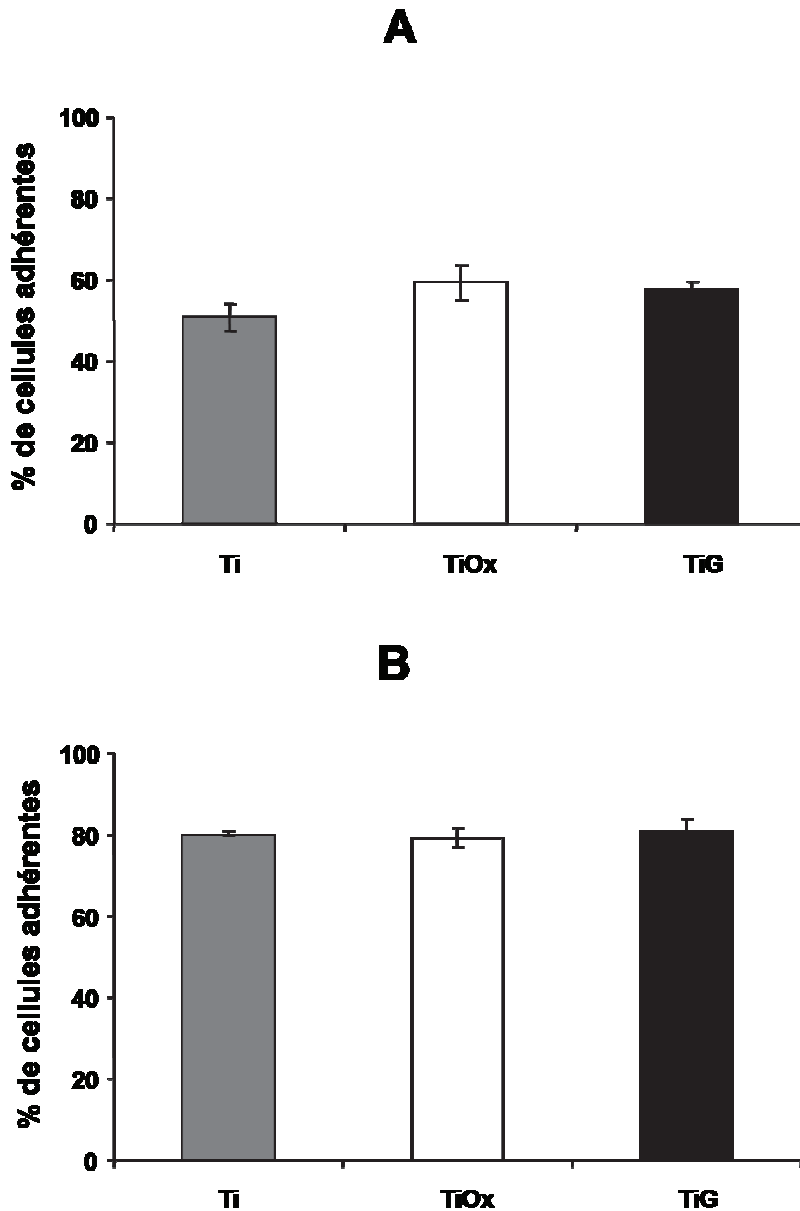


Figure 17 : Pourcentage de cellules adhérentes sur les différentes surfaces en titane (25×10^3 c/cm²)

(A : 1h après l'ensemencement ; B : 4h après l'ensemencement)

Les résultats montrent qu'une heure après l'ensemencement, le pourcentage de cellules adhérentes sur les surfaces en titane non modifié est de l'ordre de 50%. Le pourcentage de cellules adhérentes ne varie pas significativement entre les différents supports (Figure 17A).

Quatre heures après l'ensemencement, le pourcentage de cellules adhérentes sur les surfaces en titane non traité est de l'ordre de 80%. Il n'existe pas de différence significative de l'adhésion cellulaire en fonction des différents supports testés (**Figure 17B**).

4.4.1.2. Morphologie : observation en Microscopie électronique à balayage MEB

Les cellules sont ensemencées à une densité de $25 \times 10^3 / \text{cm}^2$ sur les surfaces de titane non modifié et modifié, et deux points sont étudiés, 1h et 4h après l'ensemencement.

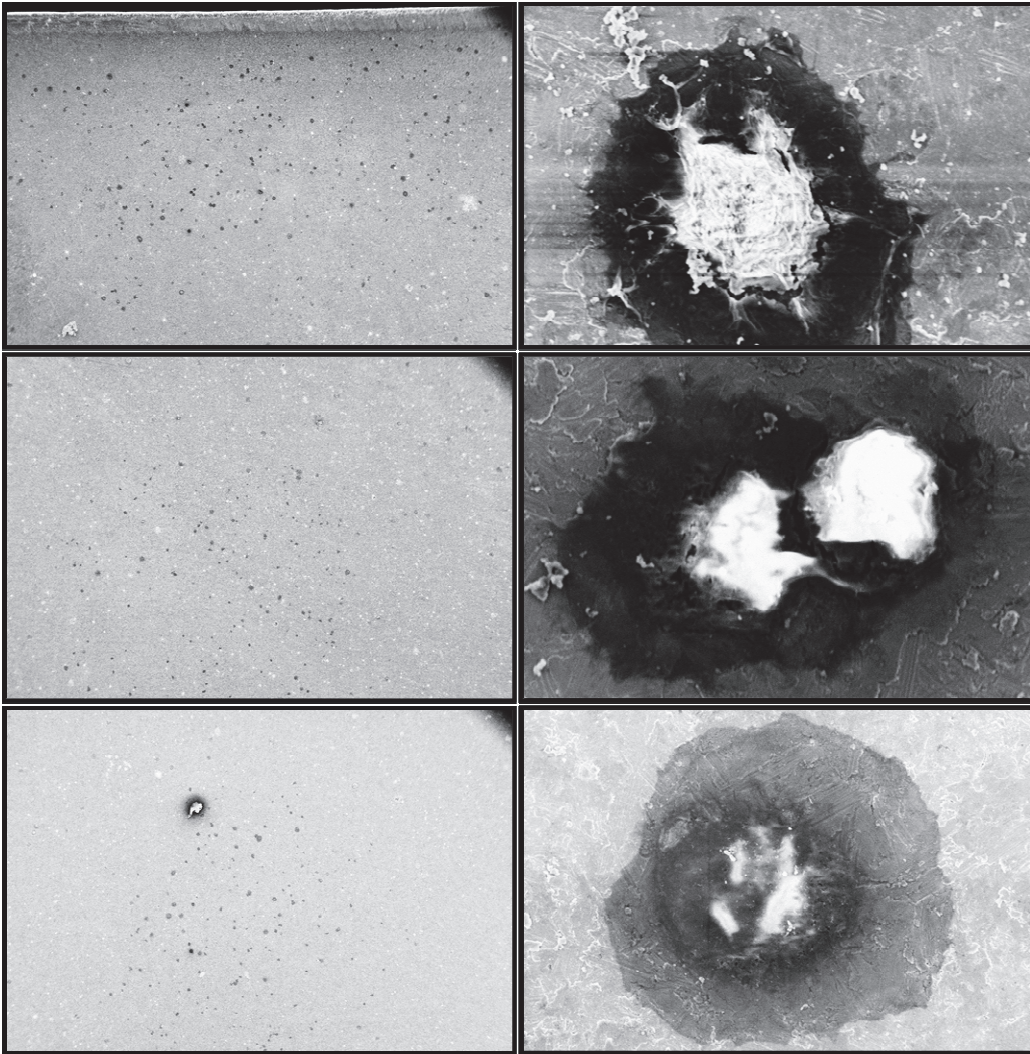


Figure 18A : Morphologie des cellules de calvaria de rat sur les surfaces testées (Ti, TiOx, TiG) les cellules ont étéensemencées (25×10^3 c/cm²), observation en MEB 1h après l'ensemencement (50X à gauche et 6×10^3 X à droite)

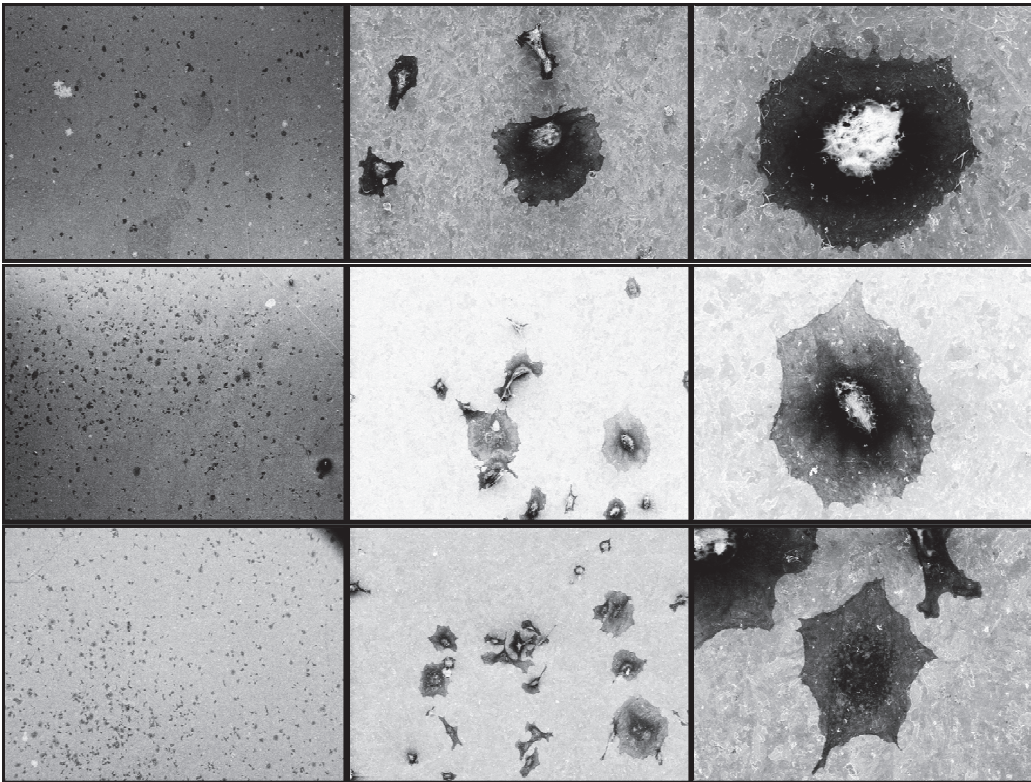


Figure 18B : Morphologie des cellules de calvaria de rat sur les surfaces testées (Ti, TiOx, TiG respectivement), les cellules ont étéensemencées (25×10^3 c/cm²), observation en MEB, 4h après l'ensemencement (50X, 8×10^2 X et $1,7 \times 10^3$ X)

Nous résultats montre que les cellules à 1h sont arrondies quelle que soit la surface (**Figure 18A**) et à 4h les cellules commence à c'étaler et prendre une forme étoilée (**Figure 18B**).

1 et 4 heures après l'ensemencement, les cellules sur les 3 surfaces testées présentent une morphologie similaire.

4.4.1.3. Morphologie : Coloration de l'actine

L'étude conjointe du nombre et de la morphologie des cellules adhérentes sur une surface donnée est nécessaire pour caractériser le processus d'adhésion sur cette surface. La morphologie des cellules sur les supports testés dans cette étude après 1 heure et 4 heures d'incubation a été étudiée en utilisant le protocole mis au point pour d'autres types cellulaires (fibroblastes McKoys, SaoS) (Thèse GOUDIABY., 2004). Les cellules ont étéensemencées à $25 \times 10^3 \text{ c/cm}^2$. Pour visualiser la morphologie cellulaire, l'actine F (protéine constitutive du cytosquelette) a été colorée par un colorant spécifique, la phalloïdine. Les cellules ont été observées au microscope à fluorescence. Des modifications du protocole de fixation, telles que la diminution du nombre des lavages et l'ajout du fixateur avant les lavages, ont été mises au point pour éviter un décollement excessif de cellules. La morphologie des cellules de calvaria de rat a été étudiée sur le titane non modifié et comparée à celle observée sur le *Permanox* (surface contrôle). Une heure après l'ensemencement, les cellules, quelque soit la surface testée, présentent une morphologie similaire (**Figure 19**).

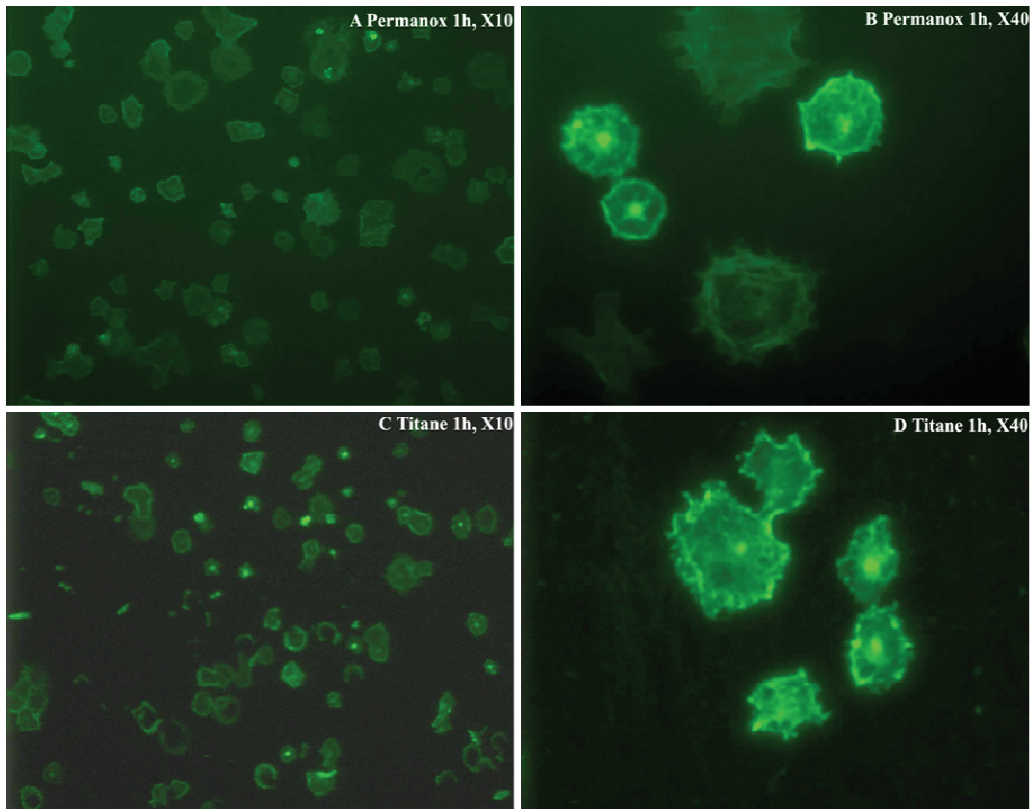


Figure 19 : Morphologie des cellules de calvaria de rat sur la surface en permanox (A et B) et sur le titane non traité (C et D) 1h après l'ensemencement ; coloration par la phalloïdine (actine en vert)

Les cellules ont étéensemencées à $25 \times 10^3 \text{ c/cm}^2$, et la morphologie des cellules de calvaria de rat à 2h après l'ensemencement a été étudiée sur les trois surfaces en titane (non modifié, oxydé et greffé) et comparée à celle observée sur les fonds de puits (surface contrôle). Le nombre des cellulesensemencées ($25 \times 10^3 \text{ c/cm}^2$) a été trop élevé, après seulement 2 heures cette densité permet d'obtenir des clichés présentant un grand nombre d'individus sur les surfaces testées (**Figure 20**), le souci devient alors de réussir à avoir, sur chaque image, des cellules bien individualisées.

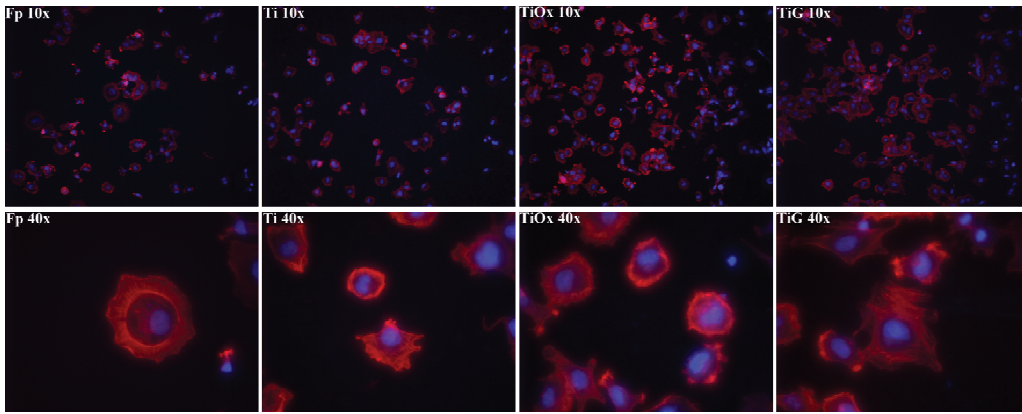


Figure 20 : Morphologie des cellules de calvaria de rat sur les surfaces testées (Fp, Ti, TiOx et TiG), les cellules ont été ensemencées (25×10^3 c/cm²) et fixées 2h après d'ensemencement, coloration par la phalloïdine

Donc nous avons été forcés de réduire la concentration de cellules ensemencer jusqu'à 5×10^3 c/cm² (**Figure 21 A et B**).

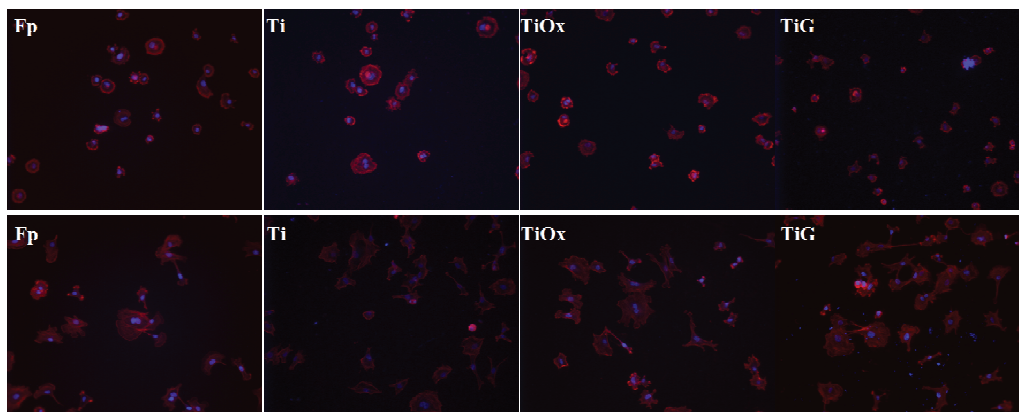


Figure 21A : Morphologie des cellules de calvaria de rat sur les surfaces testées (Fp, Ti, TiOx et TiG) avec 5×10^3 c/cm², coloration par la phalloïdine, grandissement 10x (1h après l'ensemencement en haut et 4h après l'ensemencement en dessous)

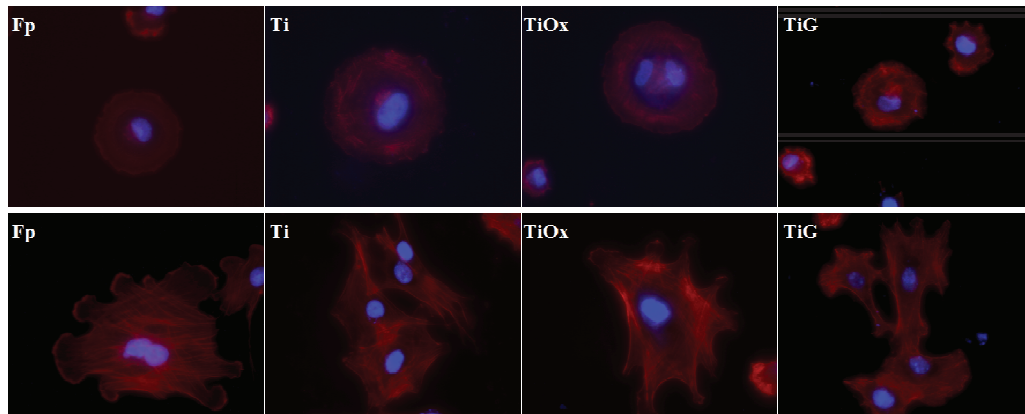


Figure 21B : Morphologie des cellules de calvaria de rat sur les surfaces testées (Fp, Ti, TiOx et TiG) avec 5×10^3 c/cm², coloration par la phalloïdine, grandissement 40x (1h après l'ensemencement en haut et 4h après l'ensemencement en dessous)

Les cellules ensemencées à une heure après l'ensemencement ont arrondies et présentent une morphologie similaire sur les différents supports (**Figure 21A et B**). Quatre heures après l'ensemencement, elles commencent à s'étaler et établir des connexions entre elles (**Figure 21A et B**). La comparaison de la morphologie cellulaire sur les différentes surfaces ne fait pas apparaître des différences. Le nombre des cellules réparties en fonction de leur taille sur les surfaces testées ont été évaluée à l'aide de logiciel « Image ProPlus ».

Après une heure et 4 heures d'ensemencement ($5 \times 10^3 \text{ c/cm}^2$), le nombre de cellules adhérentes sur le titane est de 30% et 60% respectivement. Le nombre reste sensiblement variable entre les trois surfaces (Figure 22).

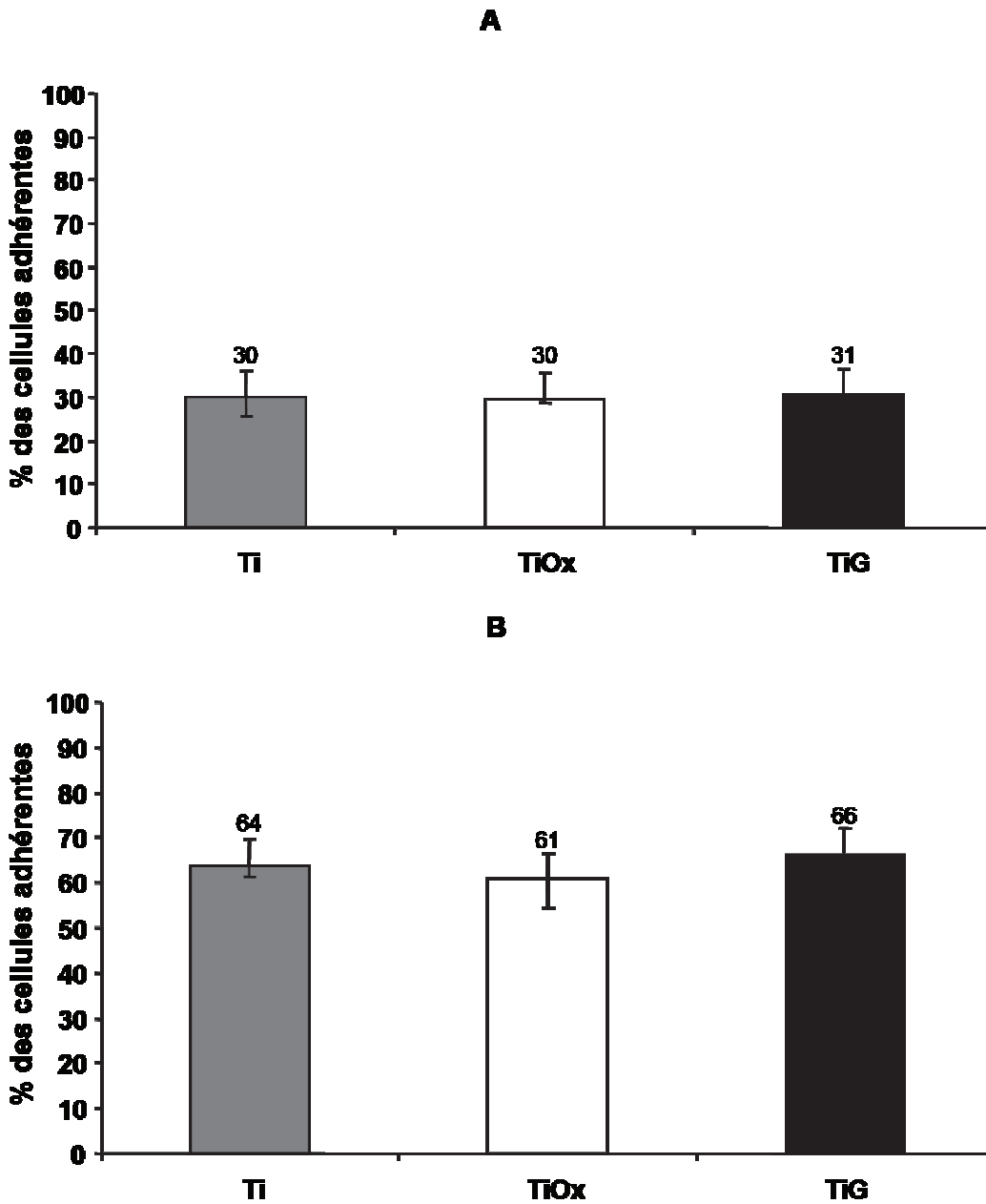


Figure 22 : Pourcentage de cellules adhérentes sur les différentes surfaces en titane ($5 \times 10^3 \text{ c/cm}^2$)
(A : 1h après l'ensemencement ; B : 4h après l'ensemencement)

Afin de mieux appréhender les différences de l'adhésion cellulaire sur les différentes surfaces, les cellules ont été réparties selon leur surface en trois groupes ($0-300\mu\text{m}^2$, $300-600\mu\text{m}^2$, $> 600\mu\text{m}^2$)

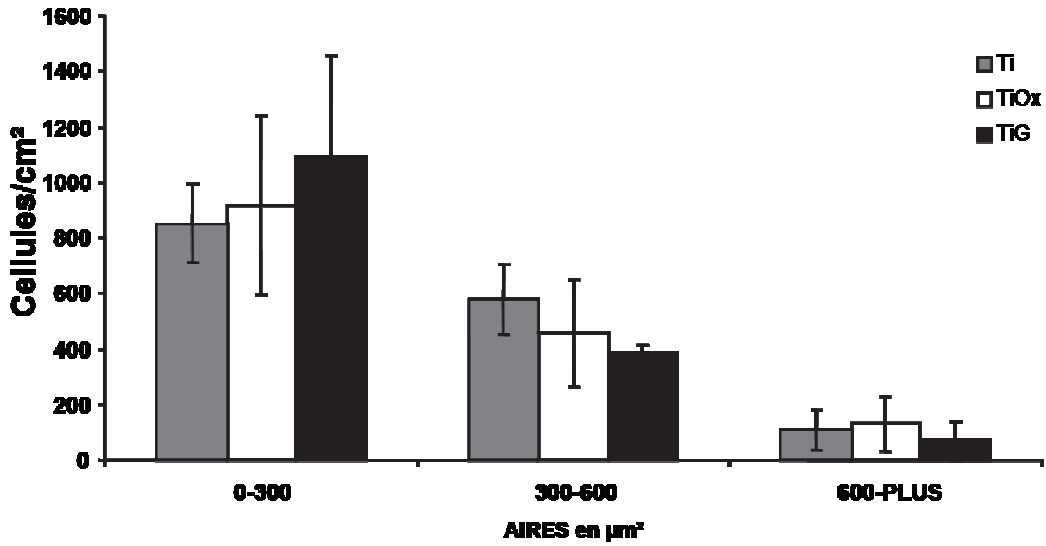


Figure 23 : Nombre des cellules adhérents sur les efférents surfaces testées classer selon leur taille (1h)

Les résultats montrent qu'une heure après l'ensemencement le nombre des cellules adhérentes d'une surface 0 à $300\mu\text{m}^2$ est significativement supérieure du groupe $300-600\mu\text{m}^2$ et du groupe $> 600\mu\text{m}^2$ et ceci pour les trois surfaces testées (Figure 23).

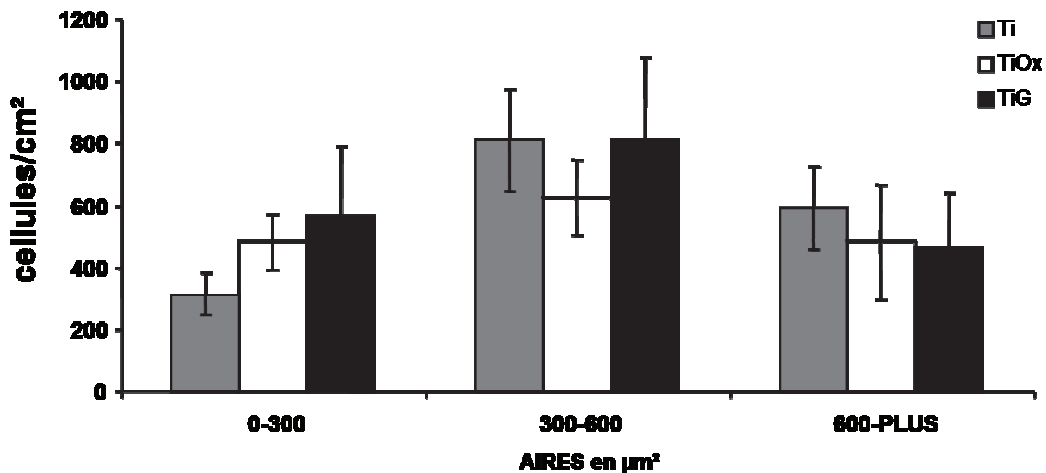


Figure 24 : Nombre des cellules adhérentes sur les différentes surfaces testées classées selon leur taille (4h)

4 heures après l'ensemencement, le nombre des cellules adhérentes du groupe 300-600 μm^2 sur les trois surface en titane supérieur au nombre observé du groupe 0-300 μm^2 ; et on observe aussi l'augmentation de nombre des cellules pour le groupe de 600-PLUS μm^2 (Figure 24). Il n'existe pas de différence significative de la morphologie cellulaire en fonction des différents supports testés.

4.4.2. Prolifération des cellules de calvaria de rat sur les différentes surfaces en titane

La prolifération cellulaire a été évaluée par quantification de l'ADN cellulaire. Les cellules de calvaria de fœtus de rat ont été ensemencées sur les différentes surfaces pre-incubées (24h dans du milieu DMEM et 24h avec du milieu DMEM contenant 10% de SVF) et cultivées dans les conditions de culture décrites précédemment. Le contenu en ADN double brin a été déterminé après différents temps de culture variant de 0 à 10 jours. Les résultats ont montré

que la quantité d'ADN sur le fond de puits est stable le 2 premiers jours puis augmente, de façon linéaire en fonction du temps (**Figure 25**). La quantité d'ADN sur la surface en titane est similaire les deux premiers jours puis augmente de façon significative jusqu'à atteindre une valeur maximale au 10^{ème} jour de culture (3 fois supérieure à celle observée au premier jour) (**Figure 25**). La courbe de cinétique de prolifération des cellules sur les deux autres surfaces est comparable à celle observée pour la surface en titane non traité (**Figure 25**).

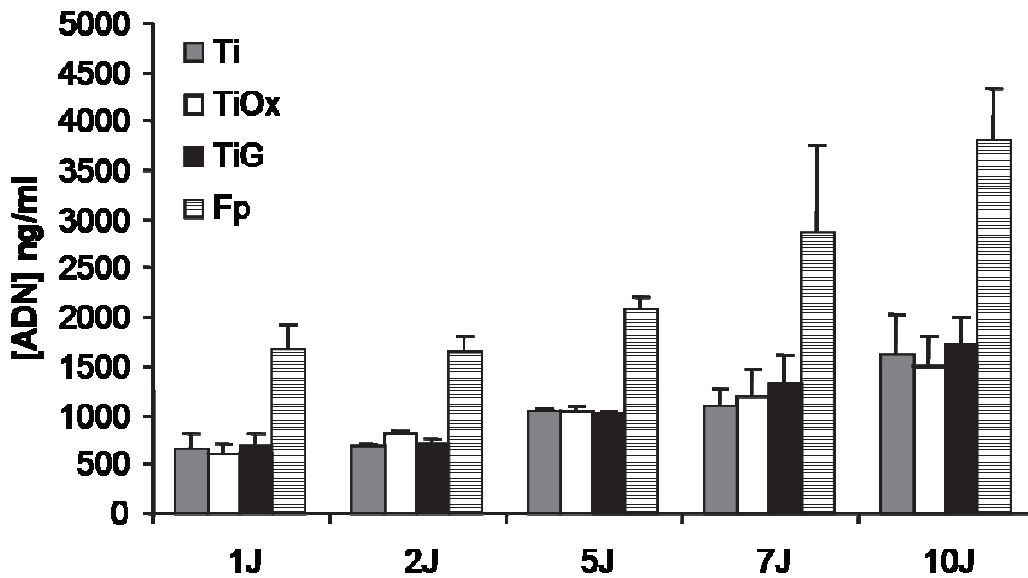


Figure 25 : Cinétique de prolifération des cellules de calvaria de foetus de rat sur les différentes surfaces en titane exprimée en quantité d'ADN/puits en ng en fonction du temps

4.4.3. Différenciation des cellules de calvaria de fœtus de rat sur les différentes surfaces en titane

4.4.3.1. Activité phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline est un marqueur de différenciation du phénotype ostéoblastique. L'activité de la phosphatase alcaline des cellules de calvaria de rat sur les différentes surfaces en titane a été mesurée à différents temps de culture : J2, J5, J7, J10. Les résultats ont été exprimé en Unité enzymatique/puits (**Figure 26A**) et Unité enzymatique/mg de protéines (**Figure 26C**).

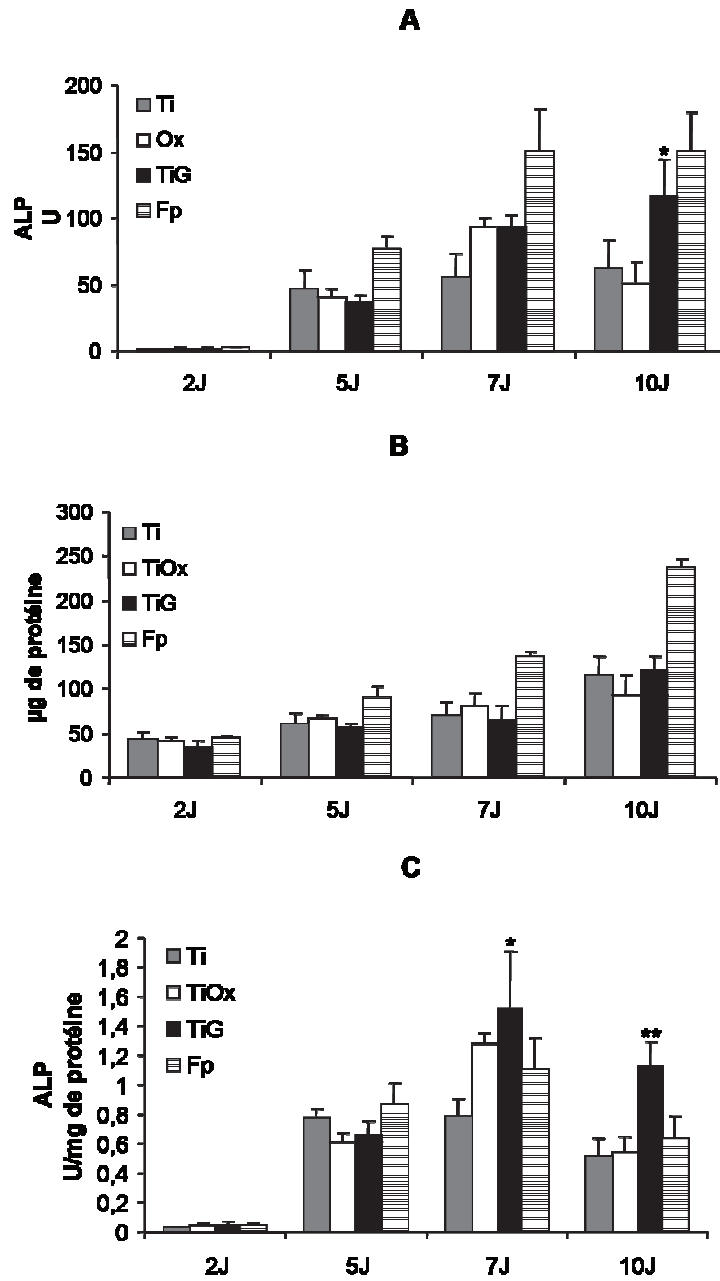


Figure 26 : Cinétique d'apparition de l'activité phosphatase alcaline sur les différents supports
 (A) Activité ALP exprimée en unités/puits (* différence significative par rapport au Ti et TiOx (ANOVA, $p < 0,02$)), (B) Teneur en protéines, (C) Activité ALP exprimée en unités/mg de protéines

* différence significative par rapport au autre surfaces ANOVA, $p < 0,05$

** différence significative par rapport aux autres surfaces ANOVA, $p < 0,01$

L'activité phosphatase alcaline détectée au 2^{ème} jour est très faible quelles que soient les surfaces testées (**Figure 26A**). Au 5^{ème} jour, une activité de 40 U/puits est observée pour les trois surfaces testées (**Figure 26A**). A partir du 7^{ème} jour elle augmente en fonction du temps pour les deux surfaces traitées (oxydée et greffée) mais elle reste constante pour la surface de titane non traitée. Il n'existe pas de différence significative entre la surface oxydée et greffée à J7 et (**Figure 26A**) en revanche il existe une différence significative entre la surface greffée et les surface non modifié et oxydé (ANOVA, $p < 0,01$).

L'augmentation de l'activité phosphatase alcaline peut être le reflet d'une synthèse protéique accrue au cours de la prolifération. Ceci nous a conduits à corrélérer l'activité enzymatique à la teneur en protéines totales correspondante (**Figure 26B**). L'évolution de l'activité spécifique de la phosphatase alcaline pour le titane non traité est semblable à celle du contrôle (**Figure 26C**). Il existe une différence significative au 7^{ème} et au 10^{ème} jour de culture entre l'activité spécifique phosphatase alcaline de cellules ensemencées sur une surface en titane greffé et celle observée pour le titane oxydé.

4.4.3.2. Formation des nodules de minéralisation

Pour étudier la présence de nodules de minéralisation et leur distribution au sein du tapis cellulaire, des cultures à J16 ont été incubées avec la calcéine ; un fluorochrome qui se lie au calcium (Ca) et forme un complexe coloré en vert. La phalloïdine-rhodamine qui colore les filaments d'actine de la cellule est utilisée en contre-coloration pour visualiser le tapis cellulaire.

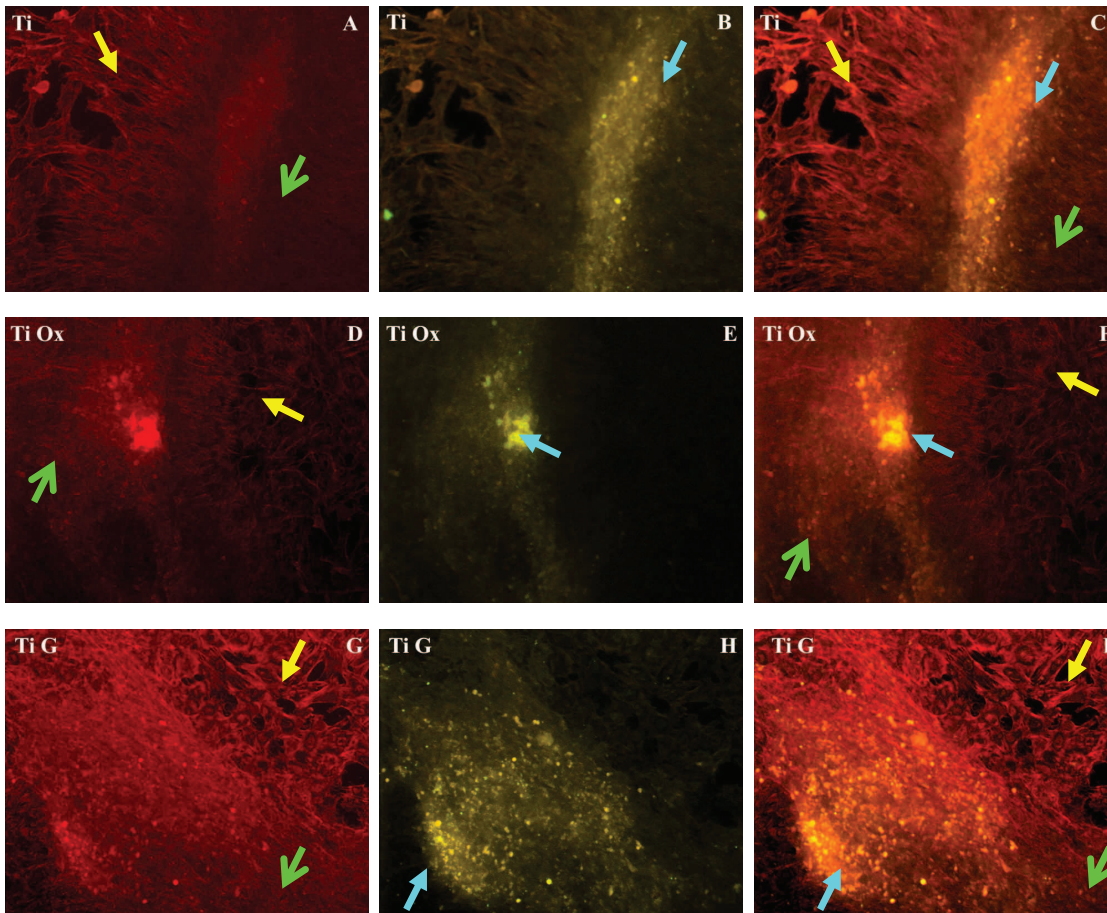


Figure 27 : Coloration à la phalloïdine-rhodamine (A, D, G) et à la calcéine (B, E, H). Les tapis cellulaires d'ostéoblastes de calvaria de rat à 18 jours. (C, F, I) correspondent à des images obtenues par superposition par le logiciel « Image ProPlus » et ont été utilisés pour quantifier l'aire minéralisée. Les flèches montrent les aires de multi couches, une seule couche et les aires minéralisées. Ti : titane non modifié, TiOx : titane oxydé, TiG : titane griffé. (→ Une seule couche de cellules, → Multicouches, → Nodule de Ca)

Les photos présentées ont été choisies de manière à être représentatives du tapis cellulaire de la surface étudiée. Les cellules forment un tapis cellulaire avec des structures en multicouche –nodules de minéralisation (Figure 27A; 27D ; 27G). Elles sont colorées d'un jaune intense représentatif d'une forte densité des cellules et de calcium (Figure 27B; 27E; 27H). Les nodules de minéralisation sont visibles sur les trois surfaces de titane testées (Figure 27C ; 27F ; 27I).

Néanmoins, la taille et la distribution des nodules de minéralisation diffèrent d'une surface à l'autre. Sur la surface en titane greffée, la somme des aires des nodules de calcium est de $24 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ (aires de l'image ($1,3 \times 10^6 \mu\text{m}^2$)), et pour la surface oxydée est de $7,5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ et non traitée est de $11,1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. Pour étudier ces différences, les aires de nodules ont été délimitées (à l'aide du logiciel image *Pro Plus*) sur au moins 12 images / surface et la somme des aires de nodules a été calculé à l'aide du logiciel *Excel* (**Figure 28A**). Les résultats ont été aussi exprimés en pourcentage de recouvrement (**Figure 28B**).

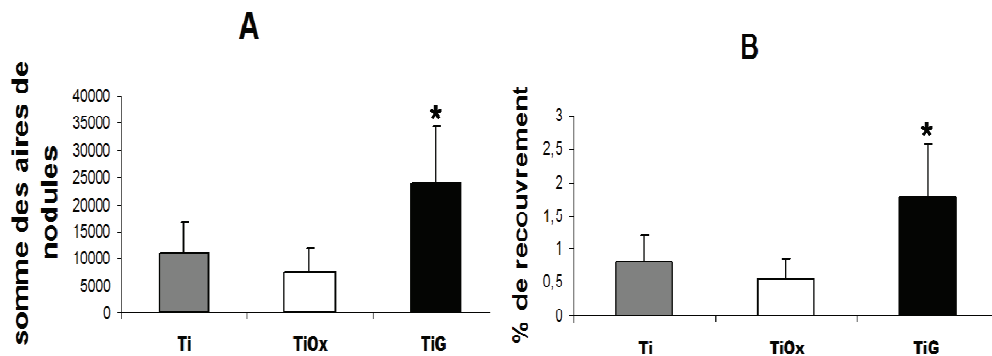


Figure 28 : Formation de minéral sur les différentes surfaces (A) la somme des aires de nodules de calcium sur les différentes surfaces exprimée en μm^2 (B) le % de recouvrement de nodules de calcium

* différence significative par rapport au autre surfaces ANOVA, $p < 0,05$

Les résultats montrent que la somme des aires des nodules sur la surface de titane oxydé ne diffère pas de façon significative de celle observée sur le titane non traité. En revanche, la somme des aires de la surface sur le titane greffé est significativement ($p < 0,05$ ANOVA) supérieure à celle observé sur la surface de titane oxydé.

4.4.3.3. Quantification de collagène

La quantification de collagène type I du tapis cellulaire de cellules de calvaria de rat sur les différentes surfaces en titane a été mesurée à différents temps de culture : J5, J8, J10. Les résultats ont été exprimés en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de surface de titane.

Les résultats ont montré que la quantité de collagène type I atteint un plateau, jusqu'au 8^{ème} jours, puis elle diminue et elle arrive au 10^{ème} jours à une valeur inférieure à celle observée au 5^{ème} jours de culture (**Figure 29**). La quantité sur les trois surfaces de titane et pour tous les temps testés est similaire.

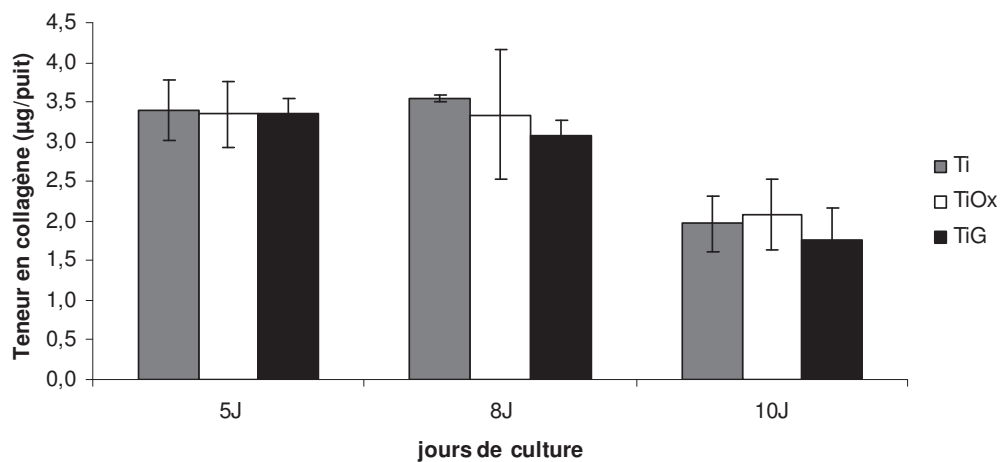


Figure 29 : La quantité de collagène type I du tapis cellulaire en fonction du temps, exprimée en $\mu\text{g}/\text{puit}$.

L'augmentation de la quantité de collagène peut être le reflet d'une synthèse protéique accrue au cours de la prolifération. Ceci nous a conduit à corrélérer la quantité de collagène type I à la teneur en protéines totales correspondante.

Les résultats ont montré que la quantité spécifique de collagène sur les surfaces en titane testées diminuer en fonction de temps jusqu'à atteindre une valeur minimale au 10^{ème} jour de culture (**Figure 30**).

La quantité du collagène du tapis cellulaire ne diffère pas significativement sur les surfaces en titane testées.

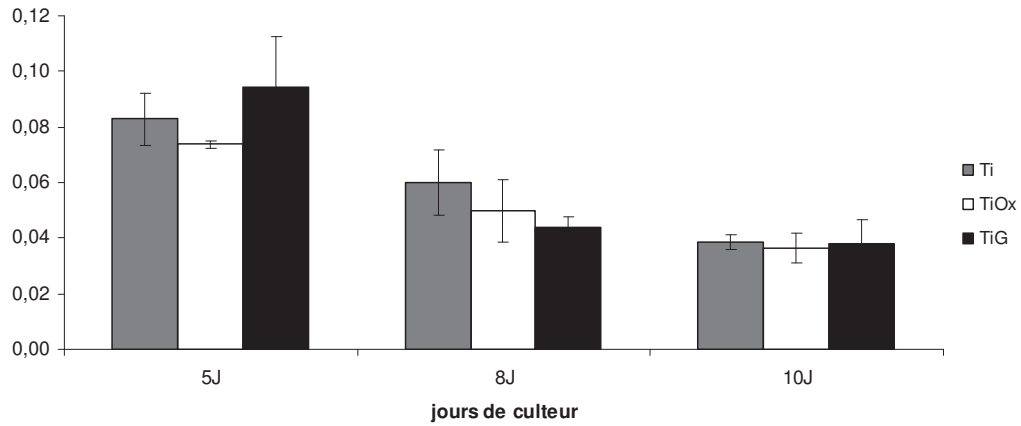


Figure 30 : la quantité de collagène type I corrélée à la teneur en protéines totales correspondante

4.5.Effet du polyNaSS sous forme soluble sur le comportement des cellules de calvaria de rat sur des surfaces en titane

4.5.1. Adhésion

Cette partie du travail est consacrée à l'étude de l'effet du polyNaSS sous forme soluble dans le milieu de culture. La concentration utilisée est de 1,5µg de polyNaSS/ml de milieu de culture, et c'est la moins concentration trouver sur les surfaces en titane greffé, on suppose que l'effet sur le comportement cellulaires vient de polyNaSS détacher de la surface de titane greffé.

4.5.1.1. Comptage

Les cellules ont étéensemencées à 5×10^3 c/cm². 1h et 4h après d'ensemencement, le pourcentage des cellules adhérentes sur les trois supports en titane testés (le titane non modifié, le titane oxydé et le titane greffé avec des groupements sulfonates) en absence et en présence de 1,5µg de polyNaSS dans le milieu, sont illustrés à la **Figure 31**.

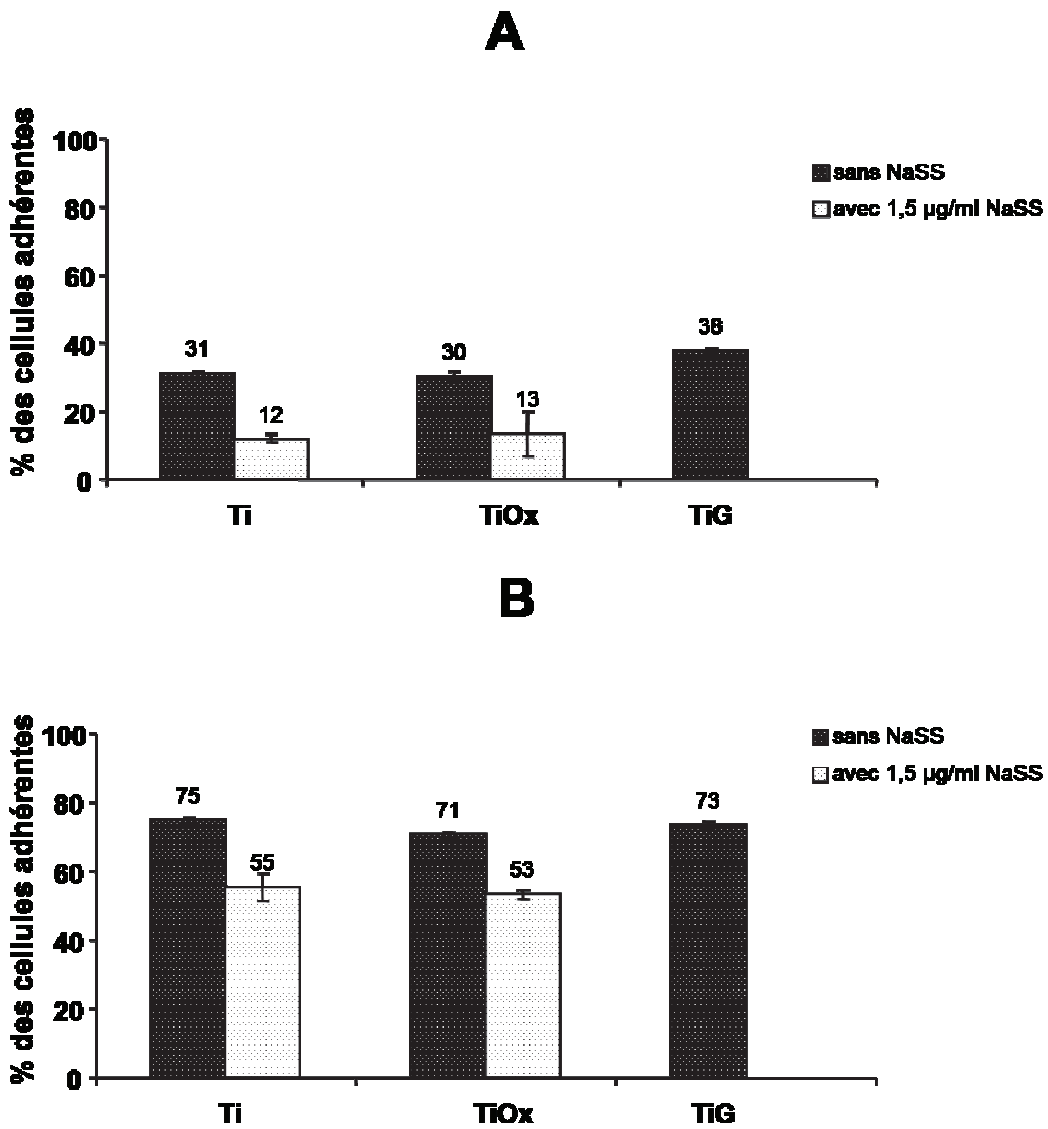


Figure 31 : Effet du polyNaSS sur l'adhésion de cellules de calvaria sur les surfaces en titane à 1 heure après l'ensemencement (A) et 4 heures (B) après l'ensemencement

*, ** différence significative par rapport au autre surface ANOVA, $p < 0,05$

Les résultats montrent qu'une heure après l'ensemencement en absence de 1,5µg de polyNaSS soluble dans le milieu, le pourcentage de cellules adhérentes sur les surfaces en titane non traité est de l'ordre de 30% des cellules ensemencées. Le pourcentage de cellules

adhérentes ne varie pas significativement entre les trois supports (**Figure 31A**). Après l'ajout de polyNaSS dans le milieu le pourcentage de cellules adhérentes sur le titane non traité et le titane oxydé diminue significativement ($p < 0,05$ ANOVA). Cette diminution est de l'ordre de 50% (**Figure 31A**).

Quatre heures après l'ensemencement, le pourcentage de cellules adhérentes sur les surfaces en titane non traité, en absence du polyNaSS dans le milieu, est de l'ordre de 70%, il n'existe pas de différence significative de l'adhésion cellulaire en fonction des différents supports testés (**Figure 31B**). En présence du polyNaSS dans le milieu le pourcentage de cellules adhérentes sur le titane non traité et oxydé diminue significativement ($p < 0,05$ ANOVA). La présence de 1,5 μ g de polyNaSS soluble dans le milieu inhibe l'adhésion des cellules de calvaria de fœtus de rat fœtal.

4.5.2. Prolifération des cellules de calvaria de rat avec la présence de polyNaSS dans le milieu

Les cellules ont été ensemencées en absence ou en présence de concentrations croissantes (0.1 μ g, 0.33 μ g, 1 μ g, 3.3 μ g, 10 μ g et 33 μ g polyNaSS/ml) de polyNaSS dans le milieu de culture. Les cellules ont été arrêtées au 7^{ème} jour de culture. La quantité de protéine totale a été évaluée et exprimée en μ g de protéine/puits. Les résultats sont illustrés à la **Figure 32**.

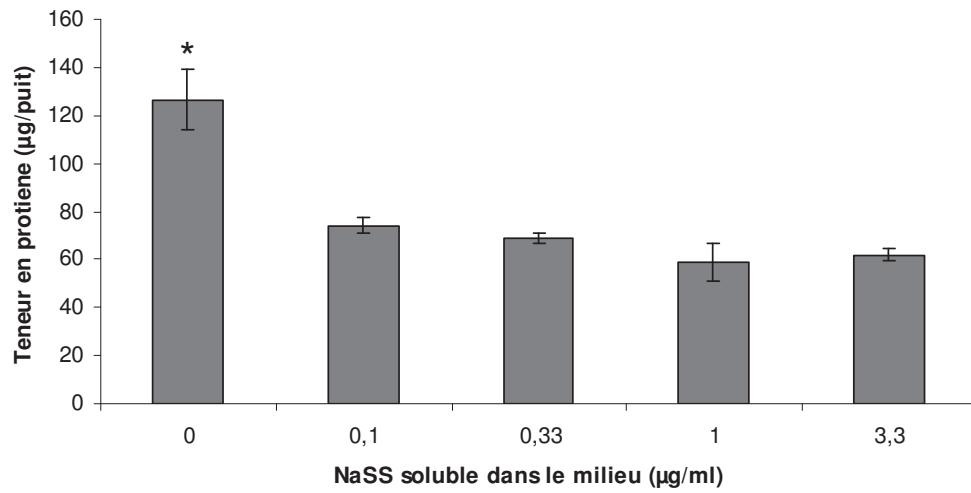


Figure 32 : Effet du polyNaSS soluble sur la prolifération cellulaire au 7^{ème} jour de culture.
(* différence significative par rapport au autre surfaces ANOVA, $p < 0,01$)

Les résultats montrent que 7 jours après l'ensemencement en présence de polyNaSS dans le milieu, la quantité des protéines totales diminue significativement en fonction de la concentration de polyNaSS soluble dans le milieu ($p < 0,01$ ANOVA).

La présence de polyNaSS soluble dans le milieu a un effet cytotatique.

4.5.3. Différenciation des cellules de calvaria de rat avec la présence de polyNaSS dans le milieu

4.5.3.1. Activité phosphatase alcaline

L'activité de la phosphatase alcaline des cellules de calvaria de rat sur les fonds de puits a été mesurée à 7 jours de culture. Les résultats ont été exprimé en Unité enzymatique/puits (Figure 33).

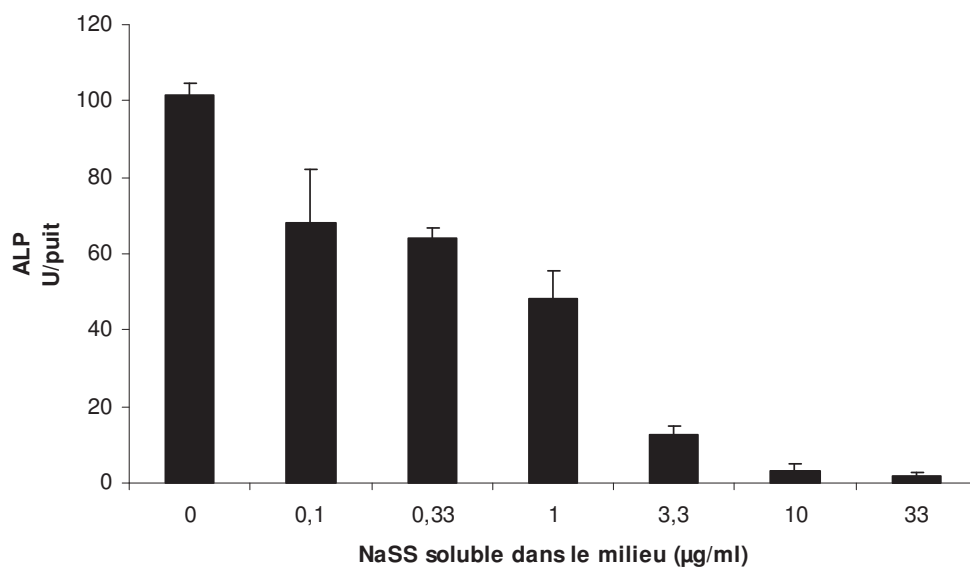


Figure 33 : Effet du polyNaSS soluble dans le milieu sur l'activité phosphatase alcaline au 7^{ème} jour de culture

En absence de polyNaSS dans le milieu l'activité de la phosphatase alcaline au 7^{ème} jour est de 101 U/puits. En revanche, en présence d'une faible concentration de polyNaSS (0,1µg/ml) l'activité phosphatase alcaline diminue significativement ($p < 0,05$ ANOVA). La diminution est dépendante la concentration de polyNaSS sous forme soluble dans le milieu. L'activité

phosphatase alcaline est complètement inhibée pour des concentrations supérieures de 10 μ g de polyNaSS.

5. Discussion

Les propriétés de la surface implantaire, en particulier des surfaces en titane, jouent un rôle critique dans les processus de l'adhérence, de la prolifération et de la différenciation des cellules osseuses (**Bachle et al., 2004**). Elle conditionnent l'interaction précoce entre le biomatériau et les cellules de l'hôte qui sont primordiales dans la réponse tissulaire à l'interface (**Anselme., 2000 ; Puleo et al., 1999**).

Les résultats de notre étude ont montré que le greffage de polyNaSS sur le titane d'une part n'interfère pas avec l'adhésion et la prolifération et stimule la différenciation des ostéoblastes de calvaria de rat, et d'autre part inhibent l'adhésion de *S. aureus*. Dans la dernière décennie, de nombreuses études ont été consacrées à l'amélioration de l'interaction cellules – surface implantaire, avec l'objectif d'amélioration de l'ostéointégration pour les applications dentaires et orthopédiques (**Le Guehennec et al., 2007**). Plusieurs modifications de la surface du titane ont été proposées, qu'elles soient topographiques, physico-chimiques ou biochimiques, pour améliorer la réponse ostéoblastique. Des modifications physico chimiques et topographiques de la surface altèrent la rugosité. Comparées aux surfaces usinés, sur les surfaces rugueuses le nombre des ostéoblastes qui y a adhèrent et proliférant est supérieur (**Kunzler et al., 2007**). La dureté et le module d'élasticité du minéral formé par des ostéoblastes en culture sur ces surfaces sont supérieures de ceux observés sur des surfaces usinés (**Takeuchi et al., 2005**). Par ailleurs, le revêtement de titane avec une fine couche d'hydroxyapatite a permis une meilleure croissance de l'os au contact os-implant (**Schmidmaier et al., 2002**).

Des modifications biochimiques de la surface ont été aussi proposées pour améliorer l'ostéointégration. Des molécules comme les peptides contenant séquence RGD (**Rammelt**

et al., 2006 ; Kroese-Deutman et al., 2005), des facteurs de croissance et des morphogènes comme le BMP-2 (**Seol et al., 2006 ; Becker et al., 2006 ; Clokie et al., 2003**) sont fixés à la surface des implants en titane dans le but d'améliorer l'attachement, la prolifération et la différenciation ostéoblastique. Néanmoins, ces molécules peuvent être dégradés par des enzymes de microenvironnement après l'implantation, et la question de leur « efficacité » se pose.

De même, des modifications de surface ont été proposées aussi pour prévenir le risque d'infection sur les prothèses ostéoarticulaires. Pour éviter les infections, il a été envisagé de modifier la surface implantaire en utilisant des antibiotiques. **Luke et al., (2003)** ont montré que des surfaces de titane recouvertes de poly(D,L-lactide) et 10% de gentamicine (group IV) inhibaient l'adhésion et la prolifération bactérienne (**Luke et al., 2003**). Des antibiotiques (gentamicin, pencillin et vancomycin) (**Antoci et al., 2007 ; Zhang et al., 2007**), et des peptides antimicrobiens (**Gabriel et al., 2006**) immobilisés sur des surfaces en titane montrent des propriétés antibactériennes. Le choix de l'antibiotique et le risque d'induction d'une résistance bactérienne sont les questions qui se posent face aux surfaces ainsi modifiées.

Les modifications de surface que nous étudions sont obtenues par le greffage d'un polymère bioactif. La synthèse macromoléculaire permet de préparer des polymères bien définis qui peuvent être testés biologiquement. Dans un premier temps des surfaces « modèles » avec le poly (styrène sulfonate de sodium) et poly (acide méthacrylique) contenant des différentes compositions de ces monomères ont été étudiées. Le greffage de groupements ioniques à la surface du titane a représenté un double défi : premièrement, la détermination des paramètres pour obtenir un meilleur greffage, et deuxièmement, le contrôle du ratio entre les groupes carboxylate et sulfonate. Le greffage du groupe sulfonate seul en supposant qu'il est possible

de produire des radicaux à la surface des implants qui peut amorcer la polymérisation de ce monomère a été effectué. Le greffage est relié par une liaison covalente sur les surfaces en titane. Diverses techniques de caractérisation de la surface ont montré que le greffage de poly polyNaSS à la surface de titane peut atteindre jusqu'à $5 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Hélary et al., 2009).

L'originalité des nouvelles surfaces en titane greffées de polyNaSS, que nous avons étudiées, réside sur les propriétés à la fois inhibitrices de l'adhérence bactérienne et cytocompatibles, stimulatrices de la différenciation ostéoblastique. Ces dernières propriétés sont obtenues par des modifications de surface par le greffage et non par une libération des substances antibactériennes.

L'effet du greffage des groupements sulfonate de surface de titane sur l'adhérence de *S. aureus* a été proposé dans le but de développer des surfaces métalliques dotées de propriétés inhibitrices de l'adhérence des bactéries impliquées dans les infections péri-implantaires. L'infection peri-implantaire représente l'une de causes majeures de l'échec de l'ostéointégration des implants endo-osseux. Nos résultats montrent que des surfaces de titane greffées de polymères bioactifs, porteurs des groupements sulfonate inhibent l'adhésion de *S. aureus* jusqu'à 90% par rapport aux surfaces en titane non modifiées. La diminution de l'adhérence de *S. aureus*, est observée dans les deux conditions expérimentales testées (des surfaces pré-incubées en présence de fibrinogène ou de plasma humain).

L'effet inhibiteur des groupements sulfonate sur l'adhérence de *S. aureus* observé sur des surfaces en titane est à rapporté à celui décrit précédemment, (Berlot et al., 2002 ; Crémieux et al., 2003) sur des supports de polymères à base de PMMA ou de PVC ou de silicone, fonctionnalisés par les groupements sulfonate. Dans ces études l'effet inhibiteur de

l'adhérence de *S. aureus* sur les surfaces modifiées est très élevé ; l'adhérence bactérienne est inhibée de plus de 90 % *in vitro*, et elle est diminuée de deux unités de log *in vivo*, après implantation chez le lapin.

D'ailleurs, l'effet inhibiteur des ces groupements greffés sur les surfaces en titane a été aussi décrit pour le *P. gingivalis* ; Le greffage diminue l'adhérence bactérienne de manière significative, sur les surfaces pré-incubées avec de fibronectine ou de plasma humain (**Zhou et al., 2006**). L'inhibition de l'adhérence de *P. gingivalis* sur le titane greffé est de l'ordre de 20 %, et si on tient compte de la surface réellement accessible aux protéines, l'inhibition s'élève à 73 %.

Les mécanismes par lesquels l'inhibition de l'adhérence bactérienne est médiée ne sont pas complètement élucidés. L'influence de la composition chimique de la surface sur la conformation des protéines médiatrices de l'adhésion cellulaire sur les surfaces des biomatériaux a été décrite dans la littérature (**Francois et al., 1996 ; Liu et al., 2007**). En effet, cette étape d'adsorption des protéines est essentielle sur les réponses cellulaires consécutives à la mise en place d'un implant dans le système vivant. La protéine adsorbée, et sa conformation propre à la surface sur laquelle elles s'adsorbent, jouent un rôle déterminant. Par exemple, Grainger *et al.*, (2003) et Latz *et al.*, (2003) ont montré que la fibronectine peut changer de conformation en fonction de la nature chimique ou physico-chimique de la surface sur laquelle elle s'adsorbe et ainsi moduler l'adhérence des cellules de type fibroblastique. Ainsi, une hypothèse qui peut expliquer l'inhibition de l'adhérence de *S. aureus* sur la surface de titane greffé de polyNaSS implique le changement de protéines adsorbées. En effet, les protéines promotrices de l'adhérence de *S. aureus*, telle que la fibronectine, pourraient adopter des conformations tridimensionnelles différentes lorsqu'elles sont adsorbées sur la

surface en titane greffée. La conformation des protéines fait que les domaines reconnus par les bactéries seraient partiellement masqués, et donc moins accessibles aux adhésines bactériennes. En revanche, sur la surface témoin, ces domaines seraient plus exposés et favoriseraient l'adhérence bactérienne.

Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que le greffage de polyNaSS, en inhibant l'adhésion bactérienne peut prévenir l'infection. Cette approche présente l'avantage d'éviter les problèmes liés à une antibiothérapie et /ou antibioprophyllaxie systémique et /ou locale. L'infection et la colonisation des implants débutent par l'adsorption des protéines et l'adhérence des bactéries à la surface du matériau implanté.

Le deuxième objectif de ce travail était de vérifier que ces surfaces bioactifs en titane dont le développement s'oriente vers l'implantation en tissu osseux, n'ont pas d'effet délétère sur les cellules osseuses. L'effet du greffage de polyNaSS sur la réponse ostéoblastique a été étudié à l'aide du modèle de culture de calvaria de fœtus de rat de 18 jours. Ce modèle permet d'étudier en culture les étapes tardives de la différenciation ostéoblastique. Les cellules cultivées en présence de la vitamine C et de β -glycérophosphate expriment le collagène de type I, l'ostéocalcine, la phosphatase alcaline et des nodules de minéralisation (**Anagnostou et al., 1996**).

En ce qui concernant l'adhésion, les résultats obtenus ont montré qu'une heure après l'ensemencement, le pourcentage de cellules de calvaria de rat adhérentes était de l'ordre de 50% sur les trois surfaces de titane testées et après quatre heures était de l'ordre de 80%. Aucune différence significative, en terme du nombre de cellules adhérentes entre les trois supports testés, n'a pu être mise en évidence. Ces résultats suggèrent que le greffage de

surfaces en titane avec les groupements sulfonates n'influe pas sur le nombre des cellules adhérentes. De même, la morphologie cellulaire était similaire sur les trois surfaces testées, à une heure et 4 heures après l'ensemencement. Mais ces données ne nous permettent pas d'écarter les différences de forces d'adhésion en fonction de la composition chimique de la surface, un paramètre que nous n'avons pas étudié.

Le greffage de polyNaSS modifie plusieurs propriétés de surface, l'énergie de surface de titane greffé est de $59,2 \text{ mN m}^{-1}$ tandis que celle de la surface oxydée et de la surface contrôle est de $64,9 \text{ mN m}^{-1}$ et 57 mN m^{-1} respectivement (**Hélary et al., 2009**). Le seuil de l'énergie de surface favorisent l'adhésion est de 57 mN m^{-1} , (**Schakenraad et al., 1986**), **Hélary et al., (2009)** on montré par ailleurs que la force d'adhésion cellulaire est plus élevée sur les surfaces oxydées par rapport aux surfaces greffées.

De plus la force polaire de la surface a été modifiée par le greffage, l'adhésion cellulaire est maximale sur les surfaces avec force polaire $FP = 0,3$ (**Hallab et al., 1995**), **Hélary et al., (2009)** ont trouvé que la force polaire de la surface greffée est $FP = 0,7$; Ceci suggère que la force polaire joue un rôle moins important pour l'adhésion des cellules de calvaria de rat (**Hélary et al., 2009**).

Nos résultats sur l'adhésion de cellules de calvaria de rat sont en accord avec ceux décrits par **Hélary et al., (2009)** pour les cellules de calvaria de rat, le greffage ne modifie pas le nombre des cellules ostéoblastiques adhérentes et ne modifie pas la prolifération des cellules. La rugosité de trois surfaces testées, oxydées et greffées et surfaces contrôles est similaire (**Hélary et al., 2009**), et apparemment n'interfère pas avec l'adhésion des ostéoblastes de calvaria de rat.

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que les courbes de cinétique de prolifération des ostéoblastes de calvaria de rat sur les trois surfaces en titane testées étaient comparables.

Ceci suggère que le greffage de polyNaSS n'interfère pas avec la prolifération des ostéoblastes. En revanche, il est à noter que les sulfonates solubles ajoutés dans le milieu dans des concentrations équivalentes (1,5 µg/ml) ont des effets cytostatiques. Nos résultats montrent que 7 jours après l'ensemencement en présence de polyNaSS soluble dans le milieu, le nombre de cellules diminue jusqu'à 50% par rapport aux cellules cultivées en absence de polyNaSS dans le milieu de culture.

Néanmoins, l'effet de groupements sulfonates sur la prolifération semble varier selon le type cellulaire et le support fonctionnalisé. En effet (**Najab-Nehayoun et al., 1993**) ont montré que les groupements sulfonates amélioraient sensiblement la vitesse de prolifération des cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humain. En revanche, un effet délétère d'un taux élevé de radicaux sulfonates sur la prolifération a été précédemment décrit. La présence des groupements sulfonates sur les polymères de poly(méthyl méthacrylate) fonctionnalisés inhibent la prolifération des cellules de calvaria de rat (**Anagnostou et al., 2006**) mais aussi celle d'autres types cellulaires telles que les fibroblastes (**El Khadali et al., 2002**) ou les cellules épithéliales (**Latz et al., 2003**). D'autres études ont évalué la prolifération des ostéoblastes sur des surfaces en titane modifiées par des groupements ioniques. La prolifération d'ostéoblastes n'est pas affectée par l'acide phosphorique greffé sur le titane (**Viornerly et al., 2002**), mais elle stimulée par les ions de calcium (**Feng et al., 2004**). Nos résultats montrent en effet que le polyNaSS immobilisé sur le titane n'a pas d'effet cytotoxique et/ou cytostatique.

En revanche, lorsque l'on analyse nos résultats sur la différenciation, il semble que la surface modifiée par le greffage des groupements sulfonates induit une « meilleure réponse » des ostéoblastes. L'activité phosphatase alcaline des cellules de calvaria de rat cultivées sur la

surface greffées est supérieure de celle des cellules cultivées sur la surface non modifiée ou oxydée. Ceci est en accord avec d'autres études qui ont montré que des modifications chimiques de la surface en titane influents sur la différenciation ostéoblastique. Par exemple, l'activité phosphatase alcaline de cellules de calvaria de rat en culture sur un terpolymère poly(styrène sulfonate-méthacrylate de sodium acide-méthacrylate) dépend de la composition chimique des groupes ioniques, et la plus haute valeur est obtenus pour $R = \frac{(\text{COO}^-)}{(\text{COO}^- + \text{NaSS})} \geq 0,7$ (Anagnostou et al., 2006). D'autres ions peuvent altérer l'activité phosphatase alcaline. L'activité phosphatase alcaline sur les surfaces en titane modifiées par les ions de calcium, est plus élevé que sur les surfaces modifiées par les ions phosphates (Feng et al., 2004).

L'effet des groupements sulfonates sur la différenciation ostéoblastique pourrait être médié par plusieurs mécanismes. L'oxydation et le greffage de polyNaSS sont susceptible d'altérer l'énergie et la mouillabilité des surface de titane (Hélary et al., 2009). Néanmoins, les protéines d'adhésion cellulaire, telle que la fibronectine, peuvent être impliquées. Sur les surfaces modifiées, la quantité de ces protéines adsorbées à la surface et/ou leur conformation pourraient être différentes. Par exemple, les sites ioniques de Ca^{++} à la surface d'un matériau favorisent l'adsorption protéique telle que la fibronectine et la vitronectine du fait de la charge positive (Feng et al., 2004). Stanislawski *et al.*, (1993) ont montré que les radicaux sulfonates entraînaient une modification conformationnelle de la fibronectine adsorbée. Garcia *et al.*, (1999) ont montré que des protéines d'adhérence tel que la fibronectine, adsorbées sur des substrats divers présentaient des conformations différentes. De telles différences des protéines adsorbées peuvent moduler la différenciation ostéoblastique. Stephansson *et al.*, (2002) ont montré que le changement conformationnel de la fibronectine à la surface de différents substrats avait un effet direct sur la prolifération et la différenciation d'une lignée

ostéoblastique. Ainsi des changements conformationnels seraient susceptibles de moduler la liaison aux intégrines sur la surface des cellules et influencer la prolifération et/ou la différenciation ostéoblastique. Par ailleurs, nos résultats montrent des valeurs des aires de nodules de calcium sur le titane greffé supérieures de celles observées sur les deux autres surfaces. Cet effet peut être lié à l'augmentation de la activité phosphatase alcaline, qui est une ecto-phosphohydrolase qui catalyse l'hydrolyse du β -glycérophosphate et génèrent des ions phosphate (**Anagnostou et al., 1996**), et il peut être aussi lié ou d'autres agents de nucléation tel que le collagène type I. Néanmoins nous n'avons pas pu mettre en évidence aucune différence significative en terme de la teneur en collagène de tapis cellulaire entre les surfaces testées.

6. Conclusion

En conclusion, la présence des groupements sulfonates sur des surfaces en titane commercialement pur permet l'adhésion et la prolifération de cellules osseuses et augmente l'activité de la phosphatase alcaline et les dépôts du minéral dans le tapis cellulaire. Ces groupements inhibent à la fois l'adhésion de *S. aureus*; l'inhibition observé sur des surfaces en titane greffées à hauteur de 90%. Ces surfaces modifiées pourraient donc être intéressantes en application clinique en revêtements d'implants orthopédiques, prévenant ainsi l'infection sur matériel tout en permettant une réponse tissulaire normale, voir « meilleure » à l'interface. Par ailleurs, des études doivent être menées pour comprendre les mécanismes par lesquels les groupements sulfonates interfèrent avec la différenciation ostéoblastique.

Bibliographie

- 1- **Anagnostou F, Debet A, Pavon-Djavid G, Goudaby Z, Helary G, Migonney V. Osteoblast functions on functionalized PMMA-based polymers exhibiting Staphylococcus aureus adhesion inhibition.** *Biomaterials*, 2006. 27:3912–9.
- 2- **Anagnostou F, Plas C, Nefussi JR, Forest N. Role of beta-GP-derived Pi in mineralization via ecto-alkaline phosphatase in cultured fetal calvaria cells.** *J Cell Biochem*, 1996. 62(2):262-74.
- 3- **Anselme K, Bigerelle M. Modelling approach in cell/material interactions studies.** *Biomaterials*, 2006. 27(8):1187-99.
- 4- **Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials.** *Biomaterials*, 2000. 21(7):667-81.
- 5- **Anselme K, Noel B, Hardouin P. Human osteoblast adhesion on titanium alloy, stainless steel, glass and plastic substrates with same surface topography.** *J Mater Sci Mater Med*, 1999. 10(12):815-9.
- 6- **Antoci V Jr, Adams CS, Parvizi J, Ducheyne P, Shapiro IM, Hickok NJ. Covalently attached vancomycin provides a nanoscale antibacterial surface.** *Clin Orthop Relat Res*, 2007. 461:81-7.
- 7- **Bachle M, Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells.** *Clin Oral Implants Res*, 2004. 15(6):683-92.
- 8- **Becker J, Kirsch A, Schwarz F, Chatziniokolaidou M, Rothamel D, Lekovic V, Laub M, Jennissen HP. Bone apposition to titanium implants biocoated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). A pilot study in dogs.** *Clin Oral Investig*, 2006. 10(3):217-24.
- 9- **Berlot S, Aissaoui Z, Pavon-Djavid G, Benlley J, Jozefowicz M, H elary G, Migonney V. Biomimetic Poly(methyl methacrylate)-Based Terpolymers: Modulation of Bacterial Adhesion Effect.** *Biomacromolecules*, 2002. 3:63-68.
- 10- **Bierbaum S, Hempel U, Geissler U, Hanke T, Scharnweber D, Wenzel KW, Worch H. Modification of TiAL6V4 surfaces using collagen I, III, and fibronectin. II. Influence on osteoblast responses.** *J Biomed Mater Res*, 2003. 1;67A(2):431-8.
- 11- **Bio Sant Info. Information mensuelle sur les march s de la bio-sant  - N 6 - Juillet 2007.**
- 12- **Breme H.J, Helsen J.A. Selection of Materials. Metals as Biomaterials,  d. J. Wiley & Sons, 1998. 1-35.**
- 13- **Breme J. Titanium and titanium alloys, biomaterials of preference.** *M m. et Etudes Sc. Rev. de M tallurgie*, 1989. 625-637.

- 14- Ciobanu M, Siove A, Gueguen V, Gamble LJ, Castner DG, Migonney V. **Radical graft polymerization of styrene sulfonate on poly(ethylene terephthalate) films for ACL applications: “grafting from” and chemical characterization.** *Biomacromolecules*, 2006. 7:755–760.
- 15- Collin P, Nefussi JR, Wetterwald A, Nicolas V, Boy-Lefevre ML, Fleisch H, Forest N. **Expression of Collagen, Osteocalcin, and Bone Alkaline Phosphatase in a Mineralizing Rat Osteoblastic Cell Culture.** *Calcif Tissue Int*, 1992. 50:175-183.
- 16- Clokie CM, Bell RC. **Recombinant human transforming growth factor beta-1 and its effects on osseointegration.** *J Craniofac Surg*, 2003. 14(3):268-77.
- 17- Costerton JW. **Introduction to biofilm.** *Int J Antimicrob Agents*, 1999. 11:217-21; discussion 237-9.
- 18- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.** *Science*, 1999. 284:1318-22.
- 19- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. **Bacterial biofilms in nature and disease.** *Annu Rev Microbiol*, 1987. 41:435-64.
- 20- Crémieux A-C, Pavon-Djavid G, Saleh Mghir A, Héлары G, Migonney V. **Bioactive polymers grafted on silicone to prevent Staphylococcus aureus prosthesis adherence: in vitro and in vivo studies.** *J of Applied Biomaterials Biomechanics*, 2003. 1: 178-185.
- 21- Del Curto B, Brunella MF, Giordano C, Pedferri MP, Valtulina V, Visai L, Cigada A. **Decreased bacterial adhesion to surface-treated titanium.** *Int J Artif Organs*, 2005. 28(7):718-30.
- 22- Desai NP, Hossainy SF, Hubbell JA. **Surface-immobilized polyethylene oxide for bacterial repellence.** *Biomaterials*, 1992. 13(7):417-20.
- 23- Dunne WM, Jr. **Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?** *Clin Microbiol Rev*, 2002. 15:155-66.
- 24- El Khadali F, Héлары G, Pavon-Djavid G, Migonney V. **Modulating Fibroblast Cell Proliferation with Functionalized Poly(methyl methacrylate) Based Copolymers Chemical Composition and Monomer Distribution Effect.** *Biomacromolecules*, 2002. 3:51-56.
- 25- Feng B, Weng J, Yang BC, Qu SX, Zhang XD. **Characterization of titanium surfaces with calcium and phosphate and osteoblast adhesion.** *Biomaterials*, 2004. 25(17):3421-8.
- 26- Feng B, Weng J, Yang BC, Qu SX, Zhang XD. **Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast.** *Biomaterials*, 2003. 24(25):4663-70.

- 27- Foster TJ, McDevitt D. **Surface-associated proteins of Staphylococcus aureus: their possible roles in virulence.** FEMS Microbiol Lett, 1994. 118(3):199-205.
- 28- François P, Vaudaux P, Taborelli M, Tonetti M, Lew DP, Descouts P. **Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (II) Adsorption isotherms and biological activity of immobilized fibronectin.** Clin Oral Implants Res, 1997. 8(3):217-25.
- 29- Francois P, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP. **Host-bacteria interactions in foreign body infections.** Infect Control Hosp Epidemiol, 1996. 17:514–20.
- 30- Gabriel M, Nazmi K, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV, Zentner A. **Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity.** Bioconjug Chem, 2006. 17(2):548-50.
- 31- Goudiaby MZ, **Moudulation de la différenciation ostéoblastique par des polymères bioactifs à bas de poly(méthacrylate de méthyle).** Thèse 2004.
- 32- Garcia AJ, Vega MD, Boettiger D. **Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation.** Mol Biol Cell, 1999. 10(3):785-98.
- 33- Grainger DW, Pavon-Djavid G, Migonney V, Jozefowicz M. **3- Assessment of fibronectin conformation adsorbed to polytetrafluoroethylene surfaces from serum protein mixtures and correlation to support of cell attachment in culture.** J Biomater Sci Polym Ed, 2003. 14:973–88.
- 34- Hallab N, Bundy K, O'Connor V, Clark R, Moses R. **Cell adhesion to biomaterials: correlations between surface charge, surface roughness, adsorbed protein and cell morphology.** J Long-Term Eff Med Implants, 1995. 53:209-31.
- 35- Harris LG, Patterson LM, Bacon C, Gwynn I ap, Richards RG. **Assessment of the cytocompatibility of different coated titanium surfaces to fibroblasts and osteoblasts.** J Biomed Mater Res A, 2005.1;73(1):12-20.
- 36- Helary G, Noirclere F, Mayingi J, Migonney V. **A new approach to graft bioactive polymer on titanium implants: Improvement of MG 63 cell differentiation onto this coating.** Acta Biomaterialia, 2009. 5:124–133.
- 37- Helary G, Belleney L, Heinrich L, Migonney V. **Copolymerization of 3-methacryloxy propyl tris(trimethyl siloxy) silane, methacrylic acid and dimethyl octyl ammonium styrene sulfonate. Determination of reactivity ratios.** Euroean Polymer Journal, 2000. 36(11):2365-9.
- 38- Janot C et Sedel L: **Les Biomatériaux.** Cahier de synthèse du CNRS (2000).
- 39- Jansen JA, Vehof JW, Ruhé PQ, Kroeze-Deutman H, Kuboki Y, Takita H, Hedberg EL, Mikos AG. **Growth factor-loaded scaffolds for bone engineering.** J Control Release, 2005. 3;101(1-3):127-36.

- 40- Jayaraman M, Meyer U, Bühner M, Joos U, Wiesmann HP. **Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro.** *Biomaterials*, 2004. 25: 625-631.
- 41- Jimenez W, Pares A, Cabellera J, Heredia D, Bruguera M, Torres M, Rodes J, **Measurement of fibrosis in needle biopsies : evaluation of a colorimetric method.** *Hepatology*, 1985. 5:5, 815-18.
- 42- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR, **Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections.** *J Histochem*, 1979. 11(4):447-55.
- 43- Kadry AA, Tawfik A, Abu El-Asrar AA, Shibl AM. **Reduction of mucoid Staphylococcus epidermidis adherence to intraocular lenses by selected antimicrobial agents.** *Chemotherapy*, 1999. 45:56-60.
- 44- Knabe C, Howlett CR, Klar F, Zreiqat H. **The effect of different titanium and hydroxyapatite-coated dental implant surfaces on phenotypic expression of human bone-derived cells.** *J Biomed Mater Res*, 2004. 1;71A(1):98-107.
- 45- Kodjikian L, Roques C, Campanac C, Doleans A, Baillif S, Pellon G, Renaud F.N.R, Hartmann D, Freney J, Burillon C. **Biofilms à staphylococcus epidermidis à la surface des implants intraoculaires.** *J Fr. Ophtalmol*, 2005. 28:2,224-230.
- 46- Kroese-Deutman HC, van den Dolder J, Spauwen PH, Jansen JA. **Influence of RGD-loaded titanium implants on bone formation in vivo.** *Tissue Eng*, 2005. 11(11-12):1867-75.
- 47- Kunzler TP, Huwiler C, Drobek T, Vörös J, Spencer ND. **Systematic study of osteoblast response to nanotopography by means of nanoparticle-density gradients.** *Biomaterials*, 2007. 28(33):5000-6.
- 48- Latz C, Pavon-Djavid G, Helary G, Evans MD, Migonney V. **Alternative intracellular signaling mechanism involved in the inhibitory biological response of functionalized PMMA-based polymers.** *Biomacromolecules*, 2003. 4(3):766-71.
- 49- Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. **Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration.** *Dental Materials*, 2007. 23:844-854.
- 50- Li J, Liao H, Fartash B, Hermannsson L, Johnsson T. **Surface-dimpled commercially pure titanium implant and bone ingrowth.** *Biomaterials*, 1997. 18: 691-696.
- 51- Liu L, Qin C, Butler WT, Ratner BD, Jiang S. **Controlling the orientation of bone osteopontin via its specific binding with collagen I to modulate osteoblast adhesion.** *J Biomed Mater Res*, 2007. 80:102-10.
- 52- Luke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Haas NP, Raschke M. **Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats.** *Bone*, 2003. 32(5):521-31.

- 53- MacDonald DE, Rapuano BE, Deo N, Stranick M, Somasundaran P, Boskey AL. **Thermal and chemical modification of titanium-aluminum-vanadium implant materials: effects on surface properties, glycoprotein adsorption, and MG63 cell attachment.** *Biomaterials*, 2004. 25(16):3135-46.
- 54- Mack D. **Molecular mechanisms of Staphylococcus epidermidis biofilm formation.** *J Hosp Infect*, 1999. 43:S113-25.
- 55- Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford JJr, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. **Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63).** *J Biomed Mater Res*, 1995. 29:389-401.
- 56- Meyer U, Büchter A, Wiesmann HP, Joos U, Jones DB. **Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces.** *Eur Cell Mater*, 2005. 26;9:39-49.
- 57- Michiardi A, Hélarly G, Nguyen PC, Gamble LJ, Anagnostou F, Castner DG, Migonney V. **Bioactive polymer grafting onto titanium alloy surfaces.** *Acta Biomater*, 2010. 6(2):667-75.
- 58- Morra M, Cassineli C. **Non-fouling properties of polysaccharide-coated surfaces.** *J Biomater Sci Polym Ed*, 1999. 10(10):1107-24.
- 59- Najab-nehayoun M, Serne H, Jozefowicz M, Ficher AM, Brisson C, Sultan Y. **Human umbilical vein endothelial cell culture on heparin-like microcarriers.** *J Biomed Mater Res*, 1993. 27(4):511-20.
- 60- Nefussi JR, Boy-Lefevre ML, Boulekbache H, Forest N. **Mineralization in vitro of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion.** *Differentiation*, 1985. 29(2):160-8.
- 61- Ni Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Hook M, Foster TJ. **Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of Staphylococcus aureus.** *Mol Microbiol*, 1998. 30(2):245-257.
- 62- Park BS, Heo SJ, Kim CS, Oh JE, Kim JM, Lee G, Park WH, Chung CP, Min BM. **Effects of adhesion molecules on the behavior of osteoblast-like cells and normal human fibroblasts on different titanium surfaces.** *J Biomed Mater Res*, 2005. 74A:640-651.
- 63- Pavon-Djavid G, Helary G, Migonney V. **Les biomatériaux inhibiteurs de l'adhérence et de la prolifération bactérienne : un enjeu pour la prévention des infections sur matériel prothétique.** *ITBM-RBM*, 2005. 26:183.
- 64- Pearson BS, Klebe RJ, Boyan BD, Moskowitz D. **Comments on the clinical application of fibronectin in dentistry.** *J Dent Res*, 1988. 67:515-517.
- 65- Petrini P, Arciola CR, Pezzali I, Bozzini S, Montanaro L, Tanzi MC, Speziale P, Visai L. **Antibacterial activity of zinc modified titanium oxide surface.** *Int J Artif Organs*, 2006. 29(4):434-42.

- 66- Pilliar RM. Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous surface-structured designs. *Implant Dent*, 1998. 7: 305-314.
- 67- Pinna A, Sechi LA, Zanetti S, Delogu D, Carta F. Adherence of ocular isolates of *Staphylococcus epidermidis* to ACRYSOF intraocular lenses. A scanning electron microscopy and molecular biology study. *Ophthalmology*, 2000. 107:2162-6.
- 68- Planell J.A, Gil F.J. Contribution of metals and alloys to the design and development of biomaterials. *Anales de Química Int*, 1997. 93:17-21.
- 69- Postiglione L, Di Domenico G, Ramaglia L, Montagnani S, Salzano S, Di Meglio F, Sbordone L, Vitale M, Rossi G. Behavior of SaOS-2 cells cultured on different titanium surfaces. *J Dent Res*, 2003. 82(9):692-6.
- 70- Puzas JE, Sickel MJ, Felter ME. Osteoblasts and chondrocytes are important target celles for the toxic effects of lead. *Neurotoxicology*, 1992. 13(4):783-8.
- 71- Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*, 1999. 20(23-24):2311-21.
- 72- Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, Scharnweber D, Zwipp H, Schneiders W. Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials*, 2006. 27(32):5561-71.
- 73- Ronold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE. Analysing the optimal value for titanium implant roughness in bone attachment using a tensile test. *Biomaterials*, 2003. 24:4559-4564.
- 74- Rosa AL, Beloti MM, Effect of cpTi Surface Roughness on Human Bone Marrow Cell Attachment, Proliferation, and Differentiation. *Braz Dent J*, 2003. 14(1):16-21.
- 75- Sano S, Kato K, Ikada Y. Introduction of functional groups onto the surface of polyethylene for protein immobilization. *Biomaterials*, 1993. 14:817-822.
- 76- Schakenraad JM, Busscher HJ, Wilevuur CRH, Arends J. The influence of substratum surface free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins. *J Biomed Mater Res*, 1986. 20:773-84.
- 77- Schmidmaier G, Wildemann B, Schwabe P, Stange R, Hoffmann J, Südkamp NP, Haas NP, Raschke M. A new electrochemically graded hydroxyapatite coating for osteosynthetic implants promotes implant osteointegration in a rat model. *J Biomed Mater Res*, 2002. 63(2):168-72.
- 78- Schmidt R. *Comportement des matériaux dans les milieux biologiques*. Traité des matériaux, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes 7, 1999.

- 79- Schutz R.W. **Surface treatments for expanding titanium alloy applications limits: an overview.** Surface Performance of Titanium, 1997. TMS:1-22.
- 80- Schwartz Z, Lohmann CH, Oefinger J, Bonewald LF, Dean DD, Boyan BD. **Implant Surface Characteristics Modulate Differentiation Behavior Of Cells In The Osteoblastic Lineage.** Adv Dent Res, 1999. 13:38-48.
- 81- Seol YJ, Park YJ, Lee SC, Kim KH, Lee JY, Kim TI, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC, Han SB, Chung CP. **Enhanced osteogenic promotion around dental implants with synthetic binding motif mimicking bone morphogenetic protein (BMP)-2.** J Biomed Mater Res A, 2006. 1;77(3):599-607.
- 82- Shibata Y, Kawai H, Yamamoto H, Igarashi T, Miyazaki T. **Antibacterial titanium plate anodized by being discharged in NaCl solution exhibits cell compatibility.** J Dent Res, 2004. 83(2):115-9.
- 83- Stangl R, Rinne B, Kastl S, Hendrich C. **The Influence of Pore Geometry in Cp Ti Implants – A Cell Culture Investigation.** European Cell and Materials, 2001. 2: 1-9.
- 84- Stanislawski L, Serne H, Stanislawski M, Jozefowicz M. **Conformational changes of fibronectin induced by polystyrene derivatives with a heparin-like function.** J Biomed Mater Res, 1993. 27(5):619-26.
- 85- Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M. **Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation.** Physiol Rev, 1996. 76(2):593-629.
- 86- Stephansson SN, Byers B1, Grcia AJ. **Enhanced expression of the osteoblastic phenotype on substrates that modulates fibronectin conformation and integrin receptor binding.** Biomaeriles, 2002. 23(12):2527-34.
- 87- Sutherland IW. **Microbial exopolysaccharides – their role in microbial adhesion in aqueous systems.** Crit Rev Microbiol, 1983. 10:173-201.
- 88- Takeuchi K, Saruwatari L, Nakamura HK, Yang JM, Ogawa T. **Enhanced intrinsic biomechanical properties of osteoblastic mineralized tissue on roughened titanium surface.** J Biomed Mater Res A, 2005. 1;72(3):296-305.
- 89- Tullberg-Reinert H, Jundt G, **In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay : effects of transforming growth factor beta2 and ascorbic acid 2-phosphate.** Histochem Cell Biol, 1999. 112(4):271-6.
- 90- Vacheethasane K, Marchant RE. **Surfactant polymers designed to suppress bacterial (Staphylococcus epidermidis) adhesion on biomaterials.** J Biomed Mater Res, 2000. 5;50(3):302-12.
- 91- Vafidis GC, Marsh RJ, Stacey AR. **Bacterial contamination of intraocular lens surgery.** Br J Ophthalmol, 1984. 68(8):520-3.

- 92- **Viornerly C, Guenther HL, Aronsson BO, Pechy P, Descouts P, Gratzel M. Osteoblast culture on polished titanium disks modified with phosphonic acids.** *J Biomed Mater Res*, 2002. 62(1):149-55.
- 93- **Wana Y.Z, Ramanb S, Hea F, Huang Y. Surface modification of medical metals by ion implantation of silver and copper.** *Vacuum*, 2007. 81:1114-8. (I)
- 94- **Wana Y.Z, Xiongb G.Y, Lianga H, Ramanc S, Hea F, Huang Y. Modification of medical metals by ion implantation of copper.** *Applied Surface Science*, 2007. 253:9426-9. (II)
- 95- **Weiss RE, Reddi AH. Appearance of fibronectin during the differentiation of cartilage, bone and bone marrow.** *J Cell Biol*, 1981. 88:630-636.
- 96- **Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies.** *Clin Oral Implants Res*, 1995. 6:24-30.
- 97- **Wieland M, Textor M, Chehroudi B, Brunette DM. Synergistic interaction of topographic features in the production of bone-like nodules on Ti surfaces by rat osteoblasts.** *Biomaterials*, 2005. 26(10):1119-30.
- 98- **Williams D.F. Consensus and definitions in biomaterials.** *Advances in Biomaterials*. Elsevier, 1988. 121-26.
- 99- **Zhang F, Shi ZL, Chua PH, Kang ET, Neoh KG. Functionalization of Titanium Surfaces via Controlled Living Radical Polymerization: From Antibacterial Surface to Surface for Osteoblast Adhesion.** *Industrial & engineering chemistry research*, 2007. 46:9077-86.
- 100- **Zhang YM, Bataillon-Linez P, Huang P, Zhao YM, Han Y, Traisnel M, Xu KW, Hildebrand HF. Surface analyses of micro-arc oxidized and hydrothermally treated titanium and effect on osteoblast behavior.** *J Biomed Mater Res*, 2004. 1;68A(2):383-91.
- 101- **Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan BD. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure.** *J Biomed Mater Res*, 2005. 74A: p. 49-58.
- 102- **Zhoua J, Pavon-Djavid G, Anagnostou F, Migonney V. Inhibition of Porphyromonas gingivalis adherence on titanium surface grafted by poly(sodium styrene sulfonate).** *ITBM-RBM*, 2007. 28:42-48.
- 103- **Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J, Wieland M, Landolt D, Boyan B. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features.** *Biomaterials*, 2005. 26:1837-1847.

Publications et Communications

1- Articles:

Alcheikh A., Migonney V., Pavon-Djavid G., Helary G., Sedel L., F. Anagnostou. Poly NaSS grafting on titanium inhibits *S. aureus* adhesion and promotes osteoblast functions (en redaction).

2- Communications orales internationales:

Alcheikh A., Migonney V., Helary G., Pavon-Djavid G. , Anagnostou F. Sulfonate-grafting of titanium enhances osteoblast differentiation and inhibits *S. aureus* adhesion. IADR Juillet 2010, Barcelone, Espagne, accepté (Poster).

Kerner S., **Alcheikh A.**, Charrier J-B, Helary G., Deschepper M., Sedel L., Migonney V., Anagnostou F. Behavior of human mandibular bone cells on Ticp grafted with sulfonate. groups IADR Juillet 2010 Barcelone, Espagne, accepté (Poster).

Alcheikh A., Pavon-Djavid G., Helary G., Migonney V., Anagnostou F. Osteoblast functions on titanium modified by bioactive antibacterial sulfonate groups. European Federation of Periodontology Europerio 6, Juin 2009 ; Stocholm Suède J Clin Perio; 36 S 9 juin 2009 No 124 (Poster).

3- Communications orales Nationales

A Alcheikh, G Pavon-Djavid, G Helary, V Migonney, F Anagnostou. Effets de modifications de la surface de titane par greffage NaSS présentant des propriétés inhibitrices de l'adhésion bactérienne sur la réponse ostéoblastique. Société Française de parodontologie et implantologie orale, Juin 2008 ; La grande Motte.