



**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE
SORBONNE PARIS NORD**

ECOLE DOCTORALE GALILEE

Présentée et soutenue publiquement par **Amina BEN ABLA**

Le 16 juillet 2021

En vue de l'obtention du titre de docteur de L'université Sorbonne Paris Nord

Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

**Développement de biomatériaux bio- actifs
et fonctionnalisés par des domaines de la
Fibronectine humaine**

Dirigée par :

Pr. Didier LUTOMSKI

Pr. Abdellatif ELM'SELMI

Devant le jury composé de :

Mr. Dominique LEDOUX

Président

Mme. Nada NAAMAN

Rapporteur

Mr. Alain CHAPEL

Rapporteur

Mme. Patricia ALBANESE

Examineur

Mme. Samar ISSA

Membre invitée

Mr. Abdelatif ELM'SELMI

Directeur de thèse

Mr. Didier LUTOMSKI

Directeur de thèse

À l'âme de ma grand-mère Najiba,

Mami, là où tu es j'espère que tu es fière de moi...

À mes parents Raja et Abdelkarim

Remerciements

Ce manuscrit de thèse est l'aboutissement d'un long cheminement au cours duquel j'ai eu la chance de bénéficier de l'encadrement, des encouragements et du soutien de plusieurs personnes. Au moment où il s'achève, je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à tous ceux qui, par leur aide directe ou indirecte, ont rendu sa réalisation possible.

Je tiens à remercier les membres du jury de m'avoir fait honneur d'accepter d'évaluer ce travail de thèse, Mme. Nada NAAMAN et Mr. Alain CHAPEL d'avoir accepté d'en être rapporteur, à Mme. Patricia ALBANESE d'avoir accepté d'en être examinateur et Mr Dominique LEDOUX d'avoir accepté de présider ce jury. J'adresse également mes remerciements les plus sincères à Mme Samar ISSA pour avoir accepté de siéger en tant que membre invité au sein de ce jury.

Je remercie Madame Florence DUFOUR, Directeur générale de l'école de biologie industrielle (EBI), de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de son établissement ainsi que pour le financement de cette thèse.

Je souhaite tout d'abord adresser mes sincères remerciements à mes deux directeurs de thèse Mr. Didier LUTOMSKI et Mr. Abdellatif ELM'SELMI ;

Mr. Lutomski, Je tiens à vous exprimer ma sincère gratitude et mes vifs remerciements d'avoir accepté de diriger mes travaux de thèses, de m'avoir accueillie chaleureusement au sein de votre équipe, de m'avoir fait confiance, de votre constante bonne humeur et pour tout le soutien moral et scientifique que vous m'avez apportée pendant cette thèse. J'admire beaucoup vos qualités humaines et scientifiques et je vous remercie également pour vos encouragements et vos compliments intarissables, vos conseils judicieux, votre confiance mobilisatrice et la correction de ce manuscrit. Même s'il était difficile de vous joindre quelquefois mais je n'oublierai jamais vos mots à la fin de chaque revue de thèse, sachez qu'ils m'ont à chaque fois beaucoup motivée pour garder la barre à la hauteur de vos attentes. Merci énormément Monsieur !! j'ai été honorée de profiter de votre encadrement.

Mr. Elm'selmi, nul remerciement ne saurait bien exprimer la profondeur de la gratitude et la reconnaissance que j'ai envers vous Monsieur. Aucun remerciement ne saurait être à la hauteur de toutes l'aide, l'encadrement, l'attention et la formation que vous m'avez apportée depuis que j'ai commencé à travailler avec vous. Mes remerciements ne pourront jamais suffire. J'essayerai d'être le plus synthétique ici mais sachez que ce travail n'aurait pas été possible sans vous. Merci pour m'avoir accueilli dans votre équipe depuis mon stage de fin d'étude. La confiance et la grande liberté que vous m'avez accordée m'ont permis de mener à bien mon travail de recherche. Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans votre disponibilité à 100% , vos conseils scientifiques, votre encadrement et votre soutien moral. J'ai pu bénéficier, durant ces trois années et demie, de votre goût pour la recherche que vous avez su me communiquer sans se départir de vos qualités humaines. Je n'oublierai jamais nos réunions quotidiennes à travers lesquelles vos remarques, critiques et conseils m'ont apporté beaucoup de maturité scientifique et ont contribué à alimenter ma réflexion et ma vision. Je tiens aussi à vous exprimer toute mon admiration pour vos compétences, votre vision de la science et votre

générosité humaine et scientifique. Je vous suis reconnaissante éternellement Monsieur et j'ai été honorée de profiter de votre encadrement.

Je tiens à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de l'EBI depuis mon stage de fin d'étude, et j'en remercie ici tous les personnels et les professeurs de l'EBI. Le caractère pluridisciplinaire de ce travail de thèse m'a mené à interagir avec presque tous les profs de l'EBI et je remercie tous ceux qui ont consacré leur temps à m'aider et me conseiller notamment Dr. Nathalie Guilbert pour sa précieuse aide pour la partie bioréacteur, Nathalie je n'oublierai jamais les heures que nous avons passé ensemble à « bricoler » pour prendre la main sur Lucillus. Je remercie tout particulièrement aussi Dr Samar ISSA, Dr Rabah Azouani, Dr. Karim Senni, Dr. Christine Mielcarek pour leur gentillesse, leur précieux conseils et encouragements.

J'adresse un grand merci à toute l'équipe de Paris 13 pour m'avoir accueillie et m'avoir offert un cadre convivial où je me suis sentie à l'aise dès le premier jour. Je remercie Dr Sylvie Changotade pour son aide, sa gentillesse, sa disponibilité, la qualité de nos échanges et les discussions scientifiques très enrichissantes. Je remercie également Dr. Géraldine Rohman pour ses conseils utiles, son aide et sa disponibilité et bien évidemment pour tous les PCLUs qu'elle m'avait fournis. Merci à Dr Florence Poirier pour son accueil chaleureux, sa gentillesse et ses mots d'encouragement.

Je suis sincèrement reconnaissante à mes chers enseignants à l'INSAT Pr. Hassib Bouallagui et Dr. Baligh Miladi qui ont initié cette aventure dans le cadre de la collaboration entre l'INSAT et l'EBI. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre bienveillance et accompagnement depuis le début de cette aventure. Merci aussi pour votre amitié, votre aide incommensurable, vos conseils avisés et tous les moments qu'on a partagé ensemble. Hassib et Baligh, merci du fond du cœur mes chers amis !

Un chaleureux merci à Mr Ahmed Elmarjou pour ses conseils, son implication et tous nos échanges intéressants qui m'ont été d'une aide précieuse et ont facilité mon travail.

Merci à Guilhem Boeuf d'avoir été l'élément clé de pouvoir mener à bien cette aventure depuis mon stage de fin d'étude. Merci pour ton aide, ton soutien constant, ton amitié inconditionnelle et ta disponibilité. Tu as toujours été à l'écoute et tu as su m'orienter et me conseiller de la meilleure façon possible. Tu as été là dans les meilleurs comme dans les pires moments. Je te remercie profondément pour tous ce qu'on a partagé ensemble, tu es un très cher ami et grand frère pour moi. Merci à mes partenaires de traversée de cet océan qu'est la thèse, Rania et Saddam, qui ont contribué à rendre cette expérience mémorable. Merci pour votre amitiés et soutiens inconditionnels, votre partage d'expérience incessant, vous étiez toujours là pour moi, j'étais votre fille adoptée et vous avez mené à bien la mission des parents !! Enfin, merci pour tous les moments précieux qu'on a partagé ensemble dans la « tour de contrôle » Qu'est-ce qu'on a pu rigoler ! Je remercie également Marjorie, Marion, Elodie pour leur gentillesse et convivialité durant ces années à l'EBI, Anne et Chredson pour leur accueil chaleureux à Paris 13, leurs aide et convivialité.

Stagiaires, assistants et étudiants de l'EBI qui sont passés au laboratoire de recherche en biologie moléculaire à l'EBI, je vous adresse mes vifs remerciements, ce fut un vrai plaisir

de vous encadrer dans vos travaux de recherche et votre module de RIAB, à Adouma mon fils adopté, à Mariem, Célia, Manuel, Pauline, Laure, Romane, Lilas, Gael, Mathieu, Eloise, Sirine, Agnès, Célia, Léa et à tous ceux que j'ai pu oublier.

Au terme de ce parcours, je profite pour remercier ceux et celles qui me sont très chers et qui m'ont entourée, soulagée et soutenue pendant cette thèse et d'ailleurs depuis que je les ai connus, au moins depuis 7 ans. Emir, Hajourti, Woudi, Saroura et Mariouma. Emir merci pour ta patience, ta confiance, tes encouragements, ton soutien quotidien indéfectible et ton optimisme contagieux qui m'ont permis de tenir jusqu'au bout. Hajourti ma sœur du cœur et mon plus grand support, merci pour ton affection maintes fois renouvelée et ta compagnie précieuse dans les meilleures ainsi que les pires moments.

Et c'est plein d'émotions que j'adresse mes plus grands remerciements à ma famille qui m'a toujours soutenue et encouragée. A mes très chers parents envers lesquels j'exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance, sans eux je ne serai ce que je suis aujourd'hui. Merci papa et maman Raja et Abdelkrim de m'avoir toujours poussé vers tous ce qu'il y a de mieux pour moi, pour tous vos sacrifices et votre amour. Merci à mes sœurs et frères de m'avoir épaulé et soutenu jusqu'au bout, Hedia, ma grande sœur et ma protectrice, je n'oublierai jamais les mois de confinement qu'on a passé ensemble chez toi pendant cette thèse, Salih et Toutou merci pour vos encouragements permanents et votre humeur constante et vos blagues qui me soulagent dès que je commence à stresser. Enfin à ma petite sœur Eya, mon âme jumelle, ma moitié, mon ange gardien et ma confidente merci d'être toujours là pour moi et de m'encourager et m'accompagner au quotidien même avec la distance qui nous sépare. Merci de de me prêter ton épaule tout au long de ce chemin, merci d'apaiser mes peurs et pleurs peu importe la situation, tu as toujours les mots et l'action qu'il faut, tu m'as toujours fait sentir que tu es derrière moi et tu me sais reconnaître les moments où j'avais besoin le plus besoin de ton support. Merci d'être la sœur que tu es. Merci de me toujours suivre et m'encourager dans mes projets et dans mes rêves !

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée particulière à ma raison d'être, ma source de bonheur et de motivation, ma vie et mon modèle, à la personne qui m'a donné vie et m'a tout donné, ma chère mère Raja. Sa présence son sourire et ses encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais. Je dédie ce travail à toi ma maman !

Table des matières

<i>Introduction</i>	16
<i>Chapitre I : Etat de l'art</i>	23
I. Bio ingénierie, biomatériaux et fonctionnalisation :	23
I.1. Généralités sur les biomatériaux et l'os :	24
I.1.1. Définition de biomatériau :	24
I.1.2. Biomatériaux pour la réparation osseuse	25
I.2. L'ingénierie tissulaire	30
I.3. Limites et problèmes d'utilisation des substituts osseux	34
I.3.1. Généralités sur la réponse tissulaire aux biomatériaux	34
I.3.2. Matériaux d'implantation osseuse et défis actuels.....	37
I.4. Stratégies de fonctionnalisation des biomatériaux	41
I.4.1. Stratégies de fonctionnalisation physique	42
I.4.2. Stratégies de fonctionnalisation chimiques	44
I.5. Stratégies de fonctionnalisation biologique.....	46
II. La fibronectine	50
II.1. Structure :	51
II.2. Biosynthèse de la fibronectine.....	52
II.3. Les différentes formes de la fibronectine	53
II.3.1. La fibronectine plasmatique	53
II.3.2. La fibronectine cellulaire	54
II.4. Organisation des domaines de la fibronectine	54
II.4.1. Domaines d'interaction fibronectine-intégrine :	55
II.4.2. Domaines d'interaction avec le collagène.....	57
II.4.3. Domaines d'interaction avec la fibrine	58
II.4.4. Domaines d'interaction avec l'héparine.....	58
II.5. Implication de la fibronectine dans le fonctionnement cellulaire.....	59
II.5.1. L'adhésion cellulaire médiée par les intégrines	59
II.5.2. La migration cellulaire	60
II.5.3. La prolifération cellulaire	62
II.5.4. Différenciation cellulaire	63
II.6. Stratégies de bio activation des biomatériaux par la Fibronectine	63

II.7.	Production de la Fibronectine et de ces domaines fonctionnels	65
II.7.1.	Production des domaines de la FN par la technologie des protéines recombinantes 66	
III.	Technologie recombinante	68
III.1.	Les protéines recombinantes	68
III.2.	Les systèmes d'expression.....	70
III.3.	Expression des protéines recombinantes chez <i>E. coli</i>	75
III.3.1.	Expression des protéines dans les corps d'inclusion.....	76
III.4.	Optimisation de l'expression soluble des protéines recombinantes chez <i>E. coli</i> ...	78
III.4.1.	Utilisation des partenaires de fusion pour améliorer les rendements des protéines recombinantes	79
III.4.2.	L'optimisation des conditions de production	86
Chapitre II: Matériels et méthodes		98
IV.	Introduction.....	94
V.	Matériels	94
V.1.	Matériels biologiques :	94
V.1.1.	Vecteurs.....	94
V.1.2.	Souches bactériennes.....	98
V.1.3.	Cellules humaines :	101
V.2.	Biomatériaux :	101
V.2.1.	L'échafaudage Poly-Caprolactone Uréthane PCLU :	101
V.2.2.	L'os xénogénique	103
VI.	Méthodes :.....	104
VI.1.	Production de fragment FNIII9/10 :	104
VI.1.1.	Expression du fragment FNIII9/10.....	105
VI.1.2.	Optimisation de l'expression du fragment FNIII9/10 sous forme soluble chez <i>E. coli</i>	105
VI.1.3.	Production de protéines en bioréacteur	107
VI.1.4.	Extraction des protéines par lyse enzymatique.....	108
VI.1.5.	Purification et quantification des protéines	108
VI.1.6.	Analyses de la protéine produite	110
VI.2.	Etude de l'activité biologique du fragment FNIII9/10	111
VI.2.1.	Binding de rFNIII9 / 10 aux récepteurs $\alpha 5\beta 1$	112
VI.2.2.	Quantification du rFNIII9-10 adsorbé passivement à l'aide du test d'immobilisation enzymatique.....	113
VI.2.3.	Etude de l'adhésion cellulaire	114

VI.3.	Bio-fonctionnalisation du PCLU avec le fragment bio adhésive rFNIII9/10	115
VI.3.1.	Lavage et préparation de l'échafaudage PCLU	115
VI.3.2.	Etude de la saturation du PCLU par le fragment FNIII9/10.....	116
VI.3.3.	Etude du relargage du FNIII9/10.....	116
VI.3.4.	Etude de la réponse cellulaire	116
VI.4.	Développement des nouvelles chimères protéique issus des domaines de la FN	118
VI.4.1.	Design des constructions chimérique	118
VI.4.1.	Outils bio-informatiques pour la préparation des séquences.....	119
VI.4.2.	Stratégie de clonage des chimères protéique.....	120
VI.4.3.	Expressions des chimères protéiques dans le système bactérien <i>E. coli</i>	126
VI.4.4.	Validations de chimères protéiques produites	127

Chapitre III : Production des domaines 9 et 10 de la Fibronectine humaine : Optimisation de l'expression du fragment recombinant sous forme soluble chez E. coli134

I.	Résumé graphique :	130
II.	Préambule.....	130
III.	Introduction :	130
IV.	Optimisation des conditions de production	132
IV.1.	Effet de la température d'induction	132
IV.2.	Effet de la concentration d'inducteur sur la production de rFNIII9 / 10.....	134
IV.3.	Effet du milieu de culture.....	136
IV.4.	Effet d'un agent solubilisant	139
IV.5.	Effet des souches d' <i>E. coli</i>	140
V.	Production de rFNIII9 / 10 en bioréacteur	142
VI.	Purification et détection des protéines	147
VII.	Validation du la protéine de fusion par western blot modifiée.....	149
VIII.	Etude de l'activité biologique de FNIII9/10	149
VIII.1.	Interaction de FNIII9/10 avec les récepteurs intégrines $\alpha 5\beta 1$	150
VIII.2.	Adsorption passive de rFNIII9 / 10 sur la surface de des puits de plaque	151
VIII.3.	Etude de l'adhésion cellulaire sur les surfaces développées	152
IX.	Conclusion	158

Chapitre IV : Elaboration d'un échafaudage bio-adhésif.....165

X.	Résumé graphique	161
XI.	Préambule	161

XII. Introduction.....	161
XIII. Construction de l'échafaudage adhésif PCLU-FNIII9/10	163
XIII.1. Etude de l'adsorption du FNIII9/10 sur le PCLU	163
XIII.2. Etude de la stabilité de l'association PCLU-FNIII9/10	168
XIV. Réponse cellulaire à l'échafaudage bio-activé.....	171
XIV.1. Etude de l'adhésion cellulaire	171
XIV.1. Etude de la prolifération cellulaire	176
XV. Conclusion :	183

Chapitre V : Développement des nouvelles chimères protéiques issus des domaines fonctionnels de la fibronectine humaine.....189

XVI. Résumé graphique	186
XVII. Préambule	186
XVIII. Introduction.....	186
XIX. Construction des chimères protéiques.....	188
XIX.1. Séquences des chimères	189
XIX.2. Alignement multiple des séquences	196
XIX.2.1. Alignement des séquences nucléotidique :	196
XIX.2.2. Alignement des séquences peptidiques :.....	197
XX. Clonage des chimères protéiques.....	199
XX.1.1. Amplification des par PCR.....	200
XX.1.2. Validation du clonage	201
XXI. Production des chimères protéiques	204
XXI.1. Niveaux d'expression des protéines chimérique :.....	204
XXI.2. Solubilisation des protéines de fusion par le Sarkosyl.....	207
XXI.3. Expression et purification des chimères protéiques	209
XXII. Validation des chimères produites	211
XXII.1. Etude de l'adhésion cellulaire	212
XXII.2. Adsorption sur l'os xénogénique.....	213
XXIII. Conclusion :	216
<i>Conclusion générale</i>	<i>218</i>
<i>Références bibliographiques</i>	<i>222</i>
<i>Annexes.....</i>	<i>257</i>

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
ALA : Acide δ -aminolevulinique
CBD: Chitin-binding domain
CIRC: Centre international de recherché sur le cancer
CHO: Cellules ovariennes de Hamster
CH : Chimère
CMAT: colored multi affinity tag
CP: Calcium Phosphate
CI : Corps d'inclusion
Cyto b5 : Cytochrome b5
DAPase : La forme recombinante de l'aminopeptidase dipeptidyl peptidase I
DEAE Diethylaminoethyl
DO : Densité optique
EDA et EDB: Extra domaine A / Extra domaine B
EGF: Endothelial growth factor
FN: Fibronectine
GAG: glycosaminoglycane
GFP: Green Fluorescent Protein
GST: Gluthatione-S-Transférerase
HA: hydroxyapatite
His: Histidine
hGF : Fibroblaste gingivaux humaines
IMAC: Immobilized metal ions affinity chromatography
IPTG : Isopropyl-B-D-Thiogalactopyranoside
LB : Luria Broth
MBP : Maltose-binding protein
MEC : Matrice extracellulaire
CSM: Cellules mésenchymateuses souches
PAGE : SDS Polyacrylamid Gel Electrophoresis
PBS : Polyphosphate Buffered Saline
PCL: Poly caprolactone
PCLU: Poly caprolactone urethane
PCR : Polymerase chain reaction
PLLA: poly (L-lactic acid)
PLGA: poly (L-glycolic acid)
PGA: Polyglycolic acid
PLA: polylactide acid
PDS: polydioxanone
SBP : Streptavidin-binding peptide
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
TEV : Tabacco Eatch Virus

Liste des figures

Figure 1 : Utilisation des biomatériaux dans le domaine médical ;.....	23
Figure 2 : Les classes des biomatériaux et leurs applications.....	25
Figure 3 : Processus de réparation du tissu osseux.....	27
Figure 4: Evolution et avancés des biomatériaux.....	29
Figure 5 : Principe et voie de l'ingénierie tissulaire.....	31
Figure 6 : Présentation schématique des stratégies et enjeux de l'ingénierie de tissu osseux	32
Figure 7 : Interaction biomatériau tissu.....	36
Figure 8 : Synthèse des propriétés de surface des biomatériaux qui peuvent moduler les comportements cellulaires.....	41
Figure 9 : Stratégies de fonctionnalisation des biomatériaux.....	42
Figure 10 : Fonctionnalisation de la surface plasma des échafaudages PEEK pour une meilleure formation osseuse dans les implants osseux. Images de microscopie à force atomique	43
Figure 11 : Représentation schématique de différentes techniques de modification chimique de surface pour améliorer les interactions cellule-matériau.....	44
Figure 12 : Les interactions des éléments de la MEC avec les cellules.....	48
Figure 13 : Stratégies d'exploitation de la MEC pour le développement des biomatériaux bifonctionnalisés.....	49
Figure 14: Présentation schématique de l'architecture modulaire multi-domaine de la fibronectine.....	52
Figure 15 : Fonctions de la fibronectine cellulaire et plasmatique pendant la cicatrisation des plaies.	53
Figure 16 : La structure modulaire de la fibronectine et ses domaines de liaison spécifique à l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$	57
Figure 17 : Modèle de l'interaction FN et collagène).....	58
Figure 18 : Illustration schématique de l'interaction FN-intégrine).....	60
Figure 19 : La migration des CSM est régulée par la fibronectine par l'activation médiée par $\alpha 5 \beta 1$ -intégrine de PDGFR- β	62
Figure 20: Les progrès de la compréhension de l'ADN ont été fondamentaux pour le développement de la technologie des protéines recombinantes.....	69
Figure 21 : Principes et étapes de la production d'une protéine recombinante.....	70
Figure 22 : Image de microscopie électronique de cellules d'E. coli avec des corps d'inclusion	77
Figure 23 : Rôle de la stratégie des protéines de fusion dans les étapes de production et validation des protéine recombinantes.....	79
Figure 24 : Représentation schématique de la voie de l'expression des protéines à la purification à l'aide de tag de solubilité.....	80
Figure 25 : Comparaison de la stratégie d'auto-induction avec l'induction à l'IPTG.....	89
Figure 26 : Carte du vecteur pCR2.1.....	95
Figure 27 : Carte du vecteur d'expression pEB1.....	96

<i>Figure 28: Carte du vecteur pET SUMO Champion™</i>	97
<i>Figure 29 : Mécanisme de contrôle du système pET dans la souche KRX</i>	99
<i>Figure 30 : Mécanisme de contrôle du système pET dans la souche BL21 pLysS</i>	100
<i>Figure 31 Refolding dans le compartiment cytoplasmique chez la souche BL21 DsbC</i>	100
<i>Figure 32 : Carte de restriction du plasmide pRARE</i>	101
<i>Figure 33 : Photos des disques de poly-caprolactone uréthane (PCLU)</i>	102
<i>Figure 34 : Photo de morceau de Laddec®</i>	103
<i>Figure 35: Schéma synthétique des étapes de production des protéines recombinantes issues des domaines de la FN</i>	104
<i>Figure 36 : Schéma synthétique des paramètres étudiés</i>	106
<i>Figure 37 : Présentation schématique du principe de binding test</i>	112
<i>Figure 38 : Principe de la technique d'immobilisation enzymatique</i>	113
<i>Figure 39 : Digestion in silico des différentes constructions</i>	125
<i>Figure 40: Effet de la température d'induction sur l'expression soluble de rFNIII9/10 :</i>	133
<i>Figure 41 : Effet de la concentration d'inducteur sur la production de rFNIII9/10</i>	135
<i>Figure 42: Effet de milieu auto-induit sur le rendement de production de rFNIII9/10</i>	137
<i>Figure 43: Analyse par SDS-PAGE sur gel de 12 % de l'expression de la protéine de fusion Multitags-rFNIII9/10 dans l'étude de l'effet de milieu auto induit ZYM</i>	138
<i>Figure 44 : Effet de l'ajout d'un agent solubilisant AE1EBI sur l'expression soluble de rFNIII9/10</i>	140
<i>Figure 45 : Suivie de l'expression grâce au partenaire de fusion CMAT</i>	142
<i>Figure 46 : Suivie de l'expression de rFNIII9/10 produite à l'échelle fermenteur en milieu LB ;</i>	144
<i>Figure 47 : Suivie de l'expression de rFNIII9/10 produite à l'échelle fermenteur en milieu auto-induit ZYM ;</i>	145
<i>Figure 48 : Analyse comparative de la production de rFNIII9/10 dans les milieux LB et auto-induit à grande échelle ;</i>	146
<i>Figure 49 ; Analyse de purification de rFNIII9 / 10</i>	148
<i>Figure 50 : Analyse par western blot simplifiée de la protéine de fusion CMAT-FNIII9/10</i>	149
<i>Figure 51 : Evaluation de l'interaction rFNIII9/10 avec les intégrines $\alpha 5\beta 1$</i>	150
<i>Figure 52 : Etude de l'adsorption de rFNIII9/10 sur les puits de plaques</i>	151
<i>Figure 53 : Etude de l'adhésion cellulaire sur les surfaces coatées par le fragment FNIII9/10 ;</i>	153
<i>Figure 54 : Adhésion cellulaire précoce pendant 3 h d'incubation;</i>	154
<i>Figure 55 : Isotherme d'adsorption de la FNIII9/10 sur les disques PCLU en tampon PBS p7,4</i>	164
<i>Figure 56 : Isotherme d'adsorption de FNIII9/10 à pH 7 ajusté par masse de PCLU</i>	165
<i>Figure 57 : Hypothèse du modél langmirth</i>	166
<i>Figure 58 : Modélisation des résultats de l'adsorption</i>	167
<i>Figure 59 : Cinétique de relargage de FNIII9/10 à pH 7,4 sous agitation à température ambiante</i>	169
<i>Figure 60 : Cinétique de liberation de FNIII9/10 sous agitation à température ambiante</i> ...	169
<i>Figure 61 : Cinétique de désorption de FNIII9/10 à 4°C</i>	170

<i>Figure 62: Adhésion cellulaire sur des échafaudages PCL, PCL-FNIII9/10 au bout de 3 heures.</i>	172
<i>Figure 63 : Observation microscopique au microscope 3D numérique de l'adhésion cellulaire au bout 1h.</i>	174
<i>Figure 64 : Observation microscopique au microscope 3D numérique de l'adhésion cellulaire au bout 3h.</i>	175
<i>Figure 65 : Observation microscopique de l'étalement cellulaire sur les PCLU fonctionnalisés avec la FNIII9/10 au bout de 3h d'adhésion.</i>	176
<i>Figure 66: Prolifération cellulaire sur les échafaudages PCLU-FNIII9/10 et PCLU pendant 21 jours</i>	177
<i>Figure 67 : Observation microscopique de la prolifération cellulaire sur les échafaudages PCLU et PCLU-FNIII9/10.</i>	179
<i>Figure 68 : Observation microscopique en coupe 3D de la prolifération cellulaire sur les échafaudages PCLU et PCLU-FNIII9/10.</i>	180
<i>Figure 69 : Observation microscopique de la prolifération cellulaire sur l'échafaudage PCLU fonctionnalisé par FNIII9/10 pendant 14 jours :</i>	181
<i>Figure 70: Schéma présentant la conception des différentes constructions des chimères protéiques.</i>	188
<i>Figure 71: Résultats de l'alignement avec une multitude de séquences de la base de données du NCBI par l'outil « data base sequence blast ».</i>	196
<i>Figure 72: : Résultats de l'alignement avec une multitude de protéines par l'outil Uniprot</i>	198
<i>Figure 73: Résultats de l'alignement de la CHI</i>	199
<i>Figure 74 : : Analyse du produit PCR sur gel d'agarose à 1%</i>	200
<i>Figure 75 : Validation de la ligation de l'insert (les différents chimères) dans le vecteur d'expression pET CHAMPION par PCR Analyse du produit PCR sur gel d'agarose à 1%</i>	202
<i>Figure 76: Resultats de digestion enzymatique des vecteurs recombinant in silico via virtuel cut Serial Cloner</i>	203
<i>Figure 77 : Validation du clonage des chimères protéiques par digestion enzymatique</i>	204
<i>Figure 78 : Niveau d'expression et de solubilité des différentes protéines de fusion surexprimées dans les cellules E. coli</i>	206
<i>Figure 79 : Niveau d'expression et de solubilité des CH 1, CH2 et CH3</i>	207
<i>Figure 80: Etude de l'effet de sarkosyl sur la solubilisation des CH2</i>	208
<i>Figure 81 : Expression des chimères protéiques</i>	210
<i>Figure 82 : Analyse de la purification des chimères protéiques produites</i>	211

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Biomatériaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire osseuse</i>	33
<i>Tableau 2 : Avantages et limites des substituts osseux disponibles</i>	38
<i>Tableau 3 : Avantages et limites des stratégies de fonctionnalisation physiques et chimiques des biomatériaux</i>	46
<i>Tableau 4 : Biomolécule pour la bio-fonctionnalisation des biomatériaux</i>	48
<i>Tableau 5: Les récepteurs d'adhésion de la famille des intégrines</i>	55
<i>Tableau 6 : La fibronectine et ses domaines utilisés dans la bio activation des biomatériaux</i>	64
<i>Tableau 7 : Domaines fonctionnels de la fibronectine produits sous forme recombinants</i> ...	67
<i>Tableau 8 : Plateforme des systèmes d'expression des protéines recombinantes</i>	71
<i>Tableau 9 : Plateformes d'expression disponibles pour la production de protéines recombinantes avec des avantages et des inconvénients potentiels</i>	74
<i>Tableau 10 : Partenaire de fusion ; tags de solubilité</i>	81
<i>Tableau 11: Génotypes des souches bactériennes utilisées</i>	98
<i>Tableau 12 : Caractéristiques de PCLU utilisé</i>	102
<i>Tableau 13: Paramètres de l'étude d'optimisation de la production de FNIII9/10</i>	106
<i>Tableau 14 : Mélange réactionnel PCR</i>	121
<i>Tableau 15 : Couples d'amorces pour la synthèse des inserts</i>	121
<i>Tableau 16 : Mélange réactionnel ligation</i>	123
<i>Tableau 17: Résumé des paramètres évalués dans l'étude d'optimisation de l'expression soluble de FNIII9/10</i>	132
<i>Tableau 18: DO 600 nm finale de croissance dans le milieu LB et auto-induit ZYM</i>	137
<i>Tableau 19 : Rendement de production des chimères protéiques</i>	209

Introduction

Le remplacement et la régénération des tissus non fonctionnels sont devenus un défi majeur en Europe et aux États-Unis, où l'augmentation de l'espérance de vie au cours du dernier siècle est associée à une prévalence toujours croissante des maladies liées à l'âge. En prenant l'os comme exemple, avec le vieillissement de la société, les maladies liées à l'os ont fortement augmenté dans le monde (Fernandez de Grado et al., 2018). La réparation des défauts osseux reste l'un des sujets les plus difficiles à traiter en clinique (J et al., 2013). Le fait que l'os soit le deuxième tissu le plus transplanté après le sang, avec plus de 2,2 millions de greffes osseuses réalisées annuellement dans le monde, souligne l'importance de développer de nouveaux substituts de greffe qui surmontent les limites bien documentées de la greffe osseuse et d'explorer l'utilisation des biomatériaux dans ce domaine (Fernandez de Grado et al., 2018). Les implants orthopédiques illustrent également clairement l'étendue de ce problème où on observe des nombres très élevés d'implants de genou ou de la hanche pratiqués chaque année néanmoins le taux d'échec de l'implant dans les 10 à 20 premières années atteint 10% (Kurtz et al., 2005; Raphael et al., 2016). Théoriquement, ces problèmes ne devraient pas être aussi larges et limitantes en raison de la capacité permanente d'auto-cicatrisations de l'os suite à une blessure. Cependant, plusieurs circonstances, principalement les défauts osseux au-dessus d'une taille critique et la croissance osseuse altérée chez les patients âgés ou avec des profils cliniquement compromis (infections, ostéoporose, diabète, cancer..), impliquent qu'une régénération complète est impossible (J et al., 2013). Pour relever ces défis, des efforts intensifs dans la recherche visent à mettre en place des stratégies améliorées et innovatrices pour la réparation de tissus osseux (Qasim et al., 2020; Stevens, 2008).

L'ingénierie tissulaire osseuse ainsi que des techniques de fonctionnalisation des substituts osseux se sont avérées comme approche alternative très intéressante (Daltro, 2018). En effet, l'application de biomatériaux osseux régénératifs est une approche prometteuse pour réparer les défauts osseux, améliorant ainsi l'état de santé osseux sévère existant (Kurtz et al., 2005). Par conséquent, il est d'une grande importance clinique et sociale de développer des biomatériaux à haute capacité ostéogénique. Ce besoin a fait évoluer l'application des biomatériaux des substrats biocompatibles mais bio-inertes, utilisés simplement pour combler «passivement» le défaut osseux, à des substrats bioactives, conçues pour interagir «activement» avec les cellules et les tissus et contrôler les réponses biologiques définies (Rezaie et al., 2015a, 2015b) pouvant être ainsi utilisées aussi bien en clinique qu'en ingénierie tissulaire. L'adhésion cellulaire est l'un des premiers événements de l'interaction entre le biomatériau et le tissu hôte (Castner & Ratner, 2002). Faciliter une fixation cellulaire favorable sur les surfaces des

biomatériaux est un début important pour l'ensemble du processus de régénération osseuse. Plusieurs stratégies de fonctionnalisation de la surface des biomatériaux ont été décrites dans la littérature afin d'augmenter le potentiel bio adhésive et il a été démontré que l'amélioration des propriétés physicochimiques des surfaces de substituts osseux tel que la rugosité et la porosité influencent sur l'adhésion cellulaire cependant ces stratégies sont limités par une faible connexion bio-fonctionnelle permettant l'initiation de la cascade d'ostéo-intégration et régulant l'interaction entre la cellule et le biomatériau (Mas Moruno, 2018). A cet effet, des stratégies de développement nouveaux substrats bioactifs capables d'améliorer et de guider les fonctions cellulaires sont nécessaires et cruciaux (Rezaie et al., 2015b). Dans ce contexte, la bio-fonctionnalisation par des molécules bioactives se distingue comme une stratégie polyvalente et prometteuse pour concevoir des interactions cellule-matériau spécifiques et reproduire efficacement le microenvironnement de signalisation requis pour les processus de bio-intégration, de réparation et de régénération des tissus (de Mel et al., 2008; Matassi et al., 2011).

La matrice extracellulaire (ECM) est un réseau structurel et fonctionnel clé et essentiel pour le développement, la maintenance et l'organisation des tissus (Ahmed & Ffrench-Constant, 2016a; Huang & Chang, 2019; Stevens & George, 2005). La MEC est composée de plusieurs protéines et macromolécules bioactives telles que le collagène, la laminine et la fibronectine, fournissant une interaction qui organisent et régulent les activités cellulaires (Taha & Naba, 2019; Wilems et al., 2019). Récemment, des stratégies bio inspirées utilisant des protéines de la ECM pour la bio-fonctionnalisation des biomatériaux sont apparues comme une approche prometteuse (de Mel et al., 2008; Y. Su et al., 2018). En particulier, la fibronectine humaine, une protéine majeure de la MEC, s'est démarquée comme une candidate attirante et remarquable pour cette application pour plusieurs raisons ;

La fibronectine (Fn) est une glycoprotéine de la MEC impliquée dans de nombreux processus cellulaires essentiels, y compris la cicatrisation et la morphogenèse embryonnaire, ainsi que la régulation des comportements cellulaires tels que l'adhésion et la migration (Pankov & Yamada, 2002a; Parisi et al., 2020a). Cette protéine interagit à la fois avec les cellules et les composants de la MEC servant comme médiateur de leurs interactions (Zollinger & Smith, 2017). En se liant aux intégrines, des récepteurs transmembranaires cellulaires, la FN agit comme un acteur clé de la communication entre l'environnement intra et extracellulaire, contrôlant ainsi le comportement cellulaire (Bachman et al., 2015a). La FN présente un intérêt particulier en raison de son interaction spécifique non seulement avec les intégrines transmembranaires mais également avec une variété d'éléments de la MEC à travers des

domaines de liaison spécifiques (Mezzenga & Mitsi, 2018).. Le domaine de liaison aux cellules a été identifié et implique le motif RGD (arginine/glycine/acide aspartique) localisé dans le 10ème domaine FN de type III (FNIII10) dans l'activation de plusieurs d'intégrines (Cao et al., 2017; Krammer et al., 2002). En outre, l'interaction spécifique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ nécessite un site synergique PHSRN (phénylalanine-histidine-serine-arginine-asparagine) contenu dans le 9e domaine FN de type III (FNIII9) qui a démontré une augmentation de l'adhésion (Bentmann et al., 2010). Par conséquent, les 9e et 10e domaines FN de type III (FNIII9 / 10) fournissent des caractéristiques intéressantes pour l'ingénierie de ligands bio-adhésifs. De plus, la FN présente une matrice bio-fonctionnelle dont l'exploitation de ces domaines fonctionnels offre une voie de développement des ligands bio-fonctionnels palliant les besoins actuels d'approches efficace de bio activation des biomatériaux pour adapter les réponses de régénération tissulaire.

Un inconvénient majeur, largement reporté, de l'utilisation de la FN native est la perte de conformation démontrée lors de l'adsorption induisant une réponse limitée des récepteurs cellulaires. D'autre part, le coût ainsi que la biodisponibilité des protéines de la MEC natives réduit encore leurs utilisations. Par conséquent, ces limites ont conduit à la nécessité d'adopter des stratégies plus efficaces et ciblées pour la production de ses domaines fonctionnels. La technologie de l'ADN recombinant ou la production des protéines recombinantes permet de concevoir de petits fragments de protéines recombinantes dérivant des domaines fonctionnels des protéine natives (Cheng et al., 2018a). Cette approche d'ingénierie des protéines permet également de concevoir de nouveaux recombinants combinés pour des activités ciblées et améliorées (Cutler & García, 2003a; Hannachi Imen et al., 2009; Kang & Jang, 2009a; S. G. Kim et al., 2015) garantissant des coûts réduits et des technologies très efficace d'exploitation.

Dans ce contexte, ces travaux de thèse visent à concevoir des ligands bio-fonctionnels recombinants à partir des domaines de la FN afin de bio-fonctionnaliser des biomatériaux. L'objectif est ainsi de développer un biomatériau bio-activé par un produit innovant constitué des domaines de la fibronectine humaine et des chimères protéiques en fonction de leur affinité pour des protéines cibles de la matrice extracellulaire et des membranes cellulaires, avec pour objectif afin d'augmenter bio-intégrations dans les organes cibles.

Nous avons développé dans un premier temps la production du domaine de liaison aux intégrines de la FN (FNIII9/10) et étudié son efficacité à bio-fonctionnalisés des échafaudages synthétiques *in vitro*. Ces études ont mené par la suite au design, clonage et la production de nouvelles chimères protéiques impliquant d'autres domaines de la fibronectine humaine afin

d'élaborer des peptides mimétiques de la FN dans l'activation des voies de signalisation intracellulaires qui peuvent réguler la propagation, la prolifération, la différenciation et la migration des cellules et augmenter ainsi l'ostéo-intégration et régulation l'interaction entre la cellule et les biomatériaux.

La première partie de ce travail a porté sur le développement d'un procédé optimisé de production des domaines 9 et 10 de la fibronectine type III (FNIII9/10) recombinantes, impliqués dans l'adhésion cellulaire médié par les intégrines. Plusieurs paramètres ont été étudiés afin d'atteindre des niveaux élevés d'expression de FNIII9-10 sous forme soluble : souches bactériennes, paramètres d'induction (température d'induction et concentration d'inducteur), agent solubilisant et milieux de culture. Ces travaux ont permis un scale-up des cultures bactériennes en fermenteur. La technologie des protéines recombinantes, et en particulier la technologie de fusion, a été exploitée afin de développer une approche simple et efficace pour sa caractérisation et l'évaluation de son activité biologique. Les fonctions biologiques de fragment produit ont été validées par des tests d'adhésion cellulaire sur les cellules modèles. Par la suite, la bio-fonctionnalisation d'un échafaudage synthétique par le fragment conçu a été investigué afin de mettre en évidence son potentiel à médier une reconnaissance améliorée du biomatériau par les cellules. Enfin, des nouvelles chimères protéiques ont été élaboré principalement à partir des domaines fonctionnels de la FN.

Ces travaux de recherche ont permis de décrire un procédé optimisé et efficace de la production du domaine bio-adhésive de la FN humaine par voie recombinante. De plus nos résultats montrent que ce fragment recombinant s'est avéré efficace pour favoriser l'adhésion cellulaire sur des échafaudages osseux. D'autre part, des chimères protéiques innovantes engageant des domaines d'interaction avec les cellules ainsi que la MEC ont été développés et les résultats préliminaires *in vitro* montrent des perspectives assez encourageantes de ces ligands bio-fonctionnels dans les applications de conception de substrats bioactifs pour la régénération et l'ingénierie tissulaire.

Ce rapport est organisé comme suit ;

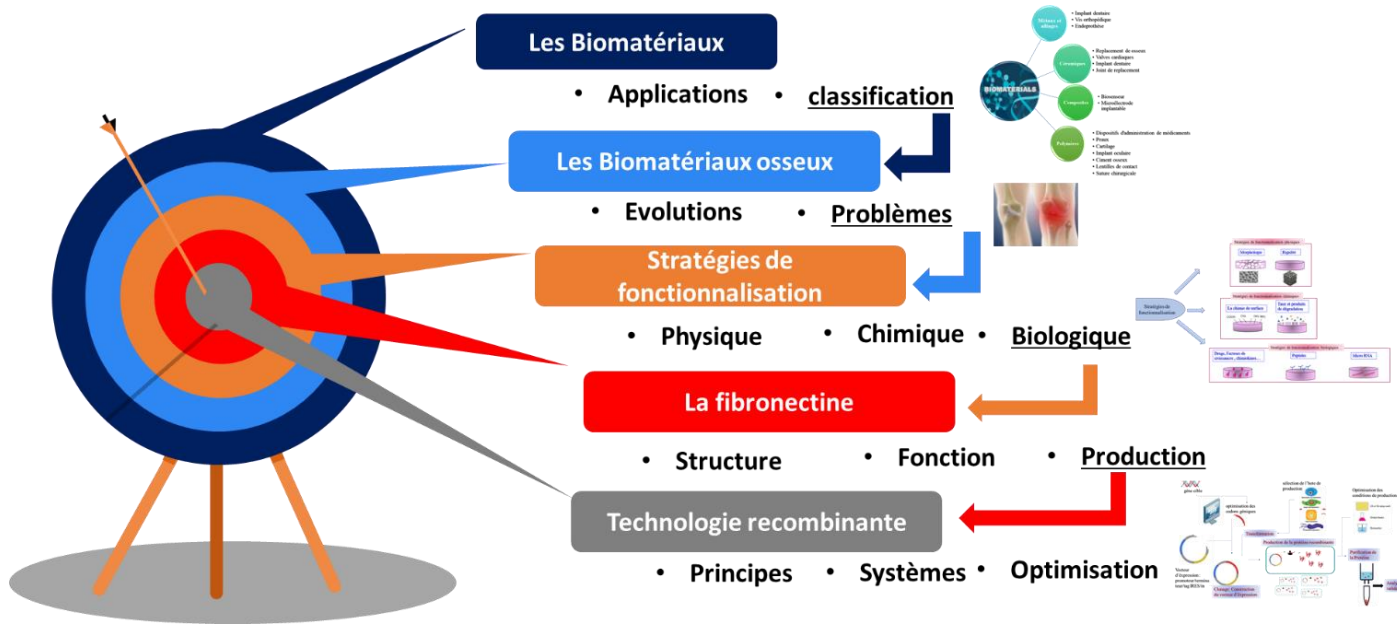
- Chapitre I : Avant de présenter les résultats de mes travaux, le premier chapitre correspondant à un état de l'art qui apporte un aperçu général des différents aspects impliqués tout au long de ce travail.
- Chapitre II : Le deuxième chapitre porte quant à lui sur la description des outils, matériels ainsi que les principales méthodes utilisées lors de ce travail.

- Chapitre III : Le troisième chapitre se concentrera sur les résultats de l'optimisation de la production du FNIII9/10 et l'évaluation de son activité biologique recherchée.
- Chapitre IV : Le quatrième chapitre étudie les effets biologiques in vitro de la modification de surface d'un échafaudage synthétique par le fragments bio-adhésive.
- Chapitre V : Le cinquième chapitre, décrit des nouvelles chimères protéiques et leur élaboration. Il s'intéressera notamment aux d'autres domaines bio-fonctionnels de la FN en hybride avec le domaine FNIII9/10 à l'issue des chapitres précédents.

Chapitre I

Etat de l'art

Résumé Graphique Etude Bibliographique :



Ce chapitre est une synthèse de l'état de l'art relatif au domaines traités au cours de cette thèse. Une première partie consistera en une description du contexte de ce travail en introduisant les principales disciplines auxquelles le sujet de ce travail s'inscrit à savoir la science des biomatériaux, la bio-ingénierie ainsi que l'ingénierie tissulaire pour arriver à discuter la problématique étudiée au cours notre travail, la bio-fonctionnalisation. Une seconde partie s'intéressera à une protéine particulière, au cœur de ce travail, utilisée pour la bio-fonctionnalisation des biomatériaux qui est la Fibronectine humaine. Enfin, une troisième partie concernera la technologie utilisée lors de la réalisation de ces travaux de thèse la technologie de l'ADN recombinant.

I. Bio ingénierie, biomatériaux et fonctionnalisation :

Les biomatériaux sont des matériaux, synthétiques ou vivants, utilisables à des fins médicales pour remplacer une partie ou une fonction d'un organe ou d'un tissu. Ces biomatériaux sont des outils cliniques puissants et indispensables dans le traitement de tissus endommagés. Leur utilisation dans le traitement de certaines pathologies et l'amélioration de la qualité de vie des patients touche à tous les secteurs biomédicaux (figure 1.).

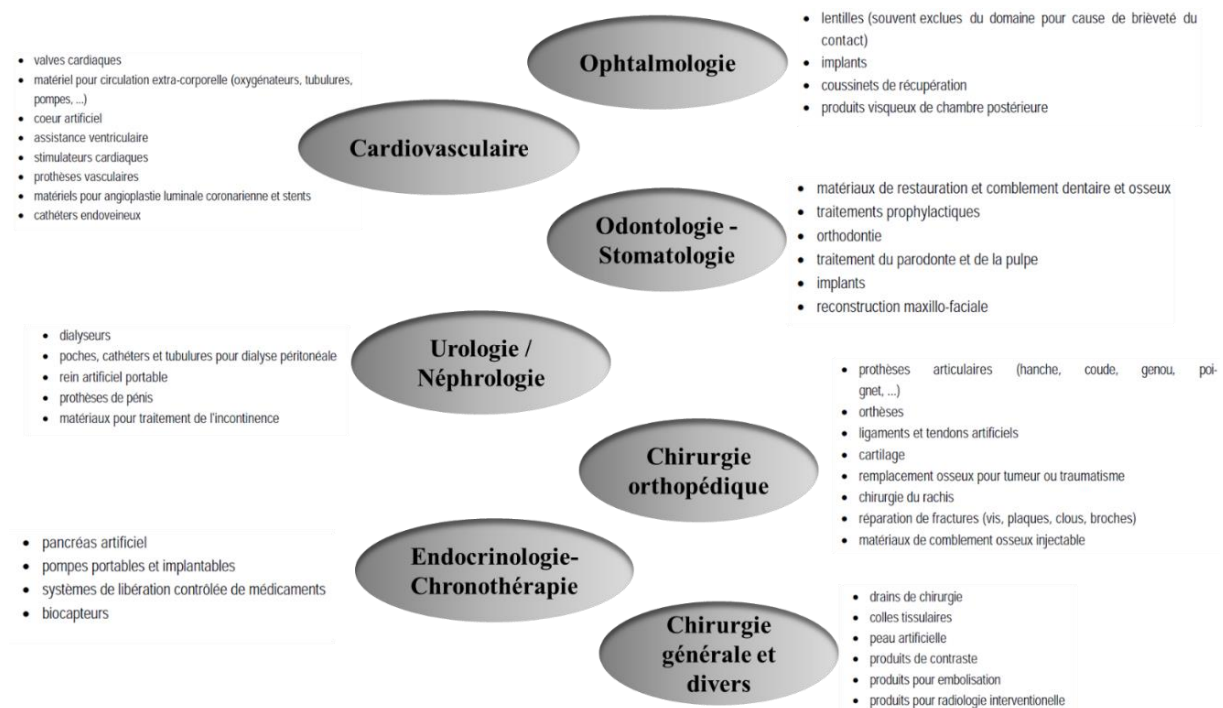


Figure 1 : Utilisation des biomatériaux dans le domaine médical ;
Figure synthétique élaborée à partir de la référence (SEDEL & JANOT, 2000)

Au fil des années, la science des biomatériaux, une science interdisciplinaire regroupant de nombreux domaines de la science, de la technologie, de l'ingénierie et de la médecine, a connu un développement continu et a fourni un ensemble d'avancées qui a joué un rôle de plus en plus important dans le succès des dispositifs biomédicaux et dans le développement de l'ingénierie tissulaire, qui cherche à libérer le potentiel de régénération inné aux tissus / organes humains en état de détérioration et à restaurer ou rétablir une fonction corporelle naturelle. Bien que les biomatériaux aient révolutionné des domaines de la bio-ingénierie et l'ingénierie tissulaire pour le développement de nouvelles stratégies de traitement, ils sont tout de même confrontés à plusieurs défis (F.-M. Chen & Liu, 2016; Griffith, 2002a).

Cette partie donne un aperçu du domaine des biomatériaux, leurs applications ainsi que les stratégies d'amélioration. Elle commence par une définition de biomatériau suivie de leur application dans la réparation de tissus osseux. Une introduction à l'ingénierie tissulaire est ensuite présentée. Finalement, les stratégies développées dans la recherche en ingénierie tissulaire pour l'amélioration de ces dispositifs sont discutées.

I.1. Généralités sur les biomatériaux et l'os :

I.1.1. Définition de biomatériau :

Les biomatériaux regroupent tous matériaux qui interfèrent avec des entités biologiques (Patel & Gohil, 2012). La définition du biomatériau par le National Institutes of Health (NIH) est : « Toute substance (autre qu'un médicament) ou combinaison de substances d'origine synthétique ou naturelle, qui peut être utilisée pendant n'importe quelle période de temps, comme un tout ou une partie d'un système qui traite, augmente ou remplace un tissu, un organe ou une fonction du corps. » (Patel & Gohil, 2012; Pierre M. & Galletti, M, 1983). Bien que la définition initiale du biomatériau se soit limitée aux dispositifs médicaux, les biomatériaux englobent de nos jours à la fois des matériaux synthétiques et naturels qui favorisent la santé humaine. Un biomatériau est spécifiquement choisi en fonction de sa compatibilité avec le tissu hôte et de son intégrité structurelle au cours de sa durée de vie prévue (Bártolo & Bidanda, 2008; Pierre M. & Galletti, M, 1983; Rezaie et al., 2015a). Les applications des biomatériaux vont des prothèses (par exemple, implants de hanche et valvules cardiaques artificielles) à la régénération tissulaire, aux dispositifs médicaux et à l'administration de médicaments (Rezaie et al., 2015a). Il existe plusieurs types de matériaux en fonction de ses propriétés et de l'intention de l'application comme le montre la figure 2 ci-dessous. Les biomatériaux peuvent être classés en quatre grandes catégories, à savoir :

- Métaux
- Céramiques
- Polymères
- Composites

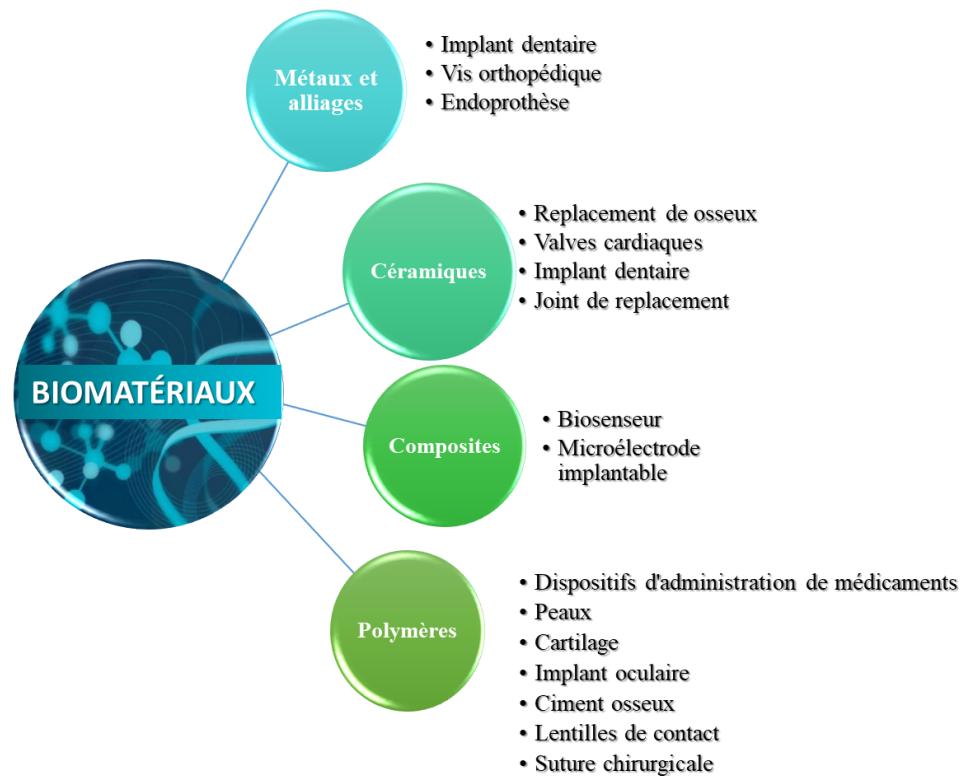


Figure 2 : Les classes des biomatériaux et leurs applications (Rezaie et al., 2015a)

Des progrès considérables ont été réalisés dans le domaine des biomatériaux et ont permis un développement constant de nouvelles générations et applications de ces derniers en adoptant une vision critique des produits actuellement disponibles et en définissant les besoins futurs (F.-M. Chen & Liu, 2016; Griffith, 2002a; Pérez et al., 2013). Bien que les applications de biomatériau touchent à plusieurs domaines, une famille très importante de biomatériaux a occupé depuis toujours une grande partie de ses utilisations : les biomatériaux osseux. En effet, depuis les débuts des dents en bois et des implants dentaires en or, jusqu'au échafaudage de réparation des fractures osseuses, les biomatériaux de l'os ont occupé une place imposante et large dans les applications des biomatériaux.

I.1.2. Biomatériaux pour la réparation osseuse

En tant que tissu / organe important du corps humain, l'os joue un rôle vital non seulement en protégeant les organes à l'intérieur du corps, mais aussi en fournissant un soutien mécanique, une hématopoïèse et un stockage des minéraux (Bartl & Bartl, 2017; Contributor, 2020). De plus, il se coordonne avec le tissu musculaire pour accomplir les mouvements pour répondre

aux changements environnementaux (Bartl & Bartl, 2017). L'os présente une large gamme de propriétés mécaniques, les variations observées étant affectées par l'âge physique, le site anatomique et la qualité osseuse. C'est une structure vivante qui change constamment, en grande partie en raison du stress appliqué et présente un potentiel d'auto-réparation (Ansari, 2019; J et al., 2013). Le tissu osseux, dans des conditions normales, a une capacité de réparation particulière qui n'implique pas la formation de tissu cicatriciel.

I.1.2.1. Réparation du tissu osseux

Après une fracture, l'os commence une guérison naturelle par le biais d'une cicatrice faite de tissu conjonctif et cartilagineux aboutissant à la consolidation de la fracture. En quelques semaines, le cartilage est remplacé par de l'os et une cal osseuse (cicatrice osseuse) mène à la réparation de la fracture (Ansari, 2019; Loi et al., 2016). La régénération des fractures osseuses est une procédure de guérison naturelle par le biais d'une cicatrice faite de tissu conjonctif et cartilagineux arrangés, qui implique plusieurs types cellulaires ; des cellules progénitrices ainsi que des cellules inflammatoires, endothéliales et hématopoïétiques. La procédure de réparation osseuse comporte trois phases qui s'imbrique : l'inflammation, la production osseuse et le remodelage osseux (Schindeler et al., 2008). L'inflammation commence instantanément une fois que l'os est cassé et dure plus de quelques jours. La fracture provoque des saignements, entraînant une inflammation et une coagulation du sang à l'endroit de la rupture (Sikavitsas et al., 2001). Ceci est responsable de la nouvelle formation osseuse. La production osseuse commence une fois que le sang coagulé formé par l'inflammation est remplacé par du tissu fibreux et du cartilage (reconnu comme un cal mou). Au fur et à mesure que la régénération se développe, la cal mou évolue en os dur (identifié comme un cal dur), ce qui est visible sur les radiographies quelques semaines après la fracture.

Le remodelage osseux, étape ultime de la cicatrisation osseuse, se poursuit plus de quelques mois (Schindeler et al., 2008). Lors de la régénération, l'os se transforme et se condense pour retrouver sa forme d'origine (Dimitriou et al., 2005). De plus, la circulation sanguine dans la région progresse. Une fois qu'une restauration osseuse appropriée a suivi, la mise en charge aboutit à la guérison osseuse. En bref, les étapes de la réparation des fractures osseuses sont présentées sur la figure 3.

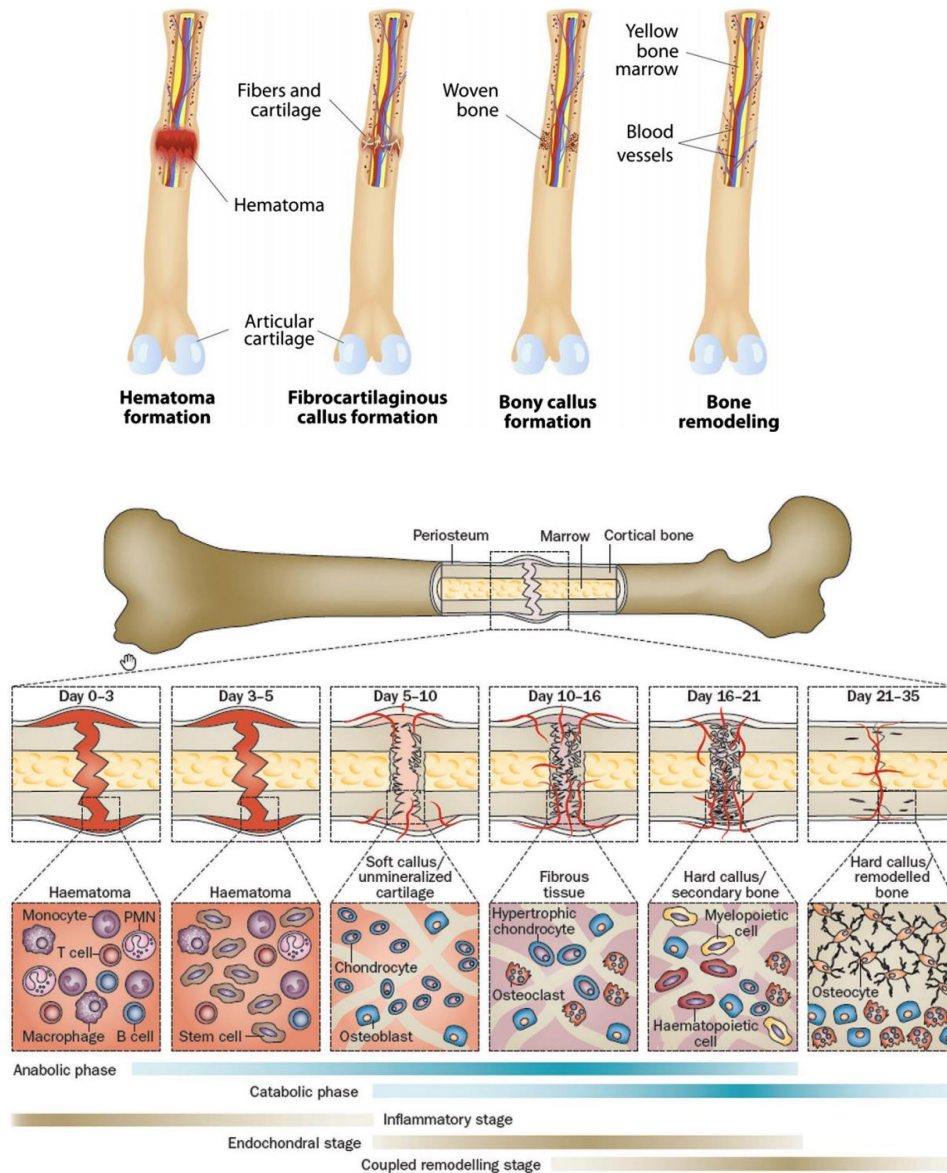


Figure 3 : Processus de réparation du tissu osseux (Ansari, 2019; Armiento et al., 2020; Einhorn & Gerstenfeld, 2015)

Réparation d'une fracture du fémur. Les phases métaboliques majeures (barres bleues) de la guérison des fractures se chevauchent avec les étapes biologiques (barres brunes). Les phases métaboliques primaires (anabolique et catabolique) de la cicatrisation des fractures sont présentées dans le contexte de trois stades biologiques majeurs (inflammatoire, formation osseuse endochondrale et remodelage couplé) qui englobent ces phases. Les types de cellules primaires qui se trouvent à chaque étape et la durée de leur prévalence à chaque étape sont indiqués.

I.1.2.2. Biomatériaux osseux

Bien que l'os ait une certaine capacité de régénération et d'auto-réparation (Ansari, 2019; Dimitriou et al., 2005), les grands défauts osseux segmentaires ne peuvent être réparés que par greffe osseuse (Im, 2020; Martin & Bettencourt, 2018)

Plusieurs maladies sont à l'origine des défauts osseux non consolidable naturellement tels que, un traumatisme grave, des fractures supérieures à une taille critique qui conduisent à une fracture sans union et à un échec de cicatrisation, une résection tumorale ou des maladies congénitales (J et al., 2013; Martin & Bettencourt, 2018; Mour et al., 2010a). Ces dernières années, une demande croissante de biomatériaux osseux, également appelés substituts de greffe osseuse font que la greffe osseuse est la deuxième greffe de tissu la plus fréquente après la transfusion sanguine (Fernandez de Grado et al., 2018). Actuellement, les stratégies thérapeutiques basées sur la greffe osseuse par autogreffe ou allogreffe présentent certains inconvénients : l'autogreffe comprend des implants prélevés sur le patient lui-même et sont limités le volume osseux prélevable qui peut être prélevé (souvent au niveau de la crête iliaque). Cette technique présente également des risques chirurgicaux tels que saignement, inflammation, infection et douleur chronique, ainsi que des dommages au site donneur et de la morbidité, une déformation, une hypersensibilité et des cicatrices (Fernandez de Grado et al., 2018). Les allogreffes (implants d'un donneur partir d'os de banque de tissu) présentent également certaines limites, telles que le manque de donneurs, les coûts élevés, la nécessité d'une stérilisation et le risque de transmission d'agents infectieux ou de rejet immunitaire (Fernandez de Grado et al., 2018; Im, 2020). Ces limitations et inconvénients associés aux approches d'autogreffe et d'allogreffe indiquent un besoin clinique de stratégies thérapeutiques alternatives visant la cicatrisation osseuse.

I.1.2.3. Evolution des biomatériaux de réparation osseuse

Le rôle que jouent les biomatériaux dans la chirurgie orthopédique et dentaire a connu une évolution permanente dans le temps (Im, 2020; Matassi et al., 2011). Alors que les biomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux permanents étaient tenus de remplacer passivement la fonction de l'os endommagé à long terme, les biomatériaux actuels devraient déclencher et exploiter le potentiel d'auto-régénération de l'os in situ, puis se résorber (Ahadian et al., 2017a; J et al., 2013). Trois générations de biomatériau sont apparues à travers l'amélioration de la compatibilité et de la possibilité d'interaction avec des environnements biologiques complexes de l'implantation (Festas et al., 2020; Navarro et al., 2008; Saini et al., 2015) (Figure 4). Cependant, les matériaux de nouvelle génération ne remplacent pas nécessairement l'utilisation de ceux des générations précédentes. Un aperçu global sur les différents biomatériaux historiquement utilisés ainsi qu'une brève description des différents biomatériaux disponibles et utilisés actuellement de ces trois générations de biomatériaux est présentée ci-dessous.

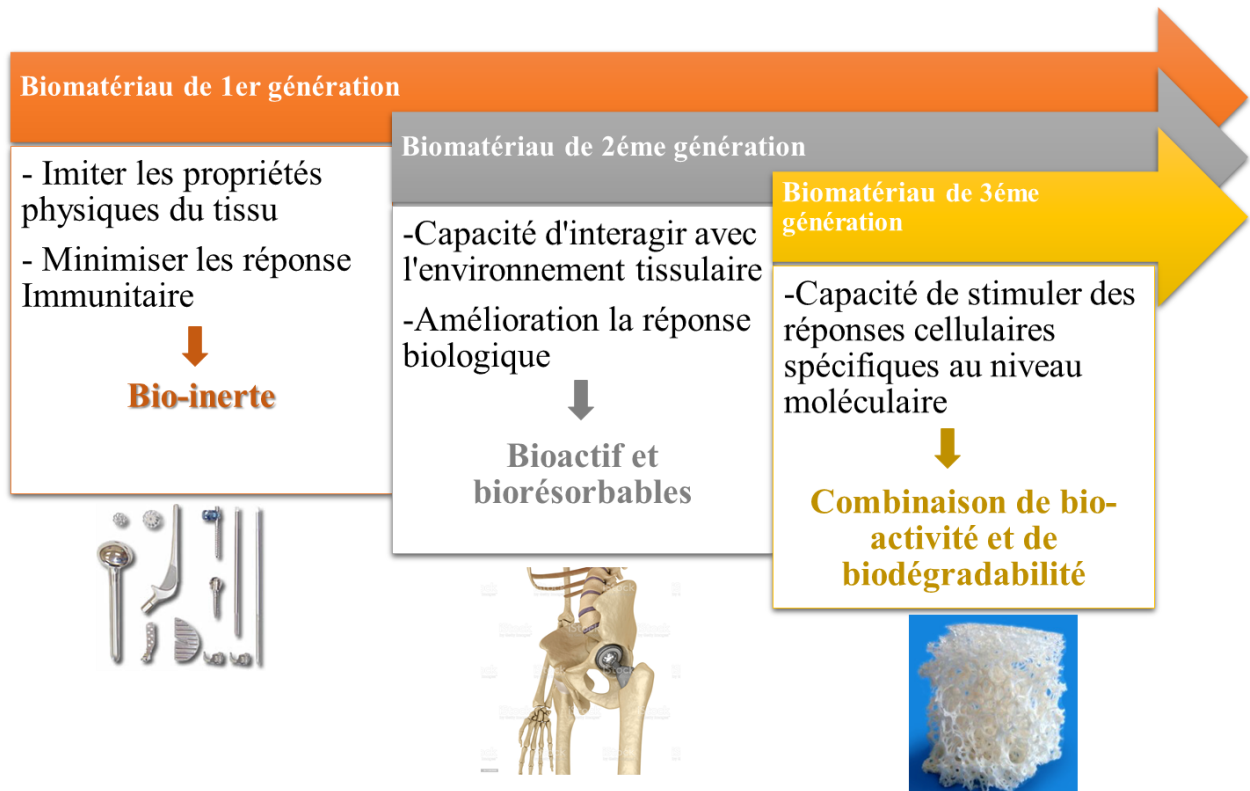


Figure 4: Evolution et avancés des biomatériaux

➤ **Les biomatériaux de première génération :**

Le choix des matériaux pour une application spécifique est régi par l'adaptation des propriétés des matériaux aux exigences de l'application. Pour les biomatériaux de première génération, l'exigence initiale était d'imiter les propriétés physiques du tissu remplacé avec des réponses toxiques minimales à l'hôte (Festas et al., 2020; Navarro et al., 2008). Par conséquent, pour minimiser la réponse immunitaire à des corps étrangers, la première génération de biomatériaux était inerte (Yu et al., 2015).

➤ **Les biomatériaux de deuxième génération :**

La deuxième génération de biomatériaux est définie par le développement de matériaux bioactifs et biorésorbable (Yu et al., 2015). Les matériaux bioactifs ont la capacité d'interagir avec l'environnement tissulaire pour améliorer la réponse biologique et la liaison tissu-surface du biomatériau. Les matériaux biorésorbable ont la capacité de se dégrader tandis que les nouveaux tissus se régènèrent et guérissent. On considère que l'apparition de la deuxième génération se situe entre 1980 et 2000 (Yu et al., 2015).

➤ **Les biomatériaux de troisième génération**

Les biomatériaux de troisième génération sont de nouveaux matériaux capables de stimuler des réponses cellulaires spécifiques au niveau moléculaire (Hench & Polak, 2002; Yu et al., 2015). Pour ces biomatériaux, les concepts de bioactivité et de biodégradabilité sont combinés, et les matériaux biorésorbables deviennent bioactifs et vice versa. Les propriétés de ces matériaux doivent fusionner avec leur capacité à stimuler une activité et un comportement cellulaires spécifiques (Hench & Polak, 2002).

I.2. L'ingénierie tissulaire

Le terme « ingénierie tissulaire » (IT) a été utilisé pour la première fois en 1987. Cette discipline scientifique récente, est dédiée à la génération de nouveaux tissus en utilisant les principes de l'ingénierie en combinaison avec une compréhension et une application des sciences biologiques. Elle a été définie par Langer et Vacanti au début des années 90 comme «un domaine interdisciplinaire qui applique les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie au développement de substituts biologiques qui restaurent, maintiennent ou améliorent la fonction tissulaire» (Langer & Vacanti, 1993). Il s'agit de l'utilisation d'une combinaison d'approches multidisciplinaires pour développer des substituts bioartificiels permettant d'améliorer ou remplacer les tissus biologiques (Abdulghani & Mitchell, 2019). Ces substituts biologiques peuvent à leur tour être appliqués en médecine régénérative, en pharmacie, en diagnostic et en recherche fondamentale pour traiter une multitude de maladies et d'affections dans le corps humain ou élucider les aspects fondamentaux des fonctions cellulaires *in vivo*. IT vise à induire des processus de régénération spécifiques aux tissus, surmontant ainsi les inconvénients bien connus de la transplantation d'organes.

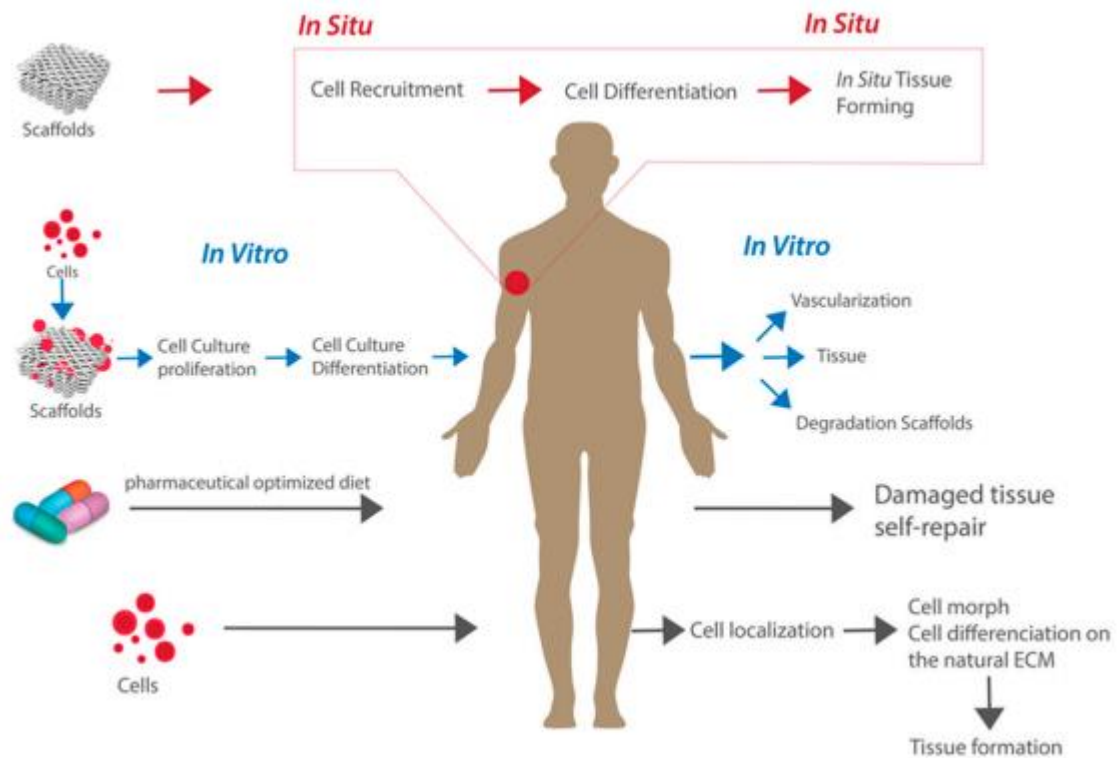


Figure 5 : Principe et voie de l'ingénierie tissulaire (Abdulghani & Mitchell, 2019)

Ces dernières années, avec le développement rapide de la technologie d'ingénierie tissulaire, l'ingénierie tissulaire osseuse est devenue une approche prometteuse pour la réparation des défauts osseux (Stevens, 2008). En effet, le domaine de la recherche en ingénierie tissulaire osseuse vise à concevoir des matériaux qui surpassent les autogreffes et allogreffes osseuses (Chouhan et al., 2019; Gaharwar et al., 2020). L'objectif général est de préparer des matériaux qui peuvent être introduits dans un défaut osseux puis remodelés par les propres cellules du patient receveur. Ainsi, elle vise à induire la réparation et la régénération de nouveaux tissus par la synergie des cellules, des signaux et des biomatériaux (figure 5) (Gaharwar et al., 2020). Les biomatériaux jouent un rôle crucial dans le développement des stratégies de l'ingénierie tissulaire. Leur rôle est de fournir un échafaudage, qui sert de structure de support pour la fixation cellulaire et le dépôt de matrice minéralisée et est destiné à remplir temporairement le rôle de la matrice extracellulaire (MEC) dans le tissu en formation (Yu et al., 2015). En fonction du site du défaut et de l'état de santé du patient, différentes propriétés structurales et fonctionnelles du matériau sont nécessaires pour garantir l'utilité de la stratégie choisie (Mour et al., 2010b). Une grande variété de types et de combinaisons de biomatériaux s'est avérée être des candidats prometteurs pour des applications d'ingénierie tissulaire osseuse (Matassi et al., 2011). Ayant comme objectif d'imiter la structure et la fonction de la MEC osseuse naturelle,

ils doivent fournir un environnement tridimensionnel (3D) pour favoriser l'adhésion, la prolifération et la différenciation et pour avoir des propriétés physiques adéquates pour la réparation osseuse (Badylak et al., 2009; J. Y. Park et al., 2018). Un échafaudage idéal doit être biodégradable, biocompatible, bioactif, ostéo-conducteur et ostéo-inducteur (Ghassemi et al., 2018; J. Y. Park et al., 2018). La conception des matériaux pour l'ingénierie du tissu osseux est également guidée par les propriétés du tissu osseux sain qui sont essentielles à sa fonction, comme une architecture poreuse adéquate à l'infiltration cellulaire et vasculaire (Ghassemi et al., 2018; J. Y. Park et al., 2018) (figure 6).

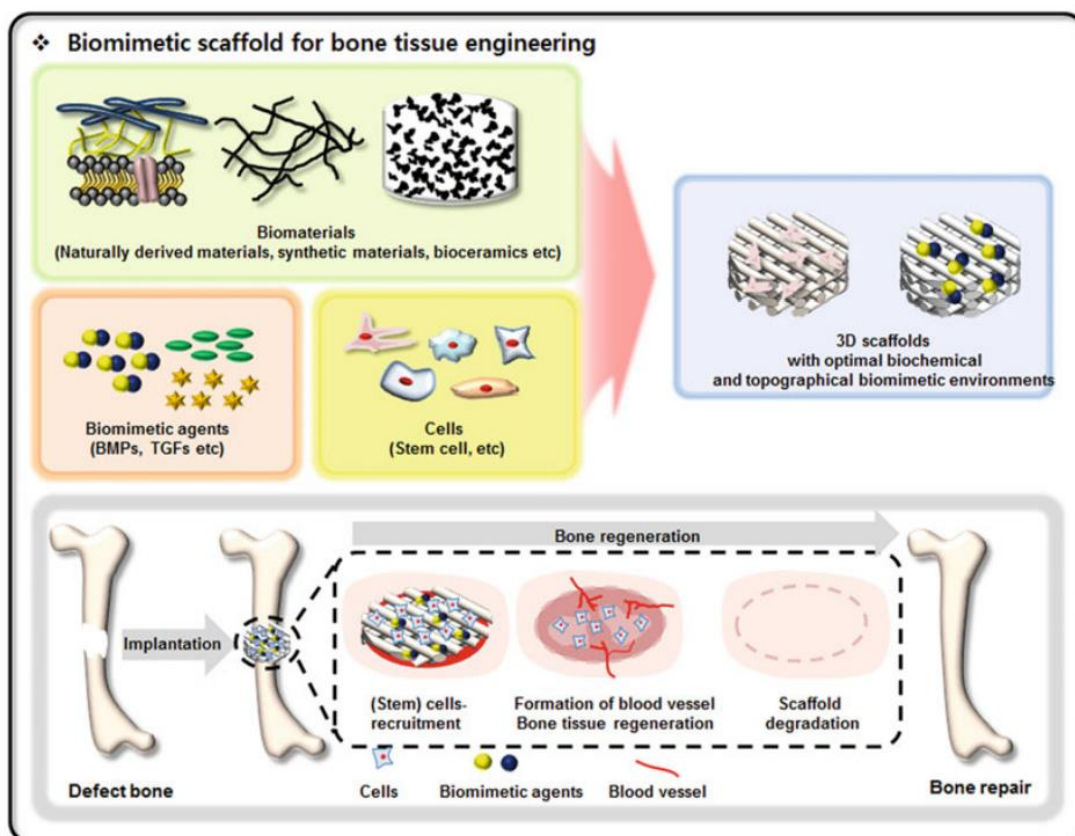


Figure 6 : Présentation schématique des stratégies et enjeux de l'ingénierie de tissus osseux (J. Y. Park et al., 2018)

Le processus est composé des étapes clés comme présenté schématiquement dans la figure 6 élaborée par Park et al. (J. Y. Park et al., 2018). La stratégie de IT commence par le choix et la préparation de d'échafaudages. Ces échafaudages sont modifiés chimiquement et physiquement au cours du processus de fabrication pour répondre à des besoins spécifiques, tels que la biodégradabilité, la porosité, la taille, la forme et la bioactivité (Gaharwar et al., 2020). Après avoir fabriqué l'échafaudage avec les propriétés souhaitées, il peut être cellularisé *in vitro* pour

créer le tissu souhaité, ou peut être placé dans le corps et être colonisé les cellules hôtes. Les signaux biologiques sont essentiels dans ces deux approches car ils définissent la bio intégration cellulaire et l'interaction du tissu cultivé (J. Y. Park et al., 2018). Il faut également tenir compte de la manière dont le biomatériau sera introduit dans le site du défaut osseux. Néanmoins, compte tenu de la composition organique et inorganique du tissu osseux naturel, les biomatériaux les plus couramment utilisés pour les applications d'ingénierie des tissus osseux sont les polymères, les biocéramiques et les matériaux composites (Yu et al., 2015). Les différents types de biomatériaux les plus utilisées en IT sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Biomatériaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire osseuse

Type	Exemples	References
Polymère naturels	Collagène /gélatine Soi Alginate	(Q. Feng et al., 2016; Loessner et al., 2016) (Y. Chen et al., 2020; Correia et al., 2012) (Luo et al., 2018)
Polymère synthétique	Poly(lactique glycolique) Plytétrafluoroéthylène (PTFE) Poly(ϵ caprolactone) (PCL) Polyuréthane	(Lin et al., 2018) (S. A. Park et al., 2011; J. Zhang et al., 2017) (S. A. Park et al., 2011; Siddiqui et al., 2021) (Fernando et al., 2016)
Biocéramiques	Hydroxyapatite Beta-tri calcium phosphate	(Geuli et al., 2016; S. A. Park et al., 2011) (Bohner et al., 2017)
Métaux biodégradable	Magnésium et ses alliages	(Bohner et al., 2017)

Bien que des progrès significatifs dans le domaine de la fabrication d'échafaudages sont réalisés, la plupart des échafaudages émergents pour l'ingénierie tissulaire sont encore confrontés à plusieurs défis (Y. Chen et al., 2020; J et al., 2013; Rezaie et al., 2015b) . La principale contrainte pour l'utilisation des biomatériaux en IT est leurs capacité à imiter la MEC pour prendre en charge la viabilité et la fonctionnalité cellulaire (Y. Chen et al., 2020). Plusieurs

caractéristiques sont à prendre en compte à savoir la chimie de surface, la rugosité de surface, la charge de surface, et la rigidité (Gaharwar et al., 2020). Ces propriétés, à leur tour, déterminent les interactions cellule-biomatériau et les interactions cellule-cellule (Mas Moruno, 2018). Ces interactions cellulaires sont essentielles à la viabilité et l'orientation du comportement des cellules tels que l'adhésion, la migration et à la différenciation des cellules, qui déterminent le succès de l'échafaudage (Badylak et al., 2009; Mas Moruno, 2018).

En conclusion, malgré divers progrès et avancés réalisés dans le domaine des biomatériaux, plusieurs difficultés limite encore la réussite de leur utilisation en milieu clinique et l'avancement de la conception des échafaudages en ingénierie tissulaire (Y. Chen et al., 2020; Festas et al., 2020). Dans ce contexte, la section suivante résume les principales interactions entre les biomatériaux et le tissu implanté et décrit brièvement les limites persistantes des divers biomatériaux osseux disponibles pour les applications cliniques et d'ingénierie tissulaire.

I.3. Limites et problèmes d'utilisation des substituts osseux

L'évolution que le domaine des biomatériaux osseux a connue, n'est que la résultante des défis auxquelles ils sont confrontés. Cette évolution reste l'enjeu et de défis majeurs des recherches gravitant autour de ces derniers jusqu'à présent. Ci-dessous une discussion de cette problématique ; Une présentation des principales interactions biomatériau-tissu est suivie d'un exposé des problèmes et limites majeur des biomatériaux actuellement disponibles en clinique et pour l'ingénierie tissulaire.

I.3.1. Généralités sur la réponse tissulaire aux biomatériaux

Les axes d'amélioration des biomatériaux et des dispositifs médicaux reposent en grande partie sur l'amélioration des interactions biomatériaux-tissus (Mour et al., 2010b; Navarro et al., 2008). Les effets de l'implant sur les tissus de l'hôte et de ce dernier sur l'implant sont importants dans la médiation des complications et de l'échec du dispositif. Les réactions les plus importantes de l'hôte (tissu) aux biomatériaux sont l'inflammation non spécifique et les réactions immunologiques spécifiques (Lemons J et al., 2013), les effets systémiques, les

interactions sang-matériaux, la formation de tumeurs et l'infection (Figure 7). Ces interactions résultent de modifications de processus physiologiques (normaux) (par exemple, immunité, inflammation, coagulation sanguine) comprenant des mécanismes de défense de l'hôte qui fonctionnent pour protéger l'organisme contre les menaces externes délétères (Ahadian et al., 2017b; Festas et al., 2020).

I.3.1.1. La réaction inflammatoire aux biomatériaux

La plupart des biomatériaux provoquent généralement une réaction à corps étranger, une forme particulière d'inflammation non spécifique (en anglais Foreign Body Reaction ou FBP) (Zhou & Groth, 2018). Les cellules les plus proéminentes dans cette réaction sont les macrophages, qui tentent de phagocyter le matériel et réussissent de manière variable, bien que l'engloutissement complet et la dégradation soient souvent difficiles. Les macrophages, activés dans le processus d'interaction avec un biomatériau, secrètent des cytokines qui stimulent l'inflammation ou la fibrose. Les macrophages sont également la première ligne de défense contre les agents pathogènes, et le mode de leur activation déterminera le succès ou l'échec de la réponse de l'hôte aux agents pathogènes (Zhou & Groth, 2018).

I.3.1.2. Interactions biomatériaux-tissus

Les interactions biomatériaux-tissus peuvent être divisées en deux types : interactions locales et interactions systémiques (figure 7).

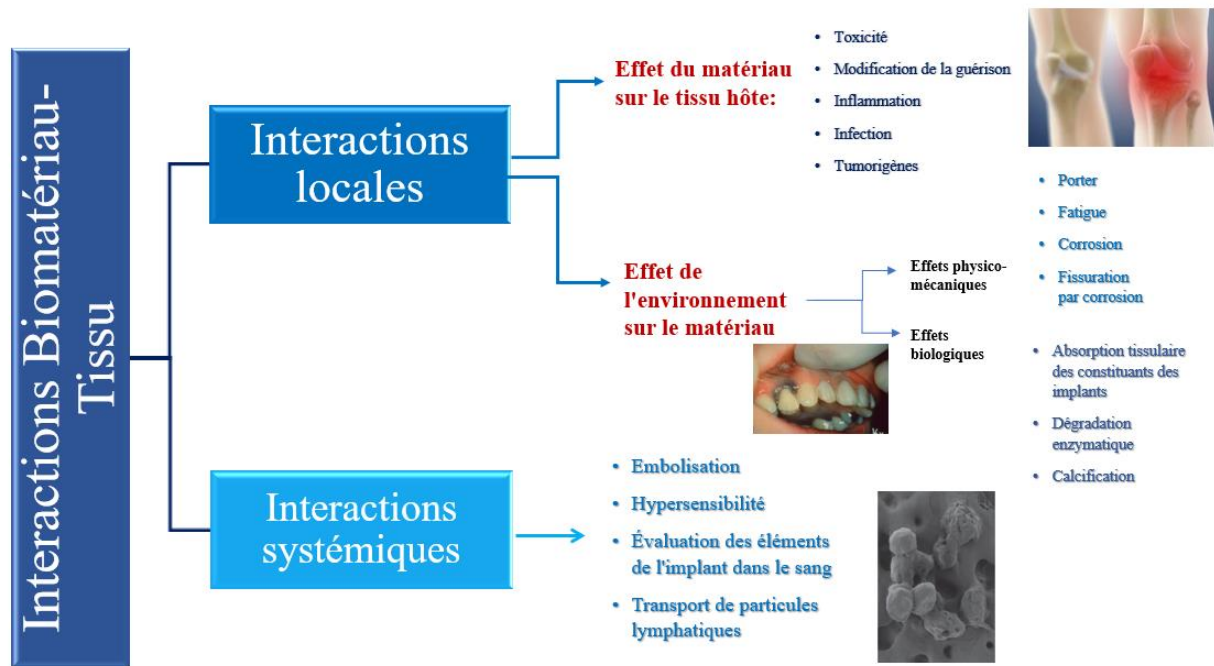


Figure 7 : Interaction biomatérial tissu

- **Effets systémiques :** Une réaction de toxicité et d'hypersensibilité des biomatériaux chez les patients avec des composants lors de remplacement articulaire orthopédique en acier inoxydable ou à base de cobalt, où des élévations de la teneur métallique se produisent dans les tissus, le sérum et l'urine. Le cobalt, le chrome et le nickel font partie de cette catégorie. Au moins 10% de la population normale sera sensible par test cutané à un ou plusieurs de ces métaux, à un certain seuil (Rezaie et al., 2015c).
- **Complications thromboemboliques :** L'exposition du sang à une surface artificielle peut induire une thrombose, une embolisation et une adhésion de plaquettes et de facteurs de coagulation plasmatique, ainsi que les effets systémiques des produits de coagulation et du complément activés et l'activation des plaquettes (Rezaie et al., 2015c; Zhou & Groth, 2018). Les complications thromboemboliques sont une cause majeure de mortalité pour les appareils cardiovasculaires. Le rôle régulateur des plaquettes sanguines dans la réponse thrombogène aux surfaces artificielles est important. Néanmoins, la principale approche clinique pour contrôler la thrombose dans les dispositifs est l'utilisation d'anticoagulants systémiques, en particulier Coumadin®, qui inhibe la formation de thrombine mais n'inhibe pas la thrombose à médiation plaquettaire (Rezaie et al., 2015c).

- **Tumorigénèse** : Les tumeurs induites par les implants ne sont pas bien comprises; la plupart des données expérimentales indiquent que les caractéristiques physiques plutôt que chimiques du corps étranger déterminent principalement la tumorigénicité (Rezaie et al., 2015c; Williams, 1987). La possibilité que les implants puissent être à l'origine de la formation de tumeurs est un problème toujours présent, avec des questions contemporaines liées aux articulations de la hanche métal sur métal et aux prothèses mammaires.
- **Infection** : L'infection survient chez 5 à 10% des patients porteurs de prothèses implantées et constitue une cause majeure de reprise d'intervention. Les infections associées aux dispositifs médicaux sont souvent résistantes aux antibiotiques et aux défenses de l'hôte, et persistent souvent jusqu'à ce que les dispositifs soient retirés. Les infections précoces (au cours des premiers mois) sont très probablement dues à une contamination peropératoire provenant de sources aéroportées ou à une technique chirurgicale non stérile, ou à des complications postopératoires. En revanche, les infections tardives surviennent probablement par voie hématogène et sont souvent initiées par une bactériémie induite par des procédures thérapeutiques dentaires ou génito-urinaires (Williams, 1987).

Bien que les interactions tissu-biomatériaux font l'objet de multiples études scientifiques, elles ne sont encore pas bien comprises et décrites dans la littérature mais une compréhension plus approfondie est cruciale pour la maîtrise et le développement des stratégies d'amélioration de ces interactions. La cause principale des échecs des implantations dans l'os est tout de même régnée par ces interactions et on connaît plusieurs limites d'utilisation des biomatériaux osseux qui sont décrites par la suite.

I.3.2. Matériaux d'implantation osseuse et défis actuels

Concernant les implants orthopédiques, tels que les prothèses de hanche ou de genou, une ostéo-intégration (c'est-à-dire une formation osseuse) est nécessaire pour stabiliser l'implant dans l'os (Navarro et al., 2008). Cependant, pour certaines conceptions d'implants, l'ostéo-intégration n'est pas obtenue, ce qui entraîne un relâchement de l'implant, nécessitant souvent une opération de reprise (J et al., 2013; Navarro et al., 2008). Ainsi, un implant osseux doit non seulement remplacer temporairement l'os manquant, mais également fournir un cadre dans lequel l'os hôte et le réseau vasculaire peuvent se régénérer et donc guérir (Y. Chen et al., 2020). Il doit agir

comme un échafaudage pour soutenir le nouvel os, les vaisseaux sanguins et les tissus mous à mesure qu'ils se développent pour relier les segments osseux fracturés, renforçant ainsi la zone greffée et la fixant (Rezaie et al., 2015b).

Pour concevoir de meilleurs matériaux d'implants orthopédiques, il faut se concentrer sur les processus cellulaires, tels que leur adhésion initiale, leur prolifération et leur différenciation (Mour et al., 2010a). Une régulation et des activités coordonnées entre ostéoblastes, cellules de formation osseuse, et ostéoclastes, cellules de résorption osseuse, sont nécessaires pour maintenir un os sain entourant l'implant (Altmann et al., 2011). Des activités dérégulées entre ces deux cellules peuvent conduire à un os nécrotique (ou mort) juxtaposé à l'implant, provoquera éventuellement une fracture de l'os entourant un implant (Motamedian et al., 2015; Rezaie et al., 2015c).

La génération de particules d'usure pouvant entraîner une défaillance de l'implant est un autre problème à maîtriser avec les matériaux d'implant existants. Les surfaces doivent présenter un volume d'usure réduit et générer des particules à activité biologique réduite. En particulier, les nanoparticules peuvent se détacher par la dégradation des matériaux implantés par oxydation et / ou hydrolyse, ce qui accélère l'exposition des matériaux (Zhou & Groth, 2018). Une fois implantée, la corrosion des métaux peut également provoquer la libération de nanoparticules et, par conséquent, contribuer à la toxicité pour les environnements biologiques (Daltro, 2018; Haugen et al., 2019).

Les problèmes des différents biomatériaux disponibles en chirurgie orthopédique et dentaires sont tout de même aussi important que la variété de choix disponible ; Le tableau 2 ci-dessous comprends les inconvénients courants ces derniers :

Tableau 2 : Avantages et limites des substituts osseux disponibles (F.-M. Chen & Liu, 2016; Haugen et al., 2019)

Familles	Avantages	Inconvénients
Autogreffe	-Ostéo-conductivité élevée -Le degré de sécurité le plus élevé -Pas de risque de réaction immunitaire	-Besoin d'une chirurgie supplémentaire -Fractures de la zone donneuse (des pertes sanguines et des douleurs -Disponibilité limitée
Allogreffe	-Plus de disponibilité que les autogreffe	-Risque de transmissions infectieuses et de rejet immunologique
Xéno greffe	-La structure ressemble à l'os -Bien documenté	-Transmission possible de maladies et potentiel indésirable de réactions immunitaires

	-Résultat clinique prévisible -Bio-absorbabilité lente ; préserve l'augmentation de volume de l'os	-Manque de cellules viables et des composants biologiques -Le taux de résorption est très variable -Disponibilité future réduite (Pas très conforme à la réglementation européenne)
Biomatériaux d'origine naturelles	-Similitude avec matrice extracellulaire native	-Propriétés mécaniques médiocres -Biodégradabilité moins contrôlée
Polymères synthétiques	-Propriétés physicochimiques améliorés -Dégradabilité accordable	-Faible fixation des cellules -moment de l'absorption (altération des propriétés mécanique) -Libération de produits de dégradation acides
Céramiques	-Haute biocompatibilité -Propriétés ostéo-inductrice -Similitude chimique avec l'os -Stimulation de la croissance des ostéoblastes	-Grande fragilité -Faible ductilité -Absorption non prévisible
Métaux	-Propriétés mécaniques élevées -Module élastique faible -Faibles densités	-Réaction indésirable due à la corrosion -Bio-intégration médiocre
Composites : Substitue Xéno- hybride	-Haute similitude avec l'os spongieux humain -Bio-activité plus élevée -Taux de dégradation sur mesure	-Le processus de nettoyage et stérilisation modifie partiellement la performance biologique -Données cliniques limitées

Ainsi et pour conclure, les greffes de tissus osseux (autogreffes, allogreffes, xéno-greffes et autres substituts) et l'implantation de dispositifs artificiels (prothèses inertes, alliages métalliques, céramiques) sont des thérapies cliniques actuellement existantes et disponibles pour la réparation de l'os (Haugen et al., 2019; Navarro et al., 2008; W. Wang & Yeung, 2017). Cependant, l'efficacité de ces méthodes pour restaurer la structure et la fonction des tissus peut être limitée, en raison du rejet immunitaire, de la bio-incompatibilité limitée, de l'inflammation chronique, des procédures chirurgicales complexes et manque de prévisibilité clinique (Fernandez de Grado et al., 2018; Zhou & Groth, 2018). Des efforts considérables sont fournis pour améliorer leur efficacité et performance et atteindre ainsi l'objectif commun des recherches actuelles qui est le développement de biomatériau 'idéal' combinant tous les avantages des plateformes disponibles tout en éliminant les problèmes mentionnés.

De ce fait, les biomatériaux réussis devraient restaurer la fonction physique de l'os et favoriser la régénération osseuse au site endommagé tout en évitant les risques de rejets et inflammatoire. En général, ils doivent être similaires à l'os natif et être régis par les propriétés fondamentales suivantes :

- Biocompatibilité, adaptée à la croissance cellulaire et pas de produits de dégradation toxiques
- Propriétés mécaniques adaptées supportant la charge physique
- Structure hautement poreuse pour la croissance osseuse et résultant en une solide fixation biologique d'implant osseux.

Plus détaillé, le biomatériau idéal doit avoir les propriétés : soutenir l'adhésion cellulaire et le dépôt de la MEC en stimulant les interactions cellule-biomatériau et cellule-cellule (Correia et al., 2012; Stevens & George, 2005); permettre la croissance cellulaire en ayant une porosité et une taille de pore adéquates (Haugen et al., 2019); (permettre la survie, la prolifération et la différenciation des cellules en facilitant le transport des gaz, nutriments, métabolites et autres biomolécules solubles (Haugen et al., 2019; Mour et al., 2010b) ; une biodégradabilité appropriée, compatible avec la cinétique de croissance néo-tissulaire (Lemons J et al., 2013; W. Wang & Yeung, 2017); soutenir la délivrance ou la migration de cellules et de biomolécules au site prévu (Amani et al., 2019); soutenir les contraintes mécaniques et conserver la résistance mécanique après l'implantation, en fournissant un environnement mécanique adéquat pour favoriser la formation de néo-tissus (Altmann et al., 2011; Pérez et al., 2013); provoquer un degré d'inflammation acceptable et positif *in vivo* (Rezaie et al., 2015b) et être économiquement viable (Haugen et al., 2019)

De ce fait et pour répondre à ces différentes exigences et relever ces défis imposants plusieurs stratégies d'amélioration de biomatériaux ont été développées. Etant donné que la surface de l'implant est le site de contact entre un biomatériau et le tissu cible (son organisme hôte), les chercheurs se sont fortement intéressés au développement de stratégies d'amélioration de la surface des substituts osseux (Amani et al., 2019) . Il est évident que le premier contact s'établie entre les cellules et la surface du biomatériau, ainsi une fonctionnalisation de cette dernière fournit un moyen de surmonter les problèmes discutés aussi bien pour les dispositifs de réparation clinique et les échafaudages pour l'ingénierie tissulaire (Amani et al., 2019). Dans ce contexte, l'objectif de la section suivante est d'apporter un état de l'art des différentes techniques de fonctionnalisation des surfaces des biomatériaux dans les recherches actuelles.

I.4. Stratégies de fonctionnalisation des biomatériaux

La fonctionnalité des biomatériaux implantés induit des effets significatifs sur sa bio-intégration et la réparation des défauts osseux en influencent fortement le comportement cellulaire (Mas Moruno, 2018) (Figure 8). Cependant, cette fonctionnalité est déterminée par ses propriétés physico-chimiques (telles que la rigidité et l'élasticité), morphologie et composition (Casanova et al., 2020a).

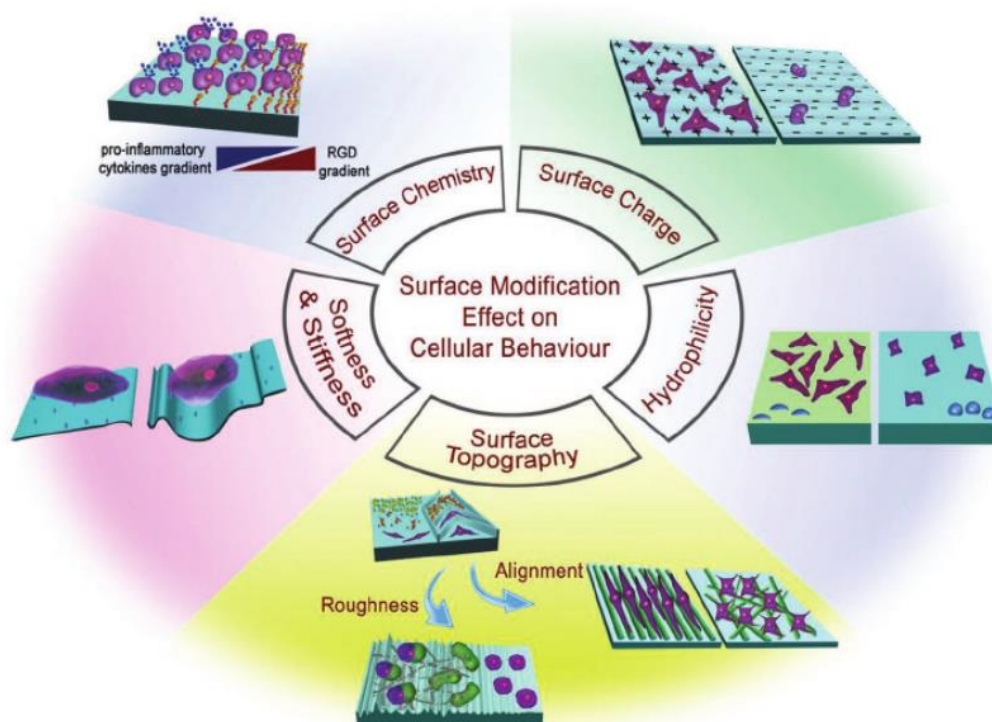


Figure 8 : Synthèse des propriétés de surface des biomatériaux qui peuvent moduler les comportements cellulaires (Amani et al., 2019)

Par conséquent, l'objectif principal de la fonctionnalisation des implant et échafaudages osseux est d'optimiser leurs propriétés physico-chimiques et biologiques. Plusieurs stratégies ont été décrites dans la littérature. Dans cette section, comme le montre la figure 9, la fonctionnalisation est catégorisée selon la nature des stratégies développées à savoir stratégies de fonctionnalisation physique, fonctionnalisation chimique, et la fonctionnalisation biologique.

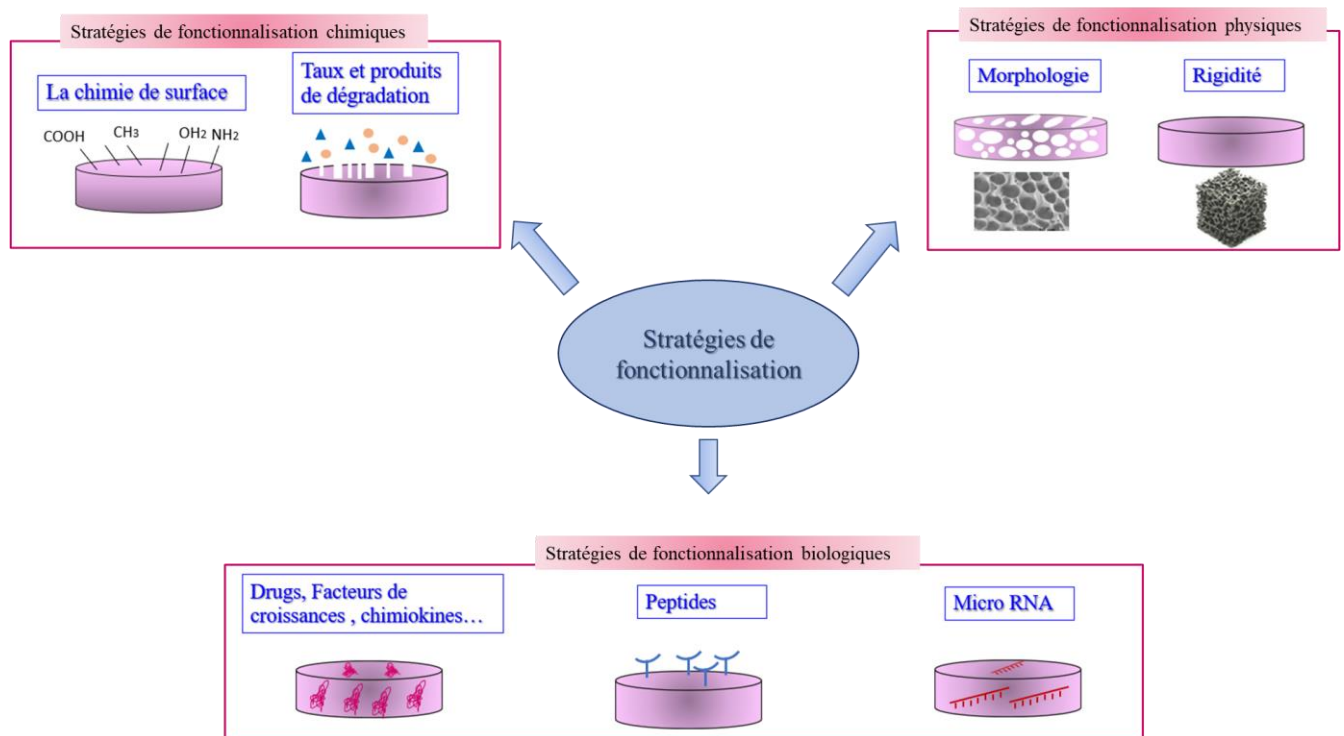


Figure 9 : Stratégies de fonctionnalisation des biomatériaux

La fonctionnalisation de surface est définie comme le revêtement, traitement ou la modification de la surface d'un matériau à l'aide de techniques physiques, biologiques et chimiques aboutissant au développement des matériaux avec une fonctionnalité préférée différente du matériau d'origine (Casanova et al., 2020a). Les méthodes physiques de fonctionnalisation s'intéressent à l'amélioration de la morphologie et la rigidité des biomatériaux (Mas Moruno, 2018). Les stratégies de fonctionnalisation chimiques se focalisent sur l'optimisation de la chimie de surface ainsi que les taux de dégradation des biomatériaux (Amani et al., 2019). Ces stratégies ont permis une amélioration remarquable des propriétés physicochimiques des biomatériaux cependant leur potentiel à diriger le comportement cellulaire reste assez faible. Les techniques de modification biologique cherchent ainsi à exploiter des facteurs biologiques afin d'orienter, d'optimiser et de contrôler la réponse cellulaire à la surface des biomatériaux (Casanova et al., 2020a; Y. Su et al., 2018).

I.4.1.Stratégies de fonctionnalisation physique

Les propriétés physiques des biomatériaux ont un impact sur les comportements cellulaires, en particulier le devenir des cellules souches, et influencent le résultat de la réparation des défauts

osseux (Maruyama et al., 2018). Par conséquent, l'adaptation des propriétés physiques est essentielle pour la fonctionnalisation des échafaudages osseux. Actuellement, la fonctionnalisation physique des échafaudages osseux concerne principalement l'optimisation de la morphologie (par exemple, topographie de surface et taille des pores) et de la rigidité (Casanova et al., 2020a). La topographie de surface est essentielle pour la communication cellule-échafaudage et cellule-cellule, et elle influence la synthèse matricielle (Morent et al., 2008). Les méthodes courantes pour induire la topographie de surface sont le sablage, la gravure à l'acide, la gravure au laser, l'oxydation anodique, la lithographie par nano-empreinte et le traitement au plasma (Figure 10) (Wu et al., 2015).

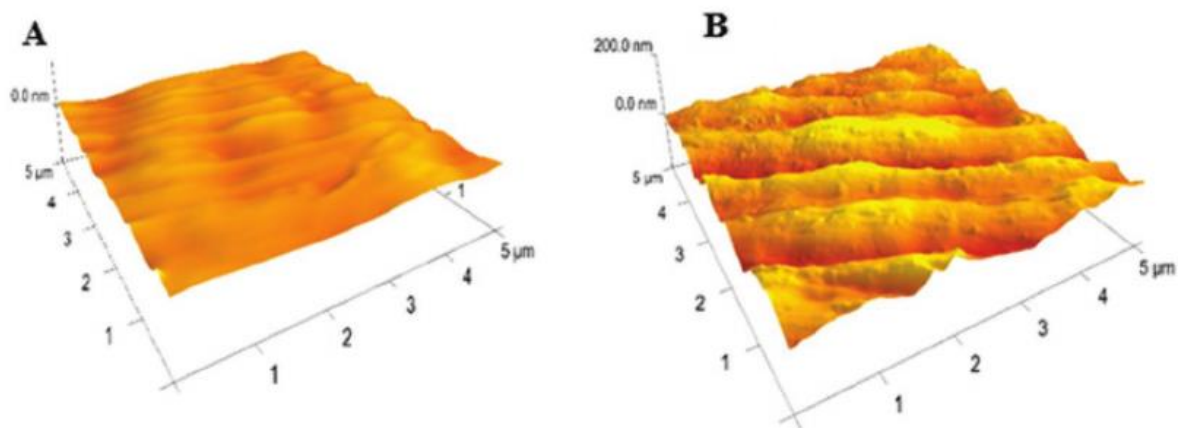


Figure 10 : Fonctionnalisation de la surface plasma des échafaudages PEEK pour une meilleure formation osseuse dans les implants osseux. Images de microscopie à force atomique (Zhao et al., 2016)

(A) de l'échafaudage PEEK non traité et B) de l'échafaudage PEEK après traitement par implantation ionique par immersion ammoniac / plasma. La formation d'une topographie ondulatoire à la surface de l'échafaudage PEEK a été remarquée après le traitement au plasma.

Outre la topographie, la taille des pores des échafaudages influence également le comportement cellulaire et la régénération osseuse (Mour et al., 2010b). Une taille de pore appropriée est favorable à l'adhésion cellulaire, la migration cellulaire et à la formation de capillaires aux sites endommagés (Mour et al., 2010a). On pense que 100 μm est l'exigence minimale pour la taille des pores, tandis que des tailles de pores supérieures à 300 μm sont plus favorables pour une vascularisation accélérée et une croissance osseuse (Mi et al., 2016). Les méthodes courantes pour fabriquer des échafaudages poreux pour la céramique sont le frittage, le moussage et la transformation de phase; ceux pour les polymères sont le lessivage au sel, le frittage, la

lyophilisation, le moussage au gaz et le soufflage à l'état fondu; et pour les métaux, il s'agit principalement d'une fusion sélective au laser (Mi et al., 2016). Autre point, les cellules peuvent ressentir la rigidité des matrices et modifier leur morphologie, leur volume et leur engagement de lignage pour diriger leur destin (Casanova et al., 2020a). Par conséquent, la recherche avancée sur la fonctionnalisation des échafaudages osseux s'est concentrée sur une conception de rigidité favorable. La rigidité de la matrice peut être modifiée en changeant les chimies de réticulation, la concentration du prépolymère et le poids moléculaire du polymère pendant la production de l'échafaudage (Casanova et al., 2020a; Mi et al., 2016).

I.4.2. Stratégies de fonctionnalisation chimiques

Les propriétés chimiques des échafaudages telles que la chimie de surface, la vitesse de dégradation et les produits de dégradation expliquent également une guérison osseuse accélérée (Griffith, 2002b; Haugen et al., 2019). Par conséquent, des méthodes chimiques d'amélioration de la surface des biomatériaux ont été adoptées dans le but de développer des caractéristiques chimiques favorables (Figure 11).

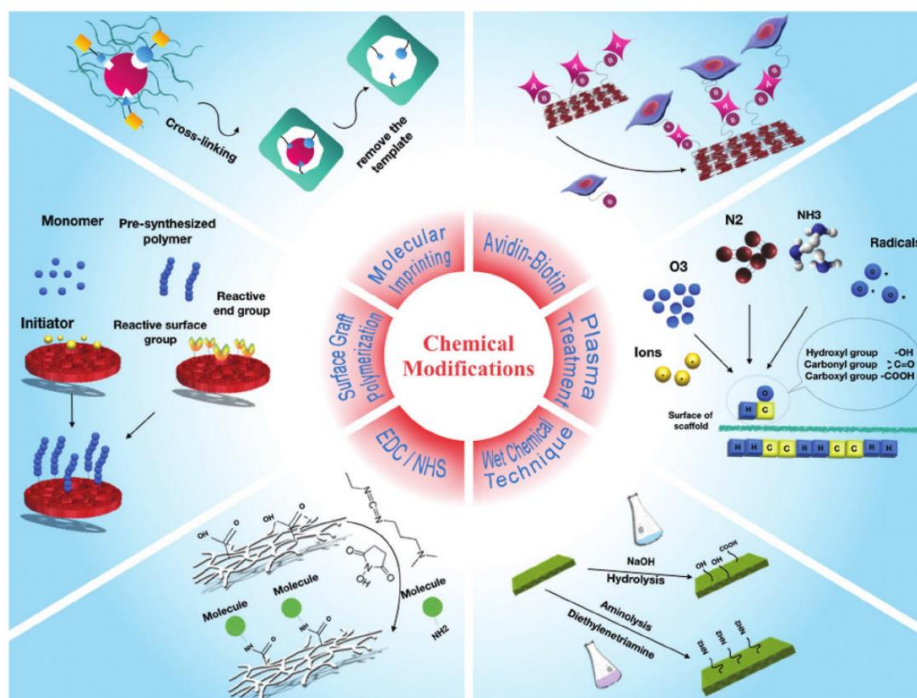


Figure 11 : Représentation schématique de différentes techniques de modification chimique de surface pour améliorer les interactions cellule-matériau (Amani et al., 2019)

La chimie de surface d'un échafaudage est principalement déterminée par ses groupes terminaux ainsi que par la charge de surface. C'est un facteur critique pour les interactions entre les cellules et les comportements cellulaires (J. Y. Park et al., 2018). Il est bien établi que les groupes terminaux d'un matériau déterminent son hydrophobicité / hydrophilie et influencent finalement l'attachement cellulaire. Par exemple, la PCL avec des groupes méthylène et ester abondants montre une mauvaise fixation cellulaire en raison de son hydrophobicité, tandis que le collagène avec de nombreux groupes carboxyle et amine est bénéfique à l'adhésion et à la croissance cellulaires par son hydrophilie (J. Y. Park et al., 2018). Une stratégie pour optimiser la chimie de surface des échafaudages consiste à mélanger correctement les matériaux hydrophobes et hydrophiles. D'autre part, le taux de dégradation est une autre caractéristique importante de l'échafaudage liée à la formation osseuse (Wu et al., 2015). Il convient de noter que les échafaudages qui se dégradent trop rapidement ne peuvent pas être utilisés comme échafaudage remplissant l'espace ou soutenir la formation de nouveaux os, tandis que les échafaudages se dégradant trop lentement peuvent entraver la régénération osseuse en raison de la fonction cellulaire affectée. Un échafaudage osseux idéal devrait se dégrader au même rythme que la régénération osseuse, laissant la place à un os nouvellement formé et éventuellement remplacé par du tissu osseux mature *in vivo* (Haugen et al., 2019). Outre la vitesse de dégradation, les produits de dégradation des échafaudages ont des effets significatifs sur la formation osseuse. Les sous-produits acides résultant de l'hydrolyse de certains polymères synthétiques, tels que le PLGA, l'acide polyglycolique (PGA) et le PLA, peuvent altérer l'invasion cellulaire inflammatoire et l'angiogenèse *in vivo* (Amani et al., 2019). De plus, les sous-produits acides peuvent réduire le pH local, ce qui accélère les taux de dégradation. En revanche, certains produits ioniques libérés des échafaudages affectent favorablement à la fois la vascularisation et la régénération osseuse. Il est bien établi que certains oligo-éléments nécessaires aux organismes vivants, tels que le magnésium (Mg), le cuivre (Cu), le cobalt (Co) et le zinc (Zn), déclenchent les cellules endothéliales vers l'angiogenèse et favorisent la différenciation ostéogénique (Gentile et al., 2015). Cependant, un excès de micro-éléments (plus de 0,01%) pourrait entraîner une toxicité pour le comportement cellulaire et des dommages aux tissus et organes de l'hôte (Amani et al., 2019; Lin et al., 2018).

Des nouvelles approches de fonctionnalisation (physique et chimique) des surfaces des biomatériaux ont émergé dans l'optique d'améliorer les propriétés de ces derniers montrant une amélioration des propriétés physicochimique à savoir le contrôle de corrosion et des modules

élastiques. Les réponses biologiques à savoir la connexion bio-fonctionnelle avec les cellules environnantes reste médiocre et leurs applications à grande échelle reste discutable.

Tableau 3 : Avantages et limites des stratégies de fonctionnalisation physiques et chimiques des biomatériaux (Casanova et al., 2020a; F.-M. Chen & Liu, 2016)

Modification	Propriétés améliorées des biomatériaux	Limites
Physiques	<ul style="list-style-type: none"> -Porosité optimisée pour améliorer la croissance tissulaire -Topographie induite (morphologie, rugosité..) → Matériaux fibreux Matériaux poreux 	Limité par les techniques de fabrication et l'applicabilité générale (cout à l'échelle industrielle)
Chimiques	<ul style="list-style-type: none"> -Des surfaces polymères réticulées pour diminuer la perméabilité de la surface et augmenter la dureté de la surface -Traitement plasma avec des gaz réactifs pour créer de nouveaux groupes fonctionnels sur la surface du polymère -Greffage de macromolécules telles que le polyéthylène glycol pour réduire l'adsorption des protéines et l'adhésion cellulaire -Groupes fonctionnels utilisés pour produire une surface chargée positivement ou négativement 	<ul style="list-style-type: none"> -Les dommages oxydatifs et les faibles densités de surface limitent l'application à long terme -Disponibilité commerciale limitée de certains polymères -La toxicité de nombreux polymères hydrophobes

I.5. Stratégies de fonctionnalisation biologique

La bio-fonctionnalisation des surfaces de biomatériaux avec des molécules bioactives a suscité un intérêt particulier essentiellement en raison de la nécessité d'améliorer les performances biologiques des dispositifs médicaux implantables (Casanova et al., 2020a). Les signaux

biologiques fournis par les échafaudages sont d'une importance cruciale pour une bio-intégration efficace et une réparation réussie des défauts osseux et se montrent comme approche très prometteuse pour remédier plusieurs problèmes de biomatériaux discutés préalablement (J. Y. Park et al., 2018; Y. Su et al., 2018). Récemment, des efforts de recherche intensifs se sont concentrés sur la fonctionnalisation biologique des échafaudages. Les biomolécules telles que les protéines de la MEC, les principes actifs, les facteurs de croissance, les chimiokines, les peptides et les aptamères sont largement utilisées pour fonctionnaliser les échafaudages en raison de leurs capacités à induire des réponses cellulaires favorables et à favoriser la régénération osseuse (Amani et al., 2019). En effet, dans une stratégie de bio-fonctionnalisation, l'association de ces biomolécules, agissant comme des sites de reconnaissance pour l'interaction des cellules, à la surface des biomatériaux, pourraient conduire au développement des signaux biologiques capables de contrôler les interactions cellulaires (par exemple, les intégrines) et d'améliorer la croissance cellulaire, la différenciation et la synthèse MEC (Badylak et al., 2009; Huang & Chang, 2019). Ces biomolécules sont généralement incorporées dans des échafaudages par adsorption physique, couplage covalent chimique et encapsulation (Griffith, 2002b; Rezaie et al., 2015b; Y. Su et al., 2018). L'adsorption physique est la méthode la plus pratique et la plus courante pour fonctionnaliser des échafaudages avec des biomolécules. Basée sur les interactions de van der Waals, les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes, la stratégie d'adsorption physique remplit la fonctionnalisation biologique des échafaudages tout en évitant de réduire le potentiel original des biomolécules et des échafaudages (Amani et al., 2019). Le couplage covalent chimique permet une immobilisation moléculaire plus stable. Par conséquent, cette stratégie chimique a été largement utilisée pour bifonctionnaliser des échafaudages pour la libération contrôlée et prolongée de biomolécules (von der Mark et al., 2010). Cependant, l'activité des biomolécules est inévitablement compromise par l'utilisation de solvants organiques (par exemple, des acides / bases forts) (Amani et al., 2019). Les biomolécules appliquées pour les échafaudages bio-fonctionnalisés sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Biomolécule pour la bio-fonctionnalisation des biomatériaux (Amani et al., 2019)

Molecule class	Name	Function
Drugs	Simvastatin	Autogenous osteogenic and angiogenic stem cell recruitment, BMP-2 secretion
	FTY20 (fingolimod)	Osteogenic differentiation, vessel formation
Growth factors	Sphingosine-1-phosphate (S1P)	
	Dexamethasone (DEX)	Osteogenic differentiation
	BMPs	Osteogenic differentiation
	PDGF	EPCs and MSCs
	TGF- β	Proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells
	VEGF	Angiogenesis
Chemokines	FGF-2	Cell proliferation and neovascularization
Peptides	SDF-1	MSCs and EPCs recruitment and angiogenesis
	EEGGC peptide	Nucleation and growth of calcium phosphate crystals, osteogenic differentiation of MSCs and mineralization
Micro RNAs (miRNAs)	RGD	Proliferation of the osteoblast-like cells and calcium deposition
	Collagen mimetic peptides, P15 (GTPGPQGIAGQRGVV)	Adhesion, proliferation and differentiation of osteoblasts
	Osteogenic growth peptide (OGP)	Osteoblasts proliferation, differentiation and mineralization
	BMP-2-derived peptides P24 (SKIPKASSVPTL-SAISTLYLDDD)	
	BMP-binding peptide (BBP) (CRSTVRMSAEQVQNVVRC)	Selectively capture and stabilize BMPs, osteogenic differentiation
	SDF-1 α derived peptide	Blood vessel regeneration and stem cell recruitment
	miR-26a	Regulate angiogenesis, osteogenic differentiation, and rescue the osteogenic capacity of osteoporosis-impaired osteogenic cells

Parmi ces biomolécules, les protéines de la MEC sont les plus rapporté et investigués pour plusieurs raisons. La MEC fournit un soutien structurel et biochimique aux cellules, agissant comme un échafaudage naturel, comprenant des macromolécules extracellulaires telles que le collagène, les enzymes, protéoglycanes et autres biomolécules de signalisation (Badylak et al., 2009). La modulation d'un large éventail de comportements cellulaires, à savoir cellule adhésion, prolifération, migration, communication de cellule à cellule et la différenciation sont des fonctions communes de la MEC (Figure 12).

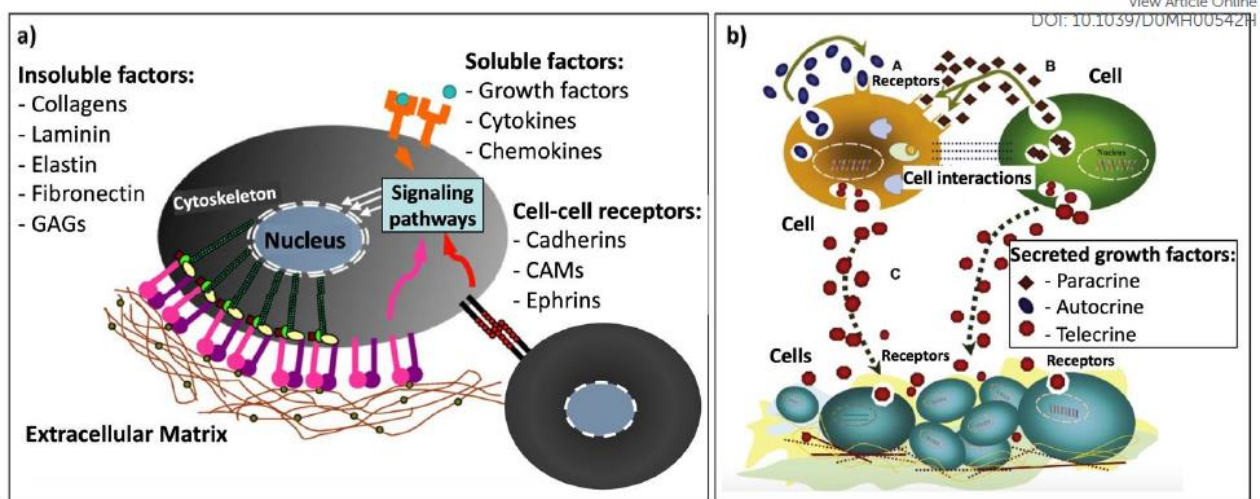


Figure 1 The extracellular microenvironment (a) and cell-signaling by bioactive factors (b). Adapted from ^{1,2}.

Figure 12 : Les interactions des éléments de la MEC avec les cellules (Casanova et al., 2020a)

Les protéines de la MEC sont capables d'interagir avec les récepteurs de surface cellulaire, fournissant un réseau fonctionnel (Huang & Chang, 2019; J. Y. Park et al., 2018).

Dans ce contexte, les protéines natives de la MEC sont au cœur des approches utilisant les propriétés d'adhésion cellulaire des échafaudages et sont dotées d'un grand potentiel pour construire un micro-environnement inducteur tissulaire qui oriente et organise le comportement cellulaire et qui à son tour améliorera la cicatrisation osseuse et la stabilité de l'implant (Amani et al., 2019; Y. Su et al., 2018).

En effet, la modulation de l'interface entre les cellules et les biomatériaux avec des protéines bioadhésives est une approche prometteuse pour améliorer les propriétés biologiques des biomatériaux. Au cours des deux dernières décennies, des approches biomimétiques ont cherché à appliquer des fonctionnalités biologiquement pertinentes aux matériaux en attachant des motifs bioadhésifs dérivés de la MEC (García & Reyes, 2005; Rahmany & Dyke, 2013).. Il existe actuellement plusieurs stratégies d'exploitation de la MEC à cette finalité (Figure 13)



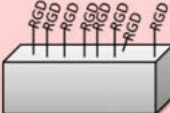



Natural ECM Biomaterials	Whole ECM Adsorption	Synthetic linear Binding motif	Spatially oriented Binding Motif	Nanopatterning with nanolithography	ECM-Like Biomaterials
					
Use of natural ECM biomaterials provides a biologically relevant environment but prove difficult due to poor mechanical properties, inconsistent reproducibility and risk of immunogenicity.	Application of whole ECM proteins to biomaterial surfaces allowed for the development of biomimetic synthetic materials, however due to the complexity of protein folding and presentation of binding motifs it is difficult to modulate cellular signals.	Identification of the functional binding motifs lead to improved targeting of receptor mediated cellular responses through functionalization of specific amino acid sequences. This method improved specificity but strayed from the functionally efficient orientation.	Proper 3 D orientation and spatial distribution of peptides on the surface of biomaterials resulted in enhanced biological activity.	Nanolithography provides a method for positioning binding motifs into a more physiologically relevant topography.	Keratin hydrogels are an example of ECM-like materials that display similar cell adhesive characteristics as ECM proteins, but maintain tunable mechanical and biological characteristics without the need for modifications.

Figure 13 : Stratégies d'exploitation de la MEC pour le développement des biomatériaux bifonctionnalisés (Rahmany & Dyke, 2013)

Ainsi, les protéines de la MEC possèdent des caractéristiques biologiques importantes et fournissent une plateforme pour l'adhésion cellulaire et l'activation de voies de signalisation cellulaire hautement régulées (Badylak et al., 2009; Rahmany & Dyke, 2013; Y. Su et al., 2018).

Cependant, les biomatériaux à base de MEC présentent plusieurs limites, notamment de mauvaises propriétés mécaniques et un risque d'immunologique (Rahmany & Dyke, 2013). Les biomatériaux synthétiques atténuent les risques associés aux biomatériaux naturels, mais manquent souvent de l'activité biologique robuste nécessaire pour diriger la fonction cellulaire. L'utilisation des protéines de la MEC pour le traitement de la surface de ces biomatériaux semble une approche très prometteuse fournissant un compromis idéal des propriétés physicochimiques et biologiques à la fois (García & Reyes, 2005).

La fibronectine est une glycoprotéine de la MEC impliquée dans l'adhésion et la migration cellulaire de plusieurs types de cellules, influençant à la fois la morphologie et la physiologie des cellules (Bachman et al., 2015a; Pankov & Yamada, 2002a). Des études ont révélé l'importance de la fibronectine dans le contrôle de l'adhésion et de la survie des cellules sur divers substrats (Altmann et al., 2011; Cutler & García, 2003a; Petrie et al., 2009). La FN est employée dans des stratégies de bio-fonctionnalisation de biomatériaux et se montre comme une candidate de choix, car jouant un rôle clé dans la cascade de cicatrisation et étant impliquée dans un large éventail d'activités cellulaires (Zollinger & Smith, 2017). Dans la section suivante, la fibronectine est examinée en détail en soulignant son implication dans divers comportements cellulaires et ses applications potentielles dans la bio-fonctionnalisation des biomatériaux, sa bio-production. Nous évoquerons également les limites de son utilisation

II. La fibronectine

La fibronectine (FN) est une protéine multi- modulaire, incorporée sous une forme fibrillaire dans la matrice extracellulaire de presque tous les types de cellules (Parisi et al., 2020b). C'est un substrat majeur pour l'adhésion et la migration des cellules et joue un rôle important dans un grand nombre de processus physiologiques, y compris la cicatrisation, la régénération tissulaire, la néovascularisation et le développement embryonnaire (Pankov & Yamada, 2002a). La capacité de la fibronectine à porter toutes ces diverses fonctionnalités dépend de ces interactions avec un grand nombre de molécules, y compris les récepteurs transmembranaire cellulaire adhésifs et de signalisation (Bachman et al., 2015b), d'autres composants de la matrice extracellulaire et des facteurs de croissance et cytokines (Pankov & Yamada, 2002a). La régulation et l'intégration d'un si grand nombre d'interactions dépendent de l'architecture

modulaire et de la flexibilité de la fibronectine, qui permet un grand nombre de conformations, exposant ou détruisant différents sites de liaison (Hocking et al., 1994; Parisi et al., 2020b). La structure primaire complète de la fibronectine humaine a été rapportée en 1985 par Kornblihtt et al., (Kornblihtt et al., 1985) , et celle de la fibronectine plasmatique bovine en 1986 par Skorstengaard et al., (Skorstengaard et al., 1986). Depuis, la relation entre la structure moléculaire et la fonction biologique de la fibronectine a été largement étudiée (Mezzenga & Mitsi, 2018).

II.1. Structure :

La FN est présente chez l'homme sous plus de 20 isoformes d'épissage alternatives. Structuellement, FN est une glycoprotéine dimérique de haut poids moléculaire (~500 kDa), composée de deux sous-unités presque identiques (~250 kDa) liées de manière covalente par des liaisons disulfure vers l'extrémité C terminale (Figure 14) (Potts & Campbell, 1996). Chacune de ces sous-unités se compose de trois types différents de répétitions : type I, II et III. Les répétitions de type I correspondant à 12 modules de 40 résidus d'acides aminés, structurés en feuillets β empilés, liés par une liaison disulfure, et qui présentent un noyau hydrophobe composé de résidus conservés aromatiques. Les répétitions de type II (2 modules) ont une longueur de 60 résidus et sont constituées de feuillets β antiparallèles perpendiculaires liés entre eux par 2 liaisons disulfure intra-chaîne. Finalement, les répétitions de type III ont une longueur de 90 résidus et comprennent 15 et 17 modules. Ces répétitions ne possèdent pas de liaisons disulfures et les feuillets β antiparallèle sont liés entre eux par des boucles flexibles et stabilisés par liaison hydrogène (Parisi et al., 2020b). Les répétitions de type III sont les plus sensibles au repliement (folding) possible du FN (Zollinger & Smith, 2017).

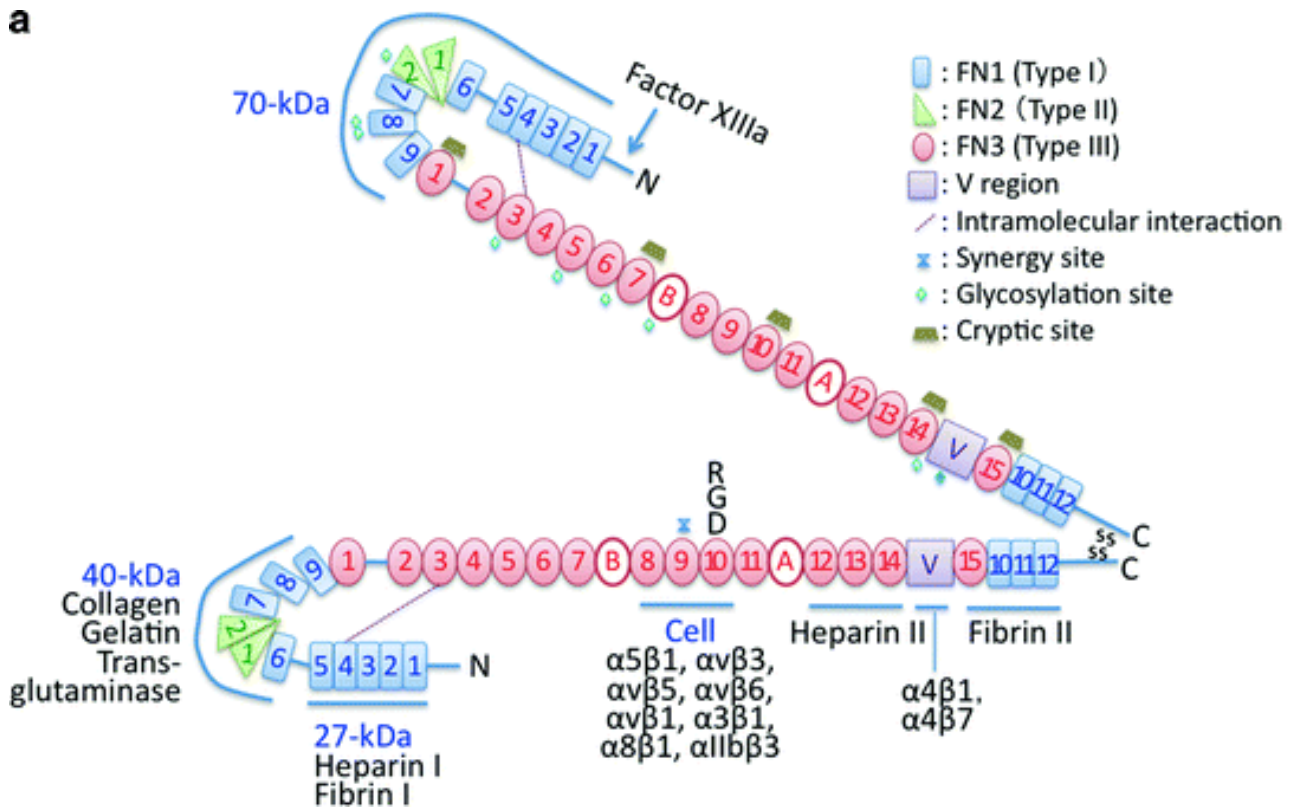


Figure 14: Présentation schématique de l'architecture modulaire multi-domaine de la fibronectine (Xu & Mosher, 2011)

II.2. Biosynthèse de la fibronectine

La FN est codée par un seul gène, et le pré-ARNm est alternativement épissé pour créer un grand nombre de variantes d'épissage (Zollinger & Smith, 2017). Ces variants comprennent la délétion de 1 ou 2 domaines FNIII connus comme EDA et EDB. Lorsqu'il est présent, l'EDA occupe l'espace entre FnIII11 et FnIII12, tandis que l'EDB réside entre FnIII7 et FnIII8. Chez l'Homme, il existe cinq variations de longueur moléculaire différente dans la région V, ou de longueur variable, entre FnIII14 et FnIII15 (To & Midwood, 2011). Le FN plasmidique, sécrétée par les hépatocytes et circulant dans le sang à une concentration de 300 µg/L (To & Midwood, 2011), n'inclut généralement pas les domaines EDA et EDB, mais peut inclure la région V. Par contre, la FN sécrétée par les cellules sur le site d'assemblage de la matrice, connue sous le nom de FN cellulaire, comprend un plus grand nombre d'isoformes et peut inclure à la fois EDA et EDB (To & Midwood, 2011). La forme fonctionnelle de la FN *in vivo* est dans un état fibrillaire. Les molécules de fibronectine sont assemblées en fibres dont le diamètre varie de 10 nm à micromètres, avec des longueurs de plusieurs dizaines de micromètres (Xu & Mosher, 2011). Le repliement se produit dans des portions de molécules de la matrice FN lorsqu'elles sont placées sous tension des forces de traction.

II.3. Les différentes formes de la fibronectine

La FN est synthétisée sous deux formes structurellement et fonctionnellement similaires ; forme plasmidique et forme cellulaire (Figure 15).

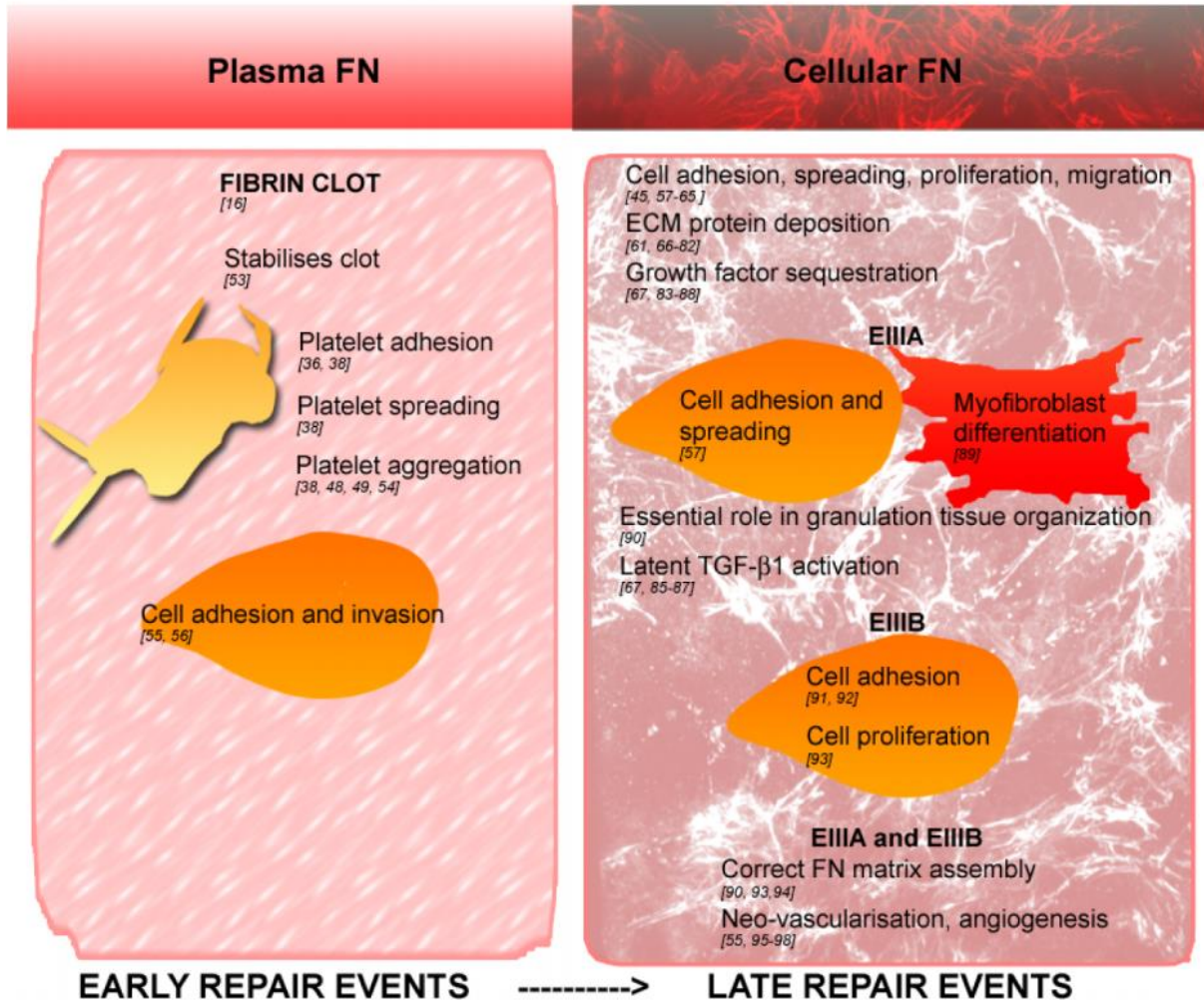


Figure 15 : Fonctions de la fibronectine cellulaire et plasmique pendant la cicatrisation des plaies.

Les différentes formes de FN jouent des rôles distincts au cours des différentes étapes de la cicatrisation (To & Midwood, 2011)

II.3.1. La fibronectine plasmique

La FN plasmique est synthétisée par les hépatocytes et sécrétée dans le plasma sanguin, où elle circule à 300-400 $\mu\text{g} / \text{ml}$ sous une forme soluble, compacte et inactive (To & Midwood, 2011). Dans le plasma soluble, une seule sous-unité possède un domaine V, et les modules EIIIB et EIIIA sont absents (To & Midwood, 2011). Seuls de très faibles taux (1,3-1,4 $\mu\text{g} / \text{ml}$) de FN possédant les modules EIIIA et / ou EIIIB (FN cellulaire) circulent dans le plasma sanguin (Xu

& Mosher, 2011), mais il a été démontré que son taux plasmatique augmente après un traumatisme entraînant des lésions des tissus vasculaires, après une inflammation et des maladies telles que l'athérosclérose, les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux (Pankov & Yamada, 2002a)

II.3.2. La fibronectine cellulaire

Le FN cellulaire est synthétisée par de nombreux types de cellules, notamment les fibroblastes, les cellules endothéliales, les chondrocytes, les cellules synoviales et les myocytes (To & Midwood, 2011). L'épissage alternatif de l'EIIIB et de l'EIIIA et l'épissage plus complexe du domaine V ou IIICS lors de la transcription de la FN cellulaire permet à ses différentes isoformes d'être exprimées d'une manière dépendante du tissu, régulée temporellement et spécifique au type de cellule (To & Midwood, 2011). Chez l'homme, 20 isoformes potentielles de FN peuvent être générées (Xu & Mosher, 2011). Une expression accrue des isoformes EIIIA + et EIIIB + de la FN est associée à des zones de remodelage tissulaire physiologique ou pathologique, y compris la cicatrisation des plaies et la réparation des tissus. Ces isoformes modulent les propriétés de la MEC et affectent les processus cellulaires. L'orientation et les flexibilités inter-domaines de rotation des modules FNIII sont connues pour être affectées par les domaines voisins, de sorte que l'inclusion ou l'exclusion de domaines alternativement épissés peut changer la conformation globale de FN, affectant la présentation des structures de boucle FNIII et des séquences de liaison pour moduler la cellule FN signalisation et interactions FN-FN lors de l'assemblage de la matrice (To & Midwood, 2011). La composition structurelle des différentes isoformes FN est importante, car elles jouent des rôles distincts dans les événements de cicatrisation précoce et tardive (Zollinger & Smith, 2017).

II.4. Organisation des domaines de la fibronectine

Les différents domaines de la fibronectine, comme schématisé sur la figure 14, sont des sites d'interactions spécifiques avec d'une part la plupart des constituants de la MEC et d'autre part avec les cellules. Nous détaillons ci-dessous les principaux domaines mis en jeu dans ces interactions.

II.4.1. Domaines d'interaction fibronectine-intégrine :

La communication de la FN avec les cellules se fait via les domaines de liaison aux intégrines (Bachman et al., 2015b). Les intégrines sont les principaux récepteurs cellulaires qui interviennent dans l'adhésion cellule-matrice, dont certains sont exprimés de manière ubiquitaire, tandis que d'autres sont spécifiques aux tissus. Structurellement, les intégrines sont des hétérodimères générés par le couplage de sous-unités alpha (α) et bêta (β), qui se lient spécifiquement à différentes molécules de la MEC (Martino et al., 2009a). Il existe respectivement 18 et 8 sous-unités α et β (Martino et al., 2009a). Chaque sous-unité comprend un grand domaine extracellulaire avec sélectivité pour les ligands de la MEC, un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique (Bachman et al., 2015b). Les intégrines ne portent pas d'activité enzymatique intrinsèque et la queue cytoplasmique de la sous-unité β est structurée pour s'associer avec des molécules de signalisation intracellulaire après dimérisation et ainsi activer la voie de transduction médiée par intégrine (Parisi et al., 2020b). Il existe de nombreuses intégrines différentes reconnaissant la FN (tableau 4) et cette reconnaissance dépend essentiellement de la conformation structurelle de la FN et de la sensibilité des résidus de type III au changement de conformation.

Tableau 5: Les récepteurs d'adhésion de la famille des intégrines (Parisi et al., 2020a)

Intégrines	Ligands (FN et autres molécules de la MEC)	Cellules
$\alpha3\beta1$	Fibronectine Collagène- I Lamine	Lymphocyte B Cellules du glomérule rénal
$\alpha4\beta5$	Fibronectine VCAM-I	Lymphocytes Monocytes NK cellules Thymocytes
$\alpha5\beta1$	Fibronectine	Cellules osseuses Fibroblastes Cellule T Monocytes CSM
$\alpha8\beta1$	Fibronectine	-

$\alpha v \beta 3$	Fibronectine Vitronectine Facteurs Willebrand	Plaquettes
$\alpha v \beta 6$	Fibronectine	Cellules de carcinome

Différentes familles d'intégrines reconnaissent et se lient à la FN par l'interaction avec une séquence tripeptidique composé de trois acide aminé Arginine-Glycine-Acide-aspartique (RGD). Cette séquence est localisée au niveau du 10^{ème} domaine de la répétition de type III de la FN (FNIII10) et représente ainsi le domaine central d'interaction avec les cellules (Mardon & Grant, 1994). Cependant, le récepteur classique du FN est l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ (figure 16). L'interaction de la FN avec l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ est largement documenté. Cette interaction implique non seulement la séquence RGD du FNIII10 mais aussi une autre séquence qui agit en synergie et composée des cinq acides aminés Proline-histidine-sérine-arginine-asparagine (PHSRN), sur le 9^{ème} domaine de FN de type III (FNIII9) (Martino et al., 2009a). De point de vu conformation, le domaine de liaison RGD et la séquence synergique PHSRN sont séparés de 32 Å (Liamas et al., 2018). Cette distance est primordiale pour la reconnaissance spécifique entre FN et l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$. En effet, une modification de cet espacement entre ces deux séquences RGD et PHSRN diminue considérablement la capacité de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ à reconnaître la FN, mais améliore celle la reconnaissance de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ (Altroff et al., 2001; Keselowsky et al., 2003) . En conséquence, les changements de conformation de la FN peuvent significativement entraîner la spécificité de l'intégrine et les réponses physiopathologiques des cellules et des tissus.

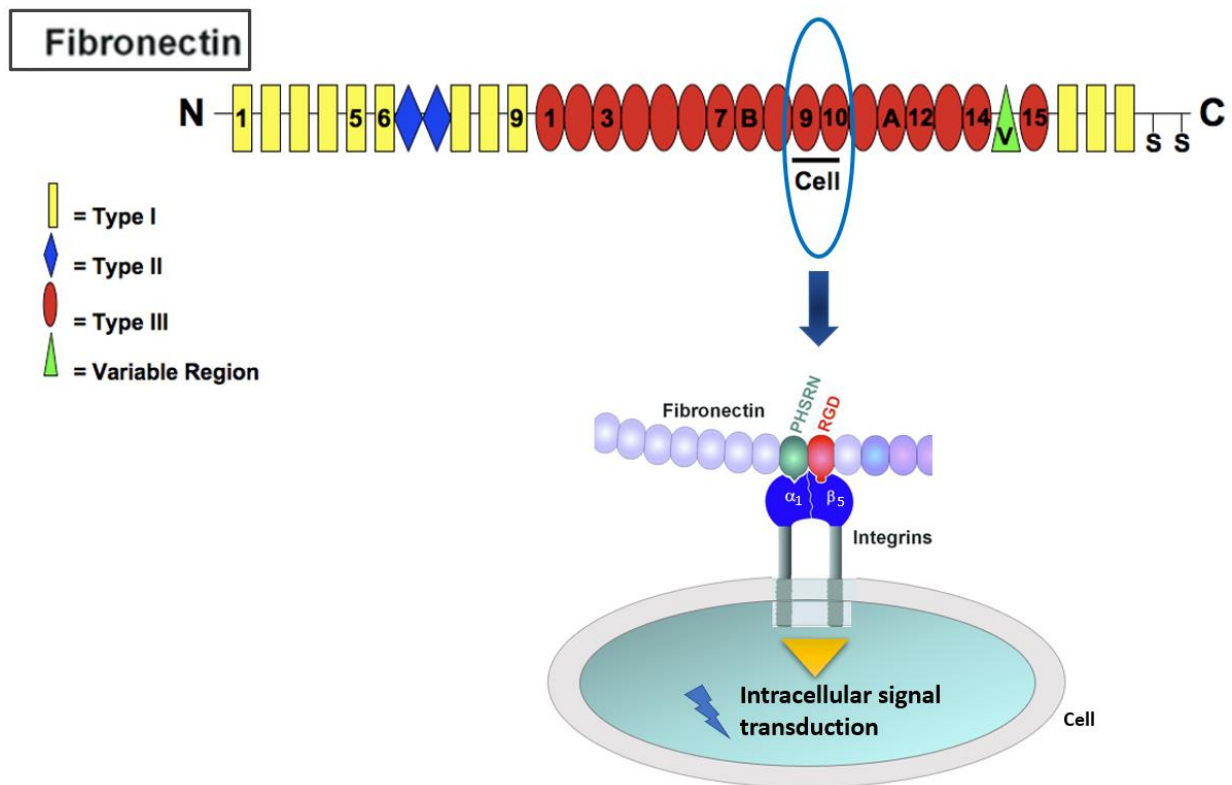


Figure 16 : La structure modulaire de la fibronectine et ses domaines de liaison spécifique à l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ (figure inspirée de (X.-Q. Wang et al., 2008))

II.4.2. Domaines d'interaction avec le collagène

Le domaine de liaison au collagène correspond aux domaines 6-9 de FN type I ($^{6-9}$ FNI) et des modules 1 et 2 de FN type II ($^{1-2}$ FNII) (Figure 17). Selon Ingham et al. la FN lie plus efficacement le collagène dénaturé (gélatine) que le collagène natif (Ingham et al., 1988). Le collagène se dénature localement à des températures physiologiques et déplie leur triple hélice (Paten et al., 2019), permettant à la fibronectine d'interagir. L'interaction fibronectine-collagène peut induire l'adhésion cellulaire au collagène dénaturé, former une réticulation non covalente de la fibronectine et du collagène dans les voies migratoires et réguler l'élimination des matières du collagènes dénaturées du sang et des tissus (Parisi et al., 2020b; Paten et al., 2019).

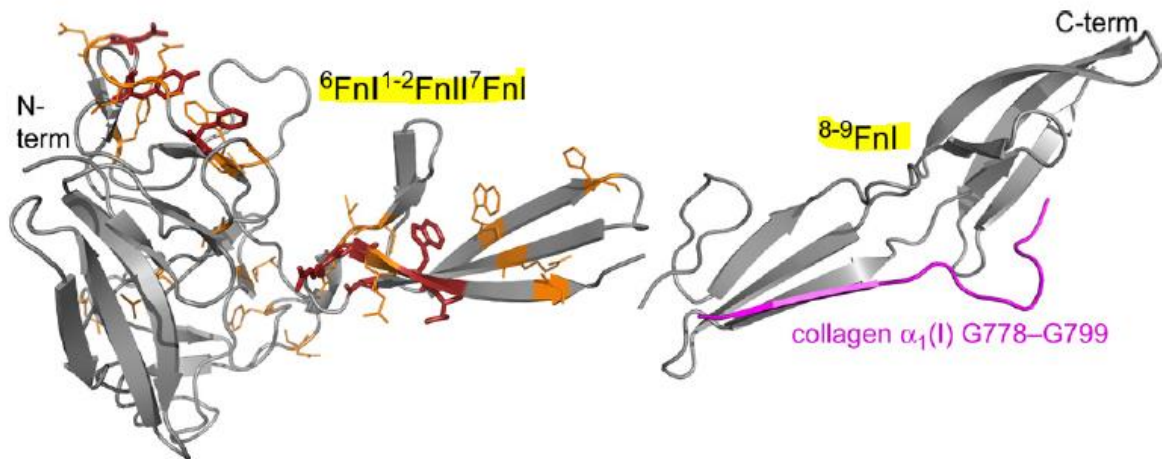


Figure 17 : Modèle de l'interaction FN et collagène (Erat et al., 2010)

La conformation 7FnI-8FnI est basée sur les données cristallographiques et structures de solution des paires de domaines FnI. Le extrémités N et C terminales du modèle sont indiqués comme N et C-term. Les résidus de liaison peptidique de 6FnI1-2FnII7FnI et le peptide de collagène lié à 8-9FnI forment un site d'interaction continu

II.4.3. Domaines d'interaction avec la fibrine

Trois sites de liaison à la fibrine sont présents sur la FN. Le premier et le principal site de liaison à la fibrine se trouve dans le N-terminal 4 FN I-5 FN I (Potts & Campbell, 1996). Le deuxième site de liaison est 10FN I-12FN I près de l'extrémité C-terminale (Xu & Mosher, 2011). Le troisième site de liaison apparaît après digestion par la chymotrypsine de la fibronectine, et est immédiatement adjacent au domaine de liaison au collagène (Xu & Mosher, 2011). Aux températures physiologiques, l'interaction fibronectine-fibrine est très faible. La réticulation covalente de la fibrine et de la fibronectine médiée par la transglutaminase du facteur XIII au niveau d'un résidu Gln proche de l'extrémité N-terminale stabilise cette interaction, aide à incorporer la fibronectine dans le caillot de fibrine, stimule la croissance du thrombus plaquettaire sur la fibrine et a le potentiel de moduler l'adhésion ou la migration des cellules dans caillots de fibronectine-fibrine lors de la cicatrisation (Xu & Mosher, 2011).

II.4.4. Domaines d'interaction avec l'héparine

La fibronectine contient deux domaines de liaison à l'héparine qui interagissent principalement avec les protéoglycanes héparane sulfate. Le domaine le plus affiné est localisé sur les modules 12FN III-14FN III dans l'extrémité C-terminale (Raitman et al., 2018). Les études sur la structure cristalline des modules 12FN III-14FN III ont révélé que le site de liaison à l'héparine

est un groupe de six résidus chargés positivement dans 13FNIII et un site mineur de liaison à l'héparine dans 14FNIII (Barkalow & Schwarzbauer, 1991). Le deuxième site, se trouve dans les modules N-terminal 1 FNI–5 FNI (Raitman et al., 2018; Roy et al., 2011). D'autres nouveaux domaines de liaison à l'héparine ont été identifiés dans le module 5FNIII et dans la région V alternativement épissée (Mostafavi-Pour et al., 2001). Les domaines de liaison à l'héparine peuvent coopérer avec le domaine de liaison cellulaire de la fibronectine et potentialiser l'adhésion cellulaire, l'étalement cellulaire et la formation de faisceaux de microfilaments d'actine sur la fibronectine pour certains types de cellules (Raitman et al., 2018; Roy et al., 2011).

II.5. Implication de la fibronectine dans le fonctionnement cellulaire

Etant une protéine abondante de la matrice extracellulaire, l'investigation du rôle de la fibronectine était dans le cœur de plusieurs recherches (Xu & Mosher, 2011; Zollinger & Smith, 2017). Il a été démontré que cette protéine, en se liant aux intégrines, agit ainsi comme un acteur clé de la communication entre l'environnement intra et extracellulaire, contrôlant ainsi le comportement cellulaire (Bachman et al., 2015b). Du fait de sa structure et de ses domaines d'affinité, le rôle principal de la FN est de moduler l'interaction entre les cellules et la MEC jouant ainsi le rôle d'un médiateur principal de divers comportements cellulaires.

II.5.1.L'adhésion cellulaire médiée par les intégrines

Comme nous l'avons indiqué précédemment, la FN possède sur ses domaines FIII9/10 de motifs capables de favoriser l'adhésion et l'étalement des cellules (Altroff et al., 2001). Elle participe par le biais de ces domaines à l'activation de l'adhésion cellulaire (Figure 18). En effet, l'adhésion cellulaire fait référence tant aux mécanismes par lesquels les cellules voisines interagissent, se fixent ou communiquent entre elles par des jonctions cellulaires (adhésion cellule-cellule), qu'à la capacité des cellules à interagir avec leur MEC environnante ou avec un substrat artificiel par des contacts focaux (cellule– adhésion de la matrice) (Endo et al., 2018; García & Reyes, 2005; Keselowsky & García, 2005). Les sites d'adhésion cellulaire avec l'environnement extracellulaire sont les adhérences focales. Après dimérisation des intégrines, un réseau de 156 composants et de plus de 690 interactions forme l'adhésome et conduit à terme à un réarrangement des protéines du cytosquelette. Ce large spectre de protéines peut être divisé

en trois catégories : 1) protéines de liaison à l'intégrine, 2) adaptateurs ou protéines de repliement scaf et 3) enzymes (Parisi et al., 2020b). Les protéines de liaison à l'intégrine telles que la FN sont directement recrutées par la queue cytoplasmique de la sous-unité intégrine β (Bachman et al., 2015b). Ainsi, les adaptateurs ou protéines d'échafaudage (par exemple la vinculine, la paxilline et -actinine), lient les protéines associées aux intégrines avec les composants du cytosquelette, tandis que les enzymes, qui sont principalement des kinases associées à la tyrosine (par exemple la kinase d'adhésion focale –FAK, les GTPases associées à la famille Rho, Src), contribuent à la transmission des signaux moléculaires (Figure 18). La propagation cellulaire est directement liée à l'adhésion cellulaire et elle est fondamentale pour la prolifération, la migration et la différenciation ultérieures, et un manque d'adhésion / propagation cellulaire peut entraîner une apoptose cellulaire (Parisi et al., 2020b).

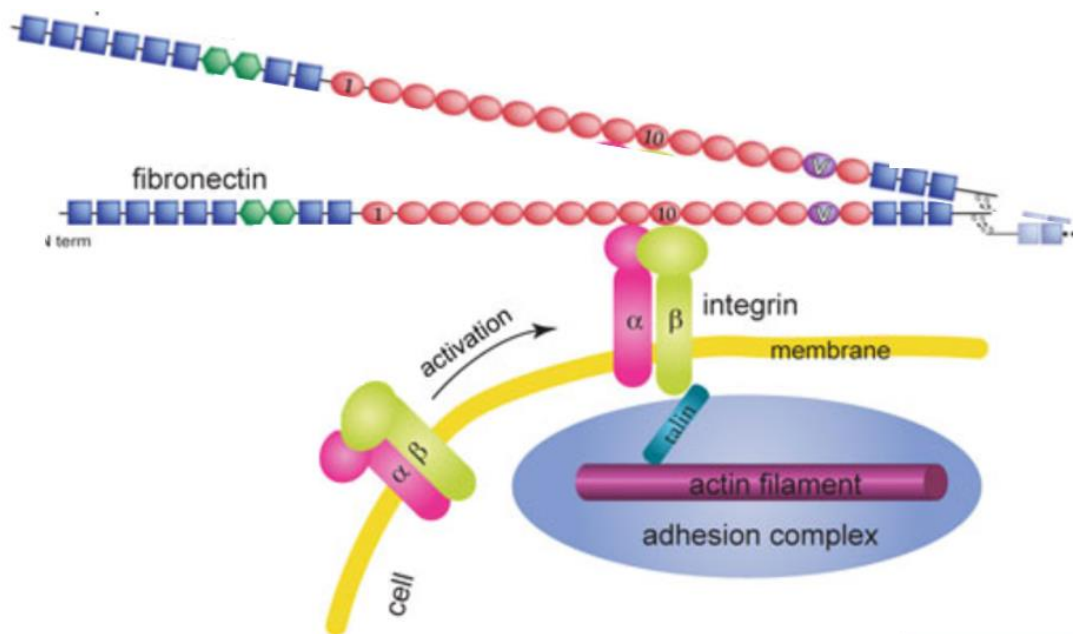


Figure 18 : Illustration schématique de l'interaction FN-intégrine (Gao et al., 2006; Johansson et al., 1997)

II.5.2. La migration cellulaire

La migration cellulaire est une activité cellulaire cruciale pour la colonisation et dépend directement de l'adhésion et de l'étalement des cellules (Parisi et al., 2020b). Lors de la cicatrisation des plaies, l'abondance de FN dans le caillot est étroitement liée au recrutement des fibroblastes (Johansson et al., 1997; Pankov & Yamada, 2002b; Veevers-Lowe et al., 2011). Ainsi la FN permet la création de voies dynamiques pour forcer les cellules à se déplacer le

long de de la MEC (Amani et al., 2019). En effet, la migration cellulaire se produit le long des substrats par la formation de nouvelles adhérences focales et la libération des anciennes. Physiologiquement, le corps humain présente des gradients de position de signaux solubles dans les tissus, qui permettent la création d'une force motrice naturelle pour diriger la migration des cellules (chimiotaxisme). Alternativement, des facteurs attachés au substrat (hap-totaxis) ou des signaux mécaniques (durotaxisme) peuvent régir la migration cellulaire (Alberts et al., 2002). Plus spécifiquement, pendant les processus de migration cellulaire, les gradients guident l'assemblage de l'actine vers le bord d'attaque de la cellule, déterminant ainsi la direction de la cellule mouvement (Alberts et al., 2002). Au niveau du front de migration, l'activation des récepteurs de surface cellulaire, c'est-à-dire des intégrines, génère l'activation des GTPases de la famille Rho et de la voie phosphatidylinositolbiphosphate (PIP2), qui à leur tour activent les WASp / Scarproteins et éventuellement le complexe Arp2 / 3 qui guider la formation de nouveaux filaments d'actine à partir des filaments préexistants (Figure 19) (Martino et al., 2009a; Parisi et al., 2020b). Ce processus conduit à la poussée de la membrane cellulaire vers l'avant. Simultanément, à l'arrière des cellules, la myosine II interagit avec les filaments d'oldactine pour améliorer la rigidité locale, empêchant l'extension latérale du Filopodia et permettant la rétraction de l'extrémité arrière (Veevers-Lowe et al., 2011). Ainsi, l'interaction de la FN avec les intégrines $\alpha5\beta1$ induit cette cascade de signalisation biologique (Veevers-Lowe et al., 2011)

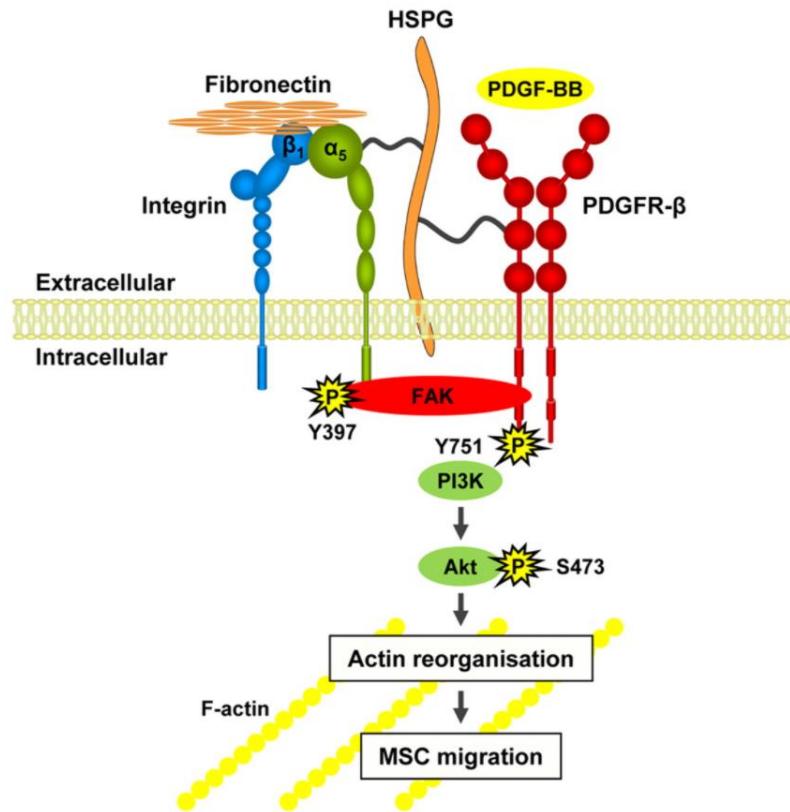


Figure 19 : La migration des CSM est régulée par la fibronectine par l'activation médiée par $\alpha 5\beta 1$ -intégrine et PDGFR- β (Veevers-Lowe et al., 2011).

Modèle schématique illustrant la connexion synergique entre l'adhérence médiée par $\alpha 5\beta 1$ -intégrine à la fibronectine et PDGFR- β , qui contrôle l'activité Akt-PI3K et la migration MSC. L'adhésion à la fibronectine favorise le regroupement et l'association des récepteurs, qui est médiée par les protéoglycane de sulfate d'héparane (HSPG), induit la phosphorylation de PDGFR- β $\alpha 5\beta 1$ -intégrine et FAK-dépendante en l'absence de facteur de croissance et potentialise fortement le PDGFR- β stimulé par PDGF-BB signalisation. La potentialisation de l'activité PI3K-Akt par diaphonie entre $\alpha 5\beta 1$ -intégrine et PDGFR- β est un événement essentiel dans la cascade qui induit la réorganisation de l'actine et la motilité cellulaire.

II.5.3. La prolifération cellulaire :

La prolifération cellulaire consiste en une croissance du nombre de cellules par la division cellulaire (Alberts et al., 2002). Dans les organismes, la prolifération cellulaire est généralement limitée aux cellules qui reconstituent les tissus. La division cellulaire se produit comme étape éventuelle du cycle cellulaire. La progression du cycle cellulaire est positivement régulée par une famille de protéines kinases appelées kinases dépendantes des cyclines (Cdks), qui activent des gènes spécifiques favorisant la croissance (cyclines) et désactivent leurs inhibiteurs de façon coordonnée dans le temps (Amani et al., 2019). Des études ont corrélé l'induction de la cycline par la signalisation de l'intégrine, en mettant en évidence que la phosphorylation dépendante de l'intégrine joue un rôle clé dans la phosphorylation de ERK et dans l'induction

de la cycline (Alberts et al., 2002; Gao et al., 2006). Ainsi, la FN est impliquée dans la stimulation de la prolifération cellulaire (Parisi et al., 2020b; Roovers et al., 1999). De plus, l'activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par la FN module la prolifération cellulaire par l'activation de la voie des MAP kinases, associée au récepteur du facteur de croissance épithélial (EGF)(Roovers & Assoian, 2000).

II.5.4. Différenciation cellulaire :

La différenciation cellulaire est le processus qui conduit une cellule à atteindre son phénotype spécifique et mature, par la signalisation d'une combinaison définie de facteurs de transcription (Alberts et al., 2002). En plus des facteurs de croissance, diverses protéines de la MEC, et notamment la FN, participent dans la régulation de la différenciation cellulaire (Amani et al., 2019). Dans ce cadre, la signalisation médiée par les intégrines est essentielle pour conduire la différenciation. Pour ne prendre qu'un exemple, l'élimination génétique des sous-unités de l'intégrine $\beta 1$ inhibe la voie de différenciation des cellules épithéliales (Alberts et al., 2002). Par conséquent, la capacité de la FN à lier plusieurs intégrines comme les intégrines $\alpha 5\beta 1$, marque son implication à guider sélectivement la différenciation des cellules et contrôler le comportement spécifique des cellules pendant leur engagement. Les travaux de Martino et al. ont montré la capacité d'un domaine FNIII9 * -10 structurellement stabilisé à favoriser la différenciation ostéogénique à la fois en environnement 2D et 3D (Martino et al., 2009a).

En conclusion, la fibronectine est une protéine clef dans le contrôle du comportement cellulaire et représente un élément essentiel dans l'adhésion, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire. Ses caractéristiques font d'elle un candidat unique pour diverses applications biomédicales et biotechnologiques notamment l'amélioration de la bio-activité des biomatériaux. D'autre part, la production de cette protéine et de ses domaines a été rapporté depuis plusieurs années et reste investigué jusqu'à présent.

II.6. Stratégies de bio activation des biomatériaux par la Fibronectine

La fibronectine est d'ores et déjà investiguée pour la bio fonctionnalisation des biomatériaux afin d'améliorer la bio intégration et l'adhésion cellulaire (Amani et al., 2019). La FN est combinée à divers matériaux synthétiques et naturels pour des applications potentielles d'ingénierie tissulaire (Amani et al., 2019; Parisi et al., 2020b). Une revue récente de C. Mas-

Moruno (2018) a discuté les stratégies de bio-fonctionnalisation de surface des biomatériaux pour la réparation osseuses et la synthèse, présentée des stratégies mimétiques d'amélioration de l'adhésion cellulaire à la surface des biomatériaux, souligne l'importance des fragments issus de la FN (Mas Moruno, 2018). En effet, la FN a été absorbée sur des échafaudages de chitosane, par exemple, et les échafaudages fibronectine / chitosane ont montré une bonne adhésion cellulaire ainsi qu'une prolifération cellulaire élevée, en raison de la présence de domaines de liaison aux cellules de la FN (Amaral et al., 2009, 2013). La FN conjuguée à des échafaudages en poly (carbonate) uréthane, a soutenu la fixation des cellules et l'infiltration des échafaudages (Khang et al., 2007a). En outre, la FN ainsi que ses domaines ont été également absorbés sur des polymères synthétiques tels que la polycaprolactone (Martino et al., 2011), l'acide poly-L-lactique, (poly (acrylate d'éthyle), poly (acrylate de méthyle et poly (acide acrylique) pour améliorer l'attachement cellulaire et la bioactivité des biomatériaux synthétiques (Khang et al., 2007a; Wu et al., 2015). Dans le tableau 6 une synthèse des stratégies de bio fonctionnalisation des biomatériaux faisant appel à la FN et ses domaines est présentée.

Tableau 6 : La fibronectine et ses domaines utilisés dans la bio activation des biomatériaux

Fibronectine et Motifs biofonctionnels issus de ses domaines	Biomatériaux fonctionnalisés	Effet biologique observé	Référence
FN (protéine native)	Matrice de collagène	Amélioration de la prolifération des ostéoblastes	(Bello et al., 2020)
FN	PCL	Amélioration de la régénération osseuse <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	(Mohamadya r-Toupanlou et al., 2017)
FN + BMP-2	PEA / adsorption passive	Amélioration de l'ostéogénèse et régénération osseuse <i>in vivo</i>	(Llopis-Hernández et al., 2016)
FN+ VEGF	PEA / adsorption	Amélioration de vascularisation <i>in vivo</i>	(Moulisová et al., 2017)
FNIII7-10	Ti+PEG	Ostéointégration améliorée de CSM <i>in vivo</i>	(Petrie et al., 2008)
FNIII9/10- BMP-2	HA (hydrogel d'acide hyaluronique)	Réponse CSM et formation osseuse améliorée <i>in vivo</i>	(Kisiel et al., 2013)

FNIII9/10 *	TCPS	Diffrenciation ostéogénique et contrôle de la réponse des CSM	(Martino et al., 2009b)
FNIII8-10 – FNIII12-14	Titane	Contrôle de la réponse des CSM	(Herranz-Diez et al., 2016)
α 2PI1-8 + FNIII9-10 + FNIII 12-14	Fbrille matrice	Augmente la réponse cellulaire et cicatrisation et la régénération ossuses <i>in vivo</i>	(Martino et al., 2011)

II.7. Production de la Fibronectine et de ces domaines fonctionnels

Dans la section précédente, nous avons évoqué le potentiel d'utilisation de protéines de la MEC, en particulier la fibronectine, pour bio-fonctionnaliser les biomatériaux afin d'avoir une meilleur bio-intégration et accélérer les processus de réparation osseuse. Néanmoins, des voies d'amélioration de ces stratégies de bio-fonctionnalisation par des protéines natives ont également été notées. Le but de cette partie est de présenter la méthode d'obtention de la fibronectine native ainsi que les problèmes liés à ces méthodes et limitant son utilisation

Extraction et purification de la FN native à partir du plasma

La fibronectine FN native est obtenue par extraction et purification à partir du plasma. Qu'il soit humain ou animal, le plasma renferme contient diverses protéines thérapeutiques dont la fibronectine (To & Midwood, 2011). La séparation de la fibronectine du reste des protéines du plasma comporte plusieurs étapes et débute par la cryo-précipitation du plasma déjà prépurifiée (précipitation au gel d'alumine et/ou à basse température) puis sa ré-solubilisation dans l'eau suivie d'une chromatographie sur une résine échangeuse d'anions (type DEAE). La matrice est dotée de propriétés de porosité et d'hydrophobicité et adsorbe le complexe facteur VIII-facteur von Willebrand et ainsi que de la fibronectine (Burnouf and et Burnouf, 2004). Ainsi, les différentes autres protéines composant le plasma peuvent être récupérées sélectivement selon un gradient croissant de force ionique du tampon d'élution. La fibronectine et le facteur VIII-facteur von Willebrand ont deux poids moléculaires différents d'où elle est séparée de l'éluant

contenant le facteur VIII-facteur von Willebrand par tamisage moléculaire via une colonne de Séphacryl® S-400 (R) (Burnouf and et Burnouf, 2004). Des transfusions de fibronectine cryoprécipitée sont utilisées pour le traitement des patients souffrant d'un trauma, d'une septicémie, ou de brûlures (Clarke and Blajchman, 2012).

Bien que l'accessibilité à la FN native semble être simple, l'utilisation de cette dernière présente plusieurs inconvénients qui sont d'ailleurs observés chez la plupart des protéines natives de la MEC :

- Stabilité : les protéines sont dégradables par voie enzymatique, ce qui réduit leur bio fonctionnalité à long terme (par exemple, courte demi-vie dans le sang) et sont très sensibles aux changements de pH, de température et de solvants (Förster et al., 2013).
- Manipulation : les protéines entières peuvent avoir une faible solubilité et sont coûteuses à extraire et à purifier en grandes quantités. De plus, leur modification à des fins de revêtement de surface, le contrôle de l'orientation / conformation lors de la liaison à la surface et la caractérisation sont une des tâches exigeantes et non contrôlées. Il a été rapporté que l'adsorption de protéines entières à la surface des matériaux peut entraîner un masquage des sites de fixation en fonction de la méthode du coating (Lewandowska et al., 1992) et un risque antigénique (Yewdell & Bennink, 2001).

II.7.1. Production des domaines de la FN par la technologie des protéines recombinantes

La fibronectine native est une protéine extraite et purifiée à partir du sang. Comme toutes protéines natives de la MEC, cette origine présente plusieurs inconvénients majeurs qui limitent son utilisation clinique (risque potentiel de transmission d'agents pathogènes, la réponse immunitaire indésirable, perte de bioactivité due aux changements conformationnels) (Huang & Chang, 2019; Liamas et al., 2018). Pour contourner ces limitations, plusieurs stratégies sont proposées. Une approche bien établie est l'utilisation de fragments de protéines recombinantes qui incluent uniquement les régions nécessaires à l'activité biologique souhaitée. Cette stratégie améliore la spécificité de la protéine d'origine, car d'autres domaines non essentiels sont délétés,

permettant une production et une manipulation plus faciles (Rahmany & Dyke, 2013; von der Mark et al., 2010). De plus, en ciblant les domaines fonctionnels des avantages sur le cout et la concentration de protéines utilisé pour le traitement de biomatériaux sont envisageables. Le groupe de Cluter et Garcia a été le pionnier de cette approche en concevant un fragment recombinant couvrant les 7e à 10e répétitions de type III de FN (FNIII7-10), qui contient le site de fixation cellulaire de la FN (Cutler & García, 2003b). Cette méthode a montré une amélioration de l'adhésion cellulaire *in vitro* et de la croissance osseuse *in vivo* dans une série d'études (Petrie et al., 2006). Plusieurs études ont investigué la production des domaines fonctionnels de la FN par la technologie recombinante le montre le tableau 7 ci-dessous :

Tableau 7 : Domaines fonctionnels de la fibronectine produites sous forme recombinants

Domaines de la FN recombinants	Fonction	Système d'expression	Reference
FNIII7-10	Adhesion cellulaire	<i>E. coli</i>	(Cutler & García, 2003b)
FNIII8-10	Adhesion cellulaire	<i>E. coli</i>	(Roy et al., 2011)
FNIII9-10	Adhesion cellulaire	<i>E. coli</i>	(Altroff et al., 2001)
FNIII10	Adhesion cellulaire	<i>E. coli</i>	(Kang & Jang, 2009b)
FNII2	Fixation collagène	<i>E. coli</i>	(Peisley and Gooley, 2007)
FNIII12-14	Fixation heparine	<i>E. coli</i>	(Kimizuka et al., 1991)
FNIII8-10_FNII1	Adhesion, prolifération et différenciation cellulaire	<i>E. coli</i>	(Roy et al., 2011)
FNIII8-10_FNIII12-14	Adhesion, prolifération et différenciation cellulaire	<i>E. coli</i>	(Roy et al., 2011)

L'intérêt pour la production des fragments de la FN sous forme recombinante découle ainsi d'un besoin de coupler la bio-fonctionnalisation des biomatériaux et d'efficacité de la stratégie d'obtention de ces fragments avec un cout coût réduit maîtrisé et une activité biologique optimisée. Plus généralement, la technologie recombinante a été rapportée en tant

que la technologie la plus performante et efficace de production des protéines thérapeutiques et a permis une avancée spectaculaire. Pour comprendre la technologie recombinante et l'intérêt crucial de son utilisation, il est nécessaire d'approfondir les mécanismes fondamentaux qui la régissent. La section suivante décrira brièvement le principe de la technologie des protéines recombinantes ainsi que les différents éléments clés de cette technologie au cœur de ce travail de thèse.

III. Technologie recombinante

Les molécules bioactives, à savoir les protéines, ont une grande complexité et une diversité presque infinie. Elles sont appliquées dans une variété d'applications thérapeutiques. Aux États-Unis et en Europe, plus de 300 médicaments à base de protéines ont été approuvés, étant les protéines recombinantes responsables de cette croissance du marché (Andersen & Krummen, 2002). Les protéines recombinantes ont fourni des avancées importantes dans la biotechnologie biomédicale en surmontant les rendements insuffisants en protéines obtenues à partir de sources naturelles (Andersen & Krummen, 2002). Pareillement à la production à l'échelle industrielle des protéines thérapeutiques, la production de protéines recombinantes est de plus en plus utilisée dans la recherche en laboratoire pour l'obtention de diverses protéines pour des études biophysiques et structurales (Vedadi et al., 2010), à des fins diagnostiques et thérapeutiques (Jozala et al., 2016), ainsi que pour des applications émergentes, telles que la bioactivation des biomatériaux présentée ci-dessus (Cheng et al., 2018b). Cette section apporte une revue générale de cette technologie et de ses acteurs clés. Dans un premier temps un point sur le principe de cette technologie est présenté puis les systèmes d'expression disponibles sont discutés. Le système de production le plus utilisé *E. coli* est détaillé par la suite avec une revue générale sur ses avantages ainsi que les différentes stratégies disponibles pour palier ses limites.

III.1. Les protéines recombinantes

Les protéines recombinantes sont obtenues par génie génétique, à savoir par la technologie de l'ADN recombinant et son expression dans des hôtes naturels de production. La croissance et la compréhension des phénomènes biologiques au cours des dernières décennies, tant au niveau moléculaire que cellulaire, sont transposées par l'aube du génie génétique et de la technologie de l'ADN recombinant. Comme le montre la figure 20, l'histoire de la technologie de l'ADN

recombinant remonte à 1966, lorsque la structure à double hélice de l'ADN a été expliquée par Watson et Crick et le code génétique a été déchiffré par Nirenberg. Par la suite, en 1970, la méthode de digestion par restriction a été inventée par Cohen et Boyer qui impliquent le copier-coller des séquences d'ADN (Ames et Martin 1964; Cohen et al. 1973). Grâce à la technologie de l'ADN recombinant, le clonage de gènes pour la production de protéine (facteurs de croissance, interféron, facteurs de coagulation sanguine, insuline humaine, protéines d'enveloppe virale, etc.) est devenu réalisable. Chaque protéine est unique dans le contexte de sa séquence ou cible. Maintenant, avec l'avènement de la technologie de l'ADN recombinant, les chercheurs peuvent exprimer un gène naturel même dans une bactérie très simple comme *E. coli* (Brown et al. 2015). La somatostatine était la première protéine humaine produite dans *E. coli* en 1977. Plus tard en 1982, la première protéine recombinante, c'est-à-dire l'insuline humaine, était disponible sur le marché.

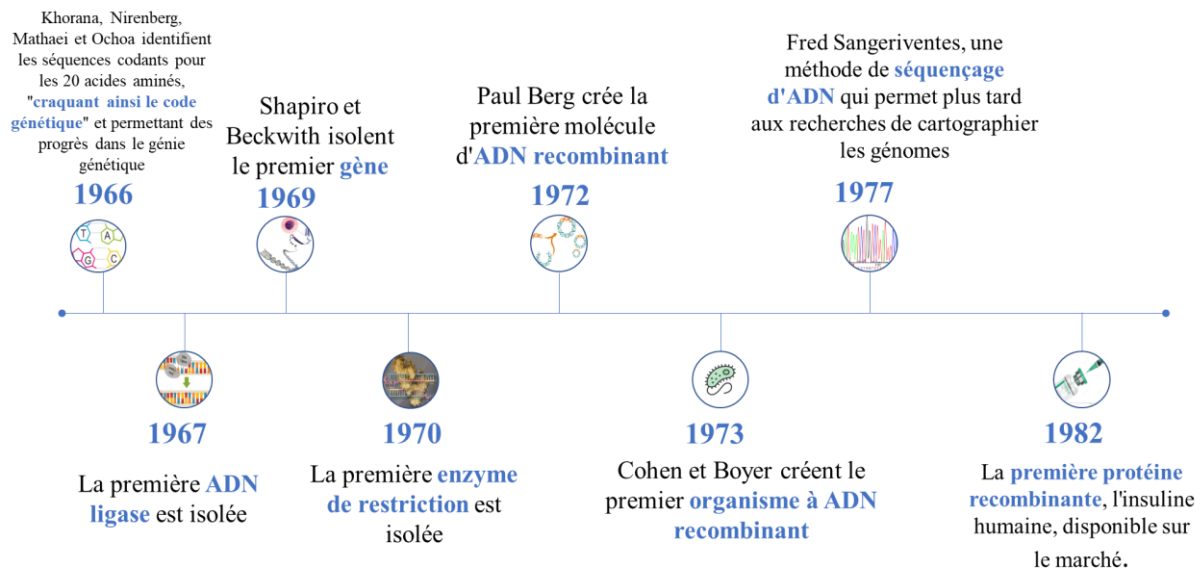


Figure 20: Les progrès de la compréhension de l'ADN ont été fondamentaux pour le développement de la technologie des protéines recombinantes

Fondamentalement, le gène, codant pour la protéine d'intérêt, est isolé et cloné dans un vecteur d'expression, des systèmes de productions sont ensuite transformés par le vecteur recombinant, et permettent la production de grandes quantités de protéines recombinantes. Les protéines recombinantes produites par le mécanisme de production naturelle de l'hôte sont ensuite extraites et purifiées (Figure 21).

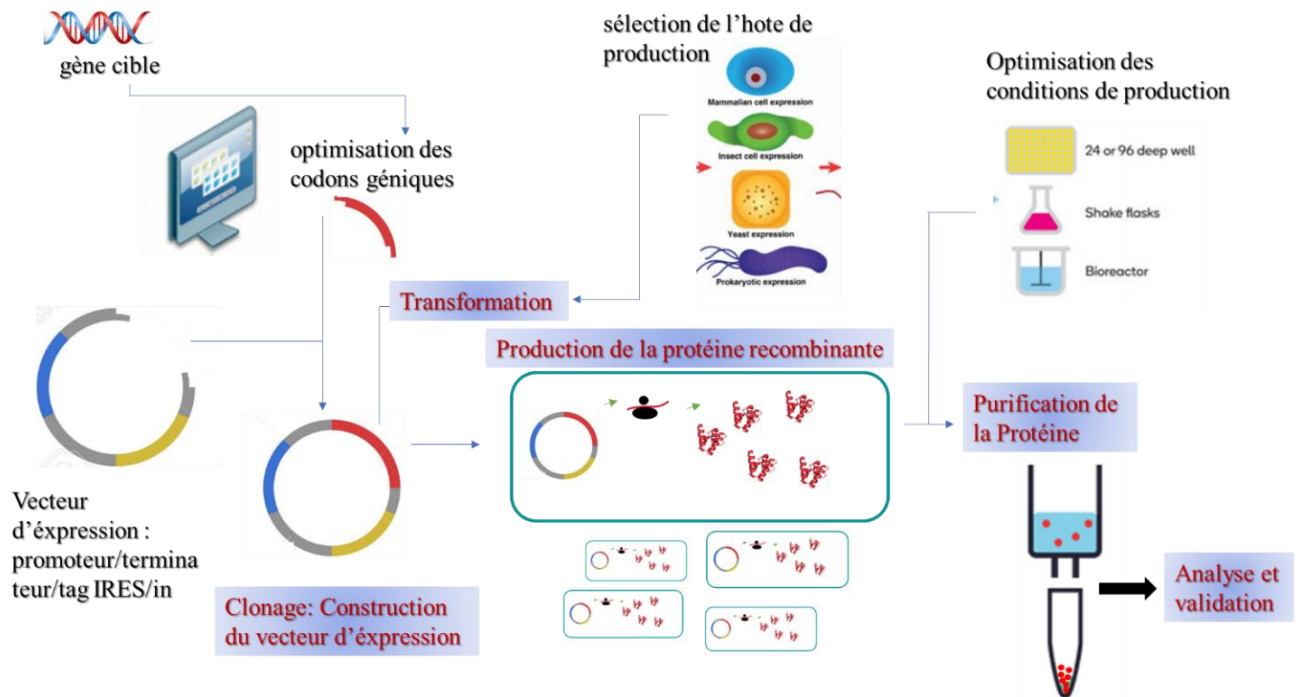


Figure 21 : Principes et étapes de la production d'une protéine recombinante

De nos jours, la production de protéines recombinantes est devenue plus efficace grâce aux efforts de recherche intensifs et aux progrès de la biotechnologie. La demande croissante de protéines recombinantes dans des applications allant de la thérapeutique (Kaur et al., 2018a) à la production de produits chimiques fins (Gundinger & Spadiut, 2017) a rendu nécessaire l'optimisation de ses divers aspects.

Plusieurs systèmes d'expression sont utilisés, à savoir des systèmes procaryotes et eucaryotes tels qu'*Escherichia coli* ou des lignées cellulaires de mammifères, respectivement, selon les caractéristiques et application prévue de la protéine recombinante (Andersen & Krummen, 2002).

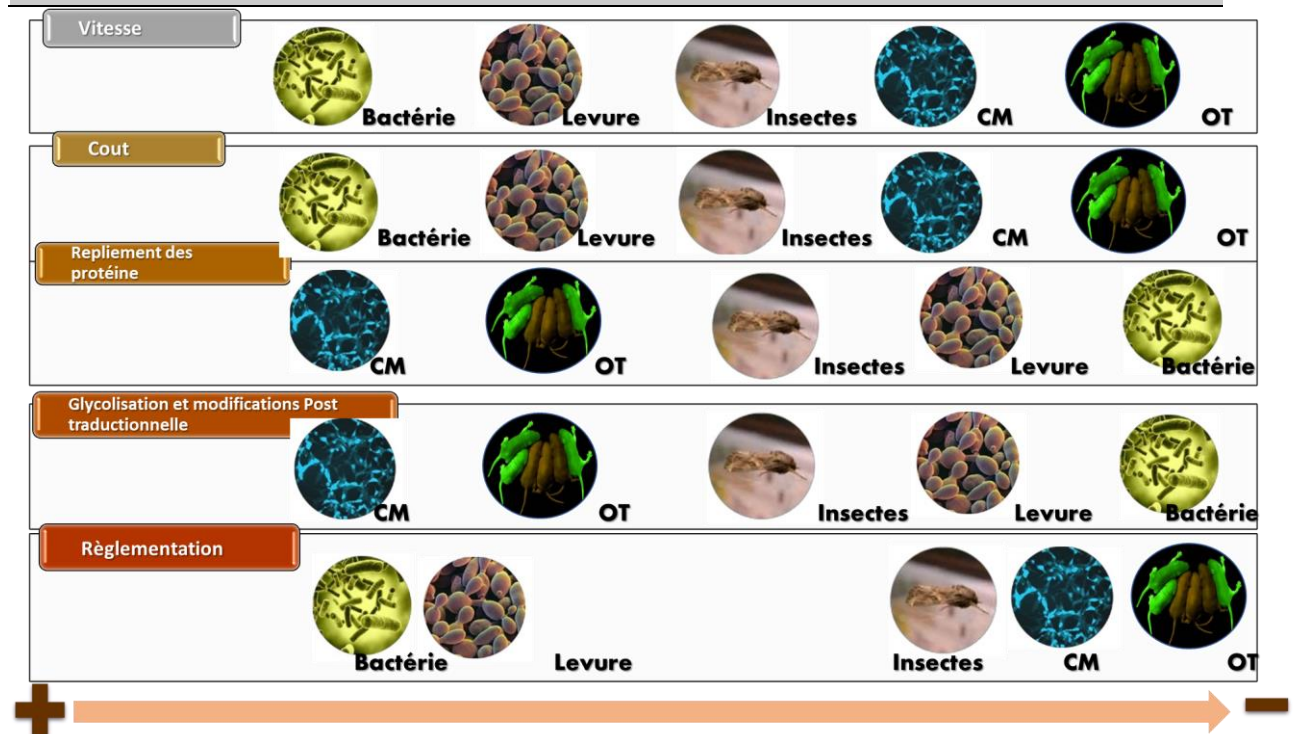
III.2. Les systèmes d'expression

Les systèmes d'expression les plus courants comprennent les hôtes bactériens, les levures, les cellules d'insectes, les cellules de mammifères et les organismes transgéniques. Chacun de ces systèmes présente des avantages et des inconvénients spécifiques (Tableau 8). Le choix du

système d'expression dépend d'un certain nombre de paramètres comprenant les propriétés physico-chimiques de la protéine cible, l'application souhaitée et le coût de production.

Tableau 8 : Plateforme des systèmes d'expression des protéines recombinantes

Système d'expression	Rendement	Post-traduction modifications	Coût de production	Vitesse de production
Bactérie	Elevé	Aucune	Faible	Elevé
Levure	Elevé	Simple	Faible	Elevé
Insectes	Modéré	Modéré	Elevé	Faible
Cellules mammaliens	Faible	Complexe	Elevé	Faible
Organismes transgéniques	Modéré	Complexe	Moyen à élevé	Faible



- **Système bactérien**

Le système d'expression bactérien représenté par *Escherichia coli* est le premier système hôte utilisé pour la production de protéines recombinantes. Les avantages les plus importants des systèmes bactériens sont la facilité de manipulation génétique, la capacité de croissance rapide dans un milieu peu coûteux et simple et le rendement d'expression élevé (Gupta & Shukla, 2016). Les inconvénients majeurs sont l'incapacité à générer des modifications post-traductionnelles (MPT) et le manque de machinerie sécrétoire efficace. Le système d'expression bactérien convient à la production de protéines simples qui n'abritent pas de MPT ou leur

activité thérapeutique ne peut pas être affectée par un manque de MPT comme la glycosylation (Demain & Vaishnav, 2009; Gupta & Shukla, 2016)

- **Levures**

Le système d'expression des levures représenté par *Saccharomyces cerevisiae* et la levure méthylothrophique telle que *Pichia pastoris* est le système de choix pour la production de protéines recombinantes ne nécessitant pas de MPT extensifs (Celik & Calik, 2012). Les levures offrent les avantages d'une culture cellulaire à haute densité et d'une production à faible coût ainsi que la possibilité de produire des sécrétions et d'effectuer des MPT simples. Cependant, le schéma de glycosylation des levures diffère considérablement de celui des cellules de mammifères. Récemment, des systèmes de levure modifiés par le glycol ont été introduits pour résoudre ce problème (Celik & Calik, 2012; Porro et al., 2005).

- **Les cellules d'insectes**

Les cellules d'insectes présentent l'avantage de réaliser des MPT qui sont plus similaires aux humains ainsi que d'avoir la capacité de production sécrétoire de protéines recombinantes tout en offrant un coût et un rendement acceptables (Kost & Kemp, 2016). Le système d'expression des cellules d'insectes est principalement basé sur des vecteurs à base de bacul virus capables d'intégrer le transgène dans le génome des cellules d'insectes. Le développement des vecteurs de bacul virus pourrait être long et laborieux (Kost & Kemp, 2016; Osz-Papai et al., 2015)

- **Les cellules mammifères**

Les cellules de mammifères sont le système d'expression le plus courant pour la production industrielle de protéines thérapeutiques recombinantes car ils offrent les MPT humains (Butler & Meneses-Acosta, 2012). Des exemples de cellules de mammifères sont les cellules CHO, BHK, HEK 293 Sp2 / 0 et NS0. Les cellules CHO étant le système le plus largement utilisé. Malgré la disponibilité de lignées cellulaires humaines telles que les cellules PerC6 et CAPT au cours des dernières années, les cellules CHO semblaient rester le principal système d'expression de sa forte acceptation par l'industrie et les autorités réglementaires. Le t-PA a été le premier médicament recombinant produit dans des cellules de mammifères en 1986 ensuite un grand nombre protéines, dont plusieurs anticorps, ont été fabriquées avec succès dans des cellules de mammifères (Butler & Meneses-Acosta, 2012).

- **Les organismes transgéniques**

Les organismes transgéniques, y compris les plantes et les animaux, peuvent être utilisés comme bioréacteurs vivants pour la production à faible coût de protéines recombinantes complexes. L'utilisation de plantes transgéniques pour produire des protéines recombinantes est appelée agriculture moléculaire. Les plantes en tant que bioréacteurs verts offrent des avantages considérables, notamment la capacité à réaliser des MPT, la simplicité de croissance et le faible coût de production. Les produits biopharmaceutiques comestibles tels que les vaccins peuvent également être produits dans des plantes transgéniques (Kk et al., 2014; M et al., 2006). Les animaux transgéniques sont des systèmes hôtes attractifs pour produire des protéines pharmaceutiques recombinantes. Plusieurs espèces animales telles que les lapins, les porcs, les moutons, les chèvres, les vaches et les vers à soie peuvent être utilisées pour la production de protéines recombinantes. La protéine thérapeutique peut être exprimée dans le lait, le sang, le blanc d'oeuf et la glande à soie. Le lait est actuellement le système le plus adopté pour produire des protéines recombinantes à partir d'animaux transgéniques (Houdebine, 2009). Les avantages des bioréacteurs animaux transgéniques sont le rendement élevé et le faible coût de production ainsi que la haute qualité des protéines. Les inconvénients de ce système peuvent être la difficulté à séparer les protéines humaines des liquides animaux, la possibilité de présence d'agents pathogènes et les effets nocifs possibles de la production de protéines exogènes sur la santé animale (Dyck et al., 2003).

Une variété de systèmes de production des protéines recombinantes sont à disposition. Le choix de système dépend de plusieurs facteurs notamment la protéine d'intérêt et la rentabilité du procédé. Le tableau ci-dessous résume les différents points discutés (Tableau 9) :

Tableau 9 : Plateformes d'expression disponibles pour la production de protéines recombinantes avec des avantages et des inconvénients potentiels (adapté de (Shanmugaraj et al., 2020, Butler & Meneses-Acosta, 2012)).

Système	Avantages	Inconvénient
Bactérie	Facile à manipuler Faible coût Expression élevée Facilité de mise à l'échelle Délai d'exécution court Établissement de procédures réglementaires et d'approbation	Repliement incorrect Manque de modifications post-traduction susceptibles d'affecter fonction de la protéine Accumulation d'endotoxines
Levures	Croissance rapide et évolutive Facile à manipuler Exigences de milieu et conditions de culture simples et peu coûteuses Modifications post-traductionnelles des protéines recombinantes	Difficulté de lyse cellulaire due aux parois cellulaires épaisses et dures Hyper glycosylation des protéines Capacité de glycosylation limitée
Insectes	Niveaux d'expression élevés Capacité à produire des protéines complexes, y compris des protéines sécrétées, membranaires et intracellulaires Repliement approprié et modifications post-traductionnelles	Coût élevé et prend du temps Exigences coûteuses en matière de milieux et de conditions de culture
Les cellules mammifères	Repliement approprié et modifications post-traductionnelles Approbation réglementaire existante	Coût de production élevé Exigences coûteuses en matière de milieux et de conditions de culture
Plantes (organisme transgénique)	Rapide Conditions de croissance optimisées Économique Modification post-traductionnelle quelque peu similaire au système mammifère	Conformité réglementaire Capacité de glycosylation limitée

Parmi ces différents hôtes utilisés pour la production de protéines recombinantes, la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) est largement connue comme un hôte préférentiel en raison de la grande disponibilité des outils génétiques, de la croissance rapide et des techniques de culture simples.

III.3. Expression des protéines recombinantes chez *E. coli*

Bien qu'une plateforme assez large de système de production des protéines recombinantes est disponible comme présenté dans la partie précédente, *Escherichia coli* est considérée comme l'un des hôtes d'expression les plus excellents pour l'expression de protéines hétérologues, car elle présente plusieurs avantages intéressants pour une rentabilité à la fois sur le plan biologique et économique en réduisant les coûts de production et améliorant le rendement. Depuis plus de deux décennies, *E. coli* reste le système d'expression le plus populaire de production des protéines recombinantes à partir non seulement des systèmes d'origines procaryotes mais aussi eucaryotes, Environ 80% des protéines avec des structures tridimensionnelles résolues soumises à la banque de données protéiques en 2003 ont été exprimées dans un système d'expression d'*E. coli* (Terpe, 2006).

Les avantages de l'utilisation d'*E. coli* comme organisme hôte sont bien connus ;

- Une cinétique de croissance rapide. En milieu glucose-sels et compte tenu des conditions environnementales optimales, son temps de doublement est d'environ 20 min (Sezonov et al., 2007). Cela signifie qu'une culture inoculée avec une dilution au 1/100 d'une culture starter saturée peut atteindre la phase stationnaire en quelques heures. Ainsi, des cultures à haute densité cellulaire sont facilement réalisées.
- Processus de fermentation simple et peu coûteux ; les milieux de croissance complexes et riches peuvent être fabriqués à partir de composants facilement disponibles et peu coûteux
- Une manipulation facile ; la transformation avec de l'ADN exogène est rapide et facile. La transformation plasmidique d'*E. coli* peut être effectuée en aussi peu que 5 min (Pope et Kent, 1996). De plus, la sélection des mutants est facile et pratique
- Sa biologie cellulaire et moléculaire est bien comprise et maîtrisée ce qui a permis un développement permanent des souches améliorées pour la production des protéines recombinantes

- Rendement d'expression des protéines recombinantes très élevées ; permet la surexpression des protéines hétérologues avec des grandes quantités.

De nos jours, de nombreuses protéines d'intérêt commercial sont produites dans *E. coli* (Gileadi, 2017). En laboratoire, la production recombinante de protéines dans *E. coli* est la méthode de choix pour les études structurales et fonctionnelles. Du clonage de gènes à la purification des protéines, les outils cellulaires et moléculaires nécessaires à toutes les étapes du processus sont largement accessibles et de nombreuses alternatives sont disponibles. Malheureusement, l'échec est envisageable lors de l'obtention d'une protéine recombinante fonctionnelle. Les problèmes de ce système d'expression sont principalement la toxicité des protéines pour l'hôte et l'agrégation dans les corps d'inclusion. Ces inconvénients réduisent l'expression de certaines protéines chez *E. coli* et peuvent aller jusqu'à l'obtention de protéines inactives (Gileadi, 2017).

III.3.1. Expression des protéines dans les corps d'inclusion

Chez *E. coli*, la surexpression (expression à haut niveau) de protéines recombinantes conduit souvent à l'accumulation d'intermédiaires de repliement agrégés insolubles dans le cytoplasme en tant que « corps d'inclusion » (Figure 22) (Fahnert et al., 2004; Gileadi, 2017). Les molécules de protéines dénaturées mal repliées dans les corps d'inclusion sont dépourvues d'activité biologique (Vallejo & Rinas, 2004). Ainsi, et pour obtenir la protéine correctement produite à partir des corps d'inclusion les molécules de protéines doivent être solubilisées et repliées à partir de ces corps d'inclusion (Mondal et al., 2013; Vallejo & Rinas, 2004). Cette stratégie fait recourir à des solvants toxiques tels que l'urée et la guanidine HCL imposant des étapes d'élimination des traces de solvant très longues (Vallejo & Rinas, 2004). De plus, la principale raison de la mauvaise récupération de la protéine active à partir des corps d'inclusion est la perte de structure secondaire et d'agrégation pendant la solubilisation et le repliement, respectivement. Ainsi, le rendement global en protéine bioactive récupérée à partir des corps d'inclusion est très faible, environ 15 à 25% de la protéine totale (Datar et al., 1993). Par conséquent, l'intérêt est toujours actuel pour des nouvelles approches qui optimisent la production de protéines recombinantes sous forme soluble chez *E. coli* (Gileadi, 2017).

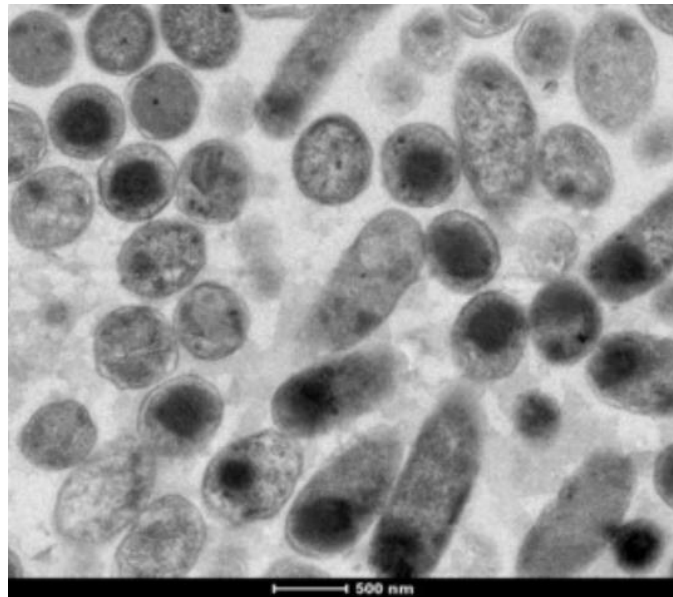


Figure 22 : Image de microscopie électronique de cellules d'*E. coli* avec des corps d'inclusion (taches sombres dans les cellules) d'Ehgartner et al.

III.3.1.1. Solubilisation des corps d'inclusion

La solubilisation des corps d'inclusion est une approche utilisée pour la récupération de la protéine d'intérêt insoluble. Les deux étapes les plus critiques dans la récupération des protéines bioactives à partir des corps d'inclusion sont la solubilisation des agrégats de protéines recombinantes et le repliement en une forme bioactive (Vallejo & Rinas, 2004). La récupération de protéines recombinantes bioactives à partir de corps d'inclusion implique quatre étapes : l'isolement des corps d'inclusion à partir d'*E. coli* par une centrifugation à grande vitesse car les corps d'inclusion sont plus denses que la plupart des composants cellulaires, ensuite la solubilisation d'agrégats de protéines semi-pures suivie par le repliement de protéines dénaturées et enfin la purification de protéines bioactives (Vallejo & Rinas, 2004). L'étape de solubilisation fait recours à des concentrations élevées (6-8 M) de réactifs chaotropiques tels que l'urée, le chlorhydrate de guanidine (Fischer et al., 1993). D'autres alternatives de déploiement incluent des détergents tels que le SDS (Puri et al., 1993), le sarkosyl (Hanagan et al., 1998; Jekabsons et al., 2002) et le pH alcalin (Patra et al., 2000). La réduction des liaisons disulfure présentes dans la protéine est généralement obtenue avec du -mercaptoéthanol ou du DTT (5-100 mM). Des agents chélateurs tels que l'EDTA sont utilisés pour empêcher l'oxydation par l'air des cystéines catalysée par un métal. Les protéines du corps d'inclusion possèdent une structure secondaire native (Vallejo & Rinas, 2004) et il est rapporté qu'elles sont utiles dans le repliement de la protéine sous une forme bioactive (Khan et al., 1998).

Récemment, des techniques de solubilisation douce sont utilisées. La solubilisation à l'aide de solvants doux restaure la structure secondaire, ce qui améliore la récupération de la protéine par rapport à la solubilisation utilisant une concentration élevée d'agent chaotropique (Tao et al., 2010). Néanmoins, la solubilisation des corps d'inclusion reste une approche très longue avec des rendements très faible de protéine actives récupérée. Afin d'éviter ces techniques, une orientation plutôt vers l'optimisation de l'expression soluble des protéines d'intérêts en réduisant la formation des corps d'inclusion chez *E. coli* existe.

Plusieurs stratégies ont été développées pour surmonter cette limitation indésirable de formation des corps d'inclusion au moment de l'expression de la protéine. Ces stratégies ciblent des paramètres environnementaux, tels que la température de culture ou la concentration d'inducteur, ainsi que des variables protéiques intrinsèques, telles que l'abondance relative des codons ou la fusion à des protéines plus solubles. La section suivante apporte une revue sur les différentes stratégies d'optimisation de la production sous forme soluble des protéines recombinantes chez *E. coli*.

III.4. Optimisation de l'expression soluble des protéines recombinantes chez *E. coli*

Parmi les différents hôtes qui sont utilisés pour la production de protéines recombinantes, la bactérie *E. coli* est largement connue comme un hôte préférentiel en raison de la grande disponibilité des outils génétiques, de la croissance rapide et des techniques de culture simples comme dit précédemment. Néanmoins, selon les propriétés de la protéine désirée, l'utilisation d'*E. coli* peut être laborieuse principalement pour la formation des corps d'inclusion. Plusieurs approches ont été développées pour éviter l'accumulation de protéines sous forme de corps d'inclusion. Des approches telles que l'optimisation des conditions de culture, la co-expression des chaperons moléculaires (Voulgaridou et al., 2013a), la diminution de température de croissance des cultures induites (Schein & Noteborn, 1988), l'utilisation de concentration d'inducteur plus faible (Huyen et al., 2014) sont investigués. De plus, plusieurs tag de fusion ont été développées pour aider à la solubilisation de protéines marquées et pour faciliter la purification des protéines recombinantes (Arnau et al., 2006). Ces stratégies sont brièvement discutées ici.

III.4.1. Utilisation des partenaires de fusion pour améliorer les rendements des protéines recombinantes

Une méthode courante pour surmonter les obstacles à l'expression consiste à utiliser une stratégie de protéine de fusion (X. Chen et al., 2013). Dans cette stratégie, une protéine ou un peptide difficile à exprimer est fusionné à une ou plusieurs partenaires de fusion pour stabiliser l'expression dans la fraction soluble et améliorer les rendements de production. En effet, les partenaires de fusion, en plus de leur rôle fondamental dans la purification, offrent plusieurs avantages pour optimiser l'expression des protéines recombinantes (Figure 23). La protéine de fusion également appelé 'tag' améliore le repliement de la protéine en favorisant l'acquisition de la structure correcte (Arnau et al., 2006; Hp et al., 2003; Kapust & Waugh, 1999). Il peut également protéger la protéine recombinante de la protéolyse intracellulaire (Jacquet et al., 1999). Outre leur rôle dans la purification, la protéine de liaison du maltose (MBP), la glutathion-S-transférase (GST), la thiorédoxine et la NusA peuvent augmenter la solubilité de la protéine recombinante dans *E. coli* (D & Dk, 2006).

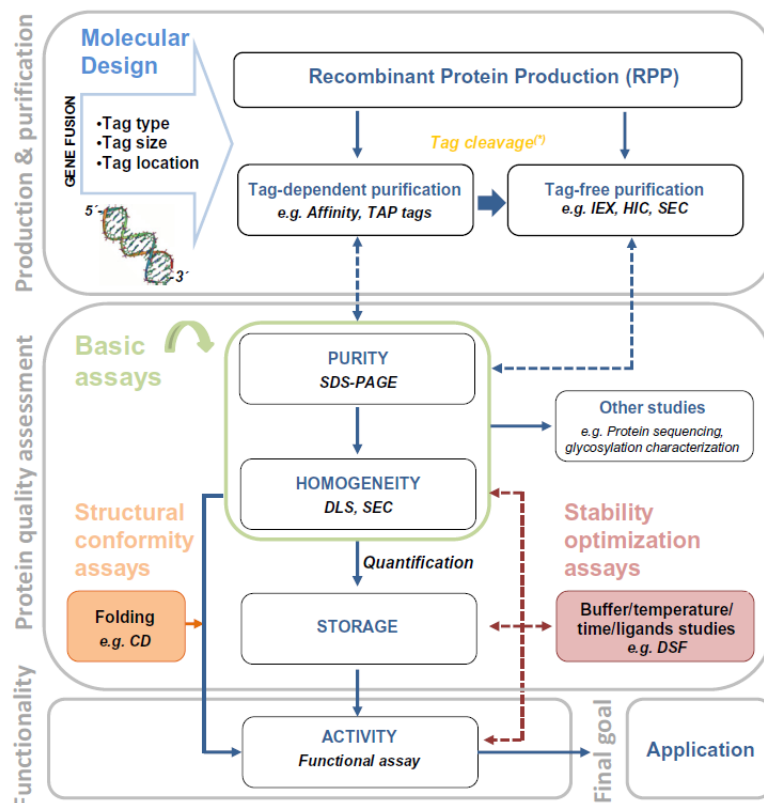


Figure 23 : Rôle de la stratégie des protéines de fusion dans les étapes de production et validation des protéines recombinantes

Ainsi, plusieurs stratégies d'amélioration de la production des protéines recombinantes en utilisant les tags de fusion ont été décrites dans la littérature (D & Dk, 2006). Des partenaires de fusion avec des rôles combinés ont été largement cités et ont amélioré l'expression soluble ainsi que la purification de plusieurs protéines recombinantes (Figure 24).

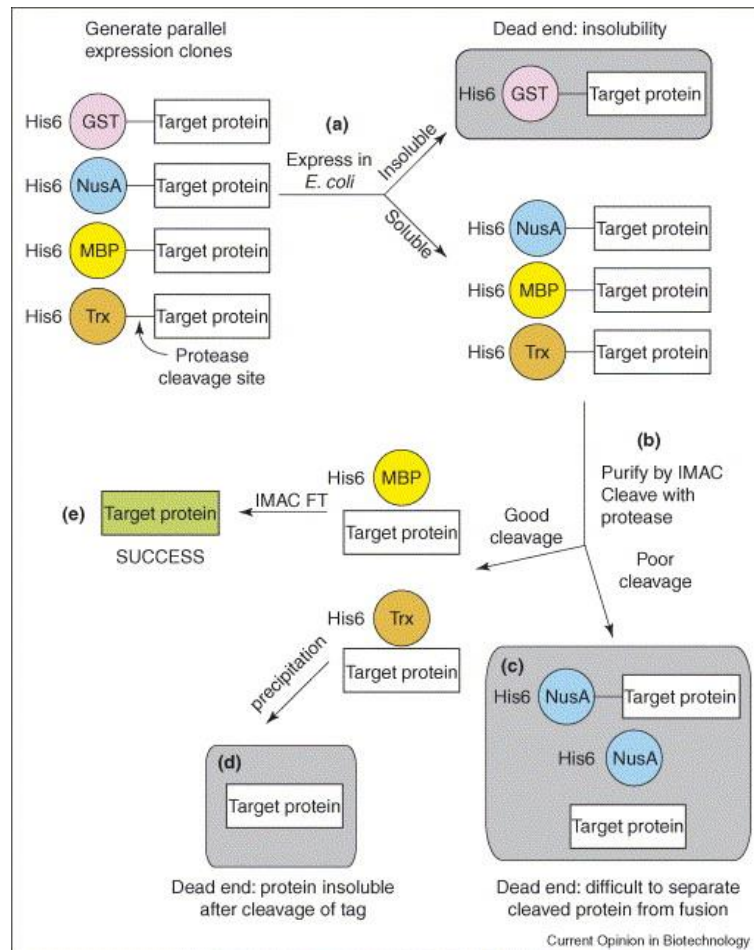


Figure 24 : Représentation schématique de la voie de l'expression des protéines à la purification à l'aide de tag de solubilité (D. Esposito et al 2006)

Ainsi, plusieurs partenaires de fusion ont été utilisés à cette fin, notamment la glutathion S-transférase (GST), la protéine de liaison au maltose (MBP), la thiorédoxine A (TrxA), le petit modificateur lié à l'ubiquitine (SUMO), la cétostéroïde isomérase (KSI), et TrpΔLE. Ces tags sont brièvement décrits dans le tableau 10 et la section suivante. De plus, l'utilisation des tags implique une étape d'élimination à la fin du procédé. Les partenaires de fusion peuvent généralement être éliminés après purification *in vitro* par des protéases spécifiques, en utilisant des sites de clivage entre le partenaire de fusion et la protéine recombinante (Hp & Kk, 2005a). Certaines de ces protéases sont brièvement discutées par la suite.

Tableau 10 : Partenaire de fusion ; tags de solubilité

Tag	Taille	Plasmide	Rôle	Reference
Glutathion transférase (GST)	S- 26 kDa	pGEX	Protège contre la protéolyse intracellulaire Stabilise les protéines en fraction soluble Aide également à la purification	(Harper & Speicher, 2011)
Maltose binding protein (MBP)	42 kDa	pMAL / pIVEX	Améliore la solubilité des protéines Retiré de la protéine recombinante Aide également à la purification	(Kapust & Waugh, 1999)
NusA (substance d'utilisation de N)	55 kDa	pET-44a-c (+), pDB. His.NusA	Ralentit la traduction et laisse plus de temps pour se replier et se produire Améliore la solubilité des protéines	(Zheng et al., 2003)
Thiorédoxine (Trx)	11 kDa	pET-32a-c (+)	Aide au repliement des protéines qui nécessitent un réduction environnement	(LaVallie et al., 2003)
Petit modificateur de type ubiquitine (SUMO)	12 kDa	pET-SUMO	Favorise le repliment et la stabilité structurelle Protéase SUMO spécifique disponible pour supprimer le tag	(Butt et al., 2005)
Isomérisation de disulfure de protéine I (DsbA)	21 kDa	pET-39	Augmente la solubilité des protéines de deux à trois fois	(Berkmen, 2012)
La protéine fluorescente verte GFP	27 kDa	pET GFP	Améliore la solubilité Utilisé pour les études de quantification et de localisation	(L. Wang et al., 2013)

III.4.1.1. Étiquettes de fusion pour l'expression soluble et la purification de protéines recombinantes

Plusieurs tags ont été développées pour aider à la solubilisation de protéines marquées et pour faciliter la purification des protéines recombinantes. Les tags plus fréquemment utilisés sont présentés dans cette section.

- **Protéine de liaison au maltose (MBP).**

La MBP est une protéine de 42 kDa codée par le gène *malE* d'*E. coli* K12. Les protéines de fusion MBP ont été utilisées pour une purification en une seule étape par chromatographie d'affinité à l'amylose réticulé (D & Dk, 2006; Kapust & Waugh, 1999). Le tag MBP peut augmenter la solubilité des protéines de fusion surexprimées (en particulier les protéines eucaryotes) chez les bactéries en montrant une activité intrinsèque chaperon (D & Dk, 2006). Cette étiquette d'affinité a été utilisée pour surmonter le problème d'expression des protéines, car les tags MBP peuvent atténuer la toxicité, améliorer le niveau d'expression et la solubilité des protéines (D & Dk, 2006).

- **Glutathion S-transférase (GST).**

La GST est un peptide, de 26 kDa de l'espèce *Schistosoma japonicum* (ver plat parasite), utilisé comme tag pour la purification de protéines de fusion. Les protéines de fusion pourraient être purifiées par chromatographie d'affinité sur glutathion immobilisé. Pour certaines protéines, la GST peut agir comme un tag de solubilité (Harper & Speicher, 2011; Hp & Kk, 2005a). Le GST-tag stabilise la protéine recombinante en protégeant contre la protéolyse intracellulaire. Cependant, la GST est considérée comme un faible améliorateur de solubilité car certaines protéines de fusion GST sont totalement ou partiellement insolubles (Gupta & Shukla, 2016). Le marqueur GST peut être facilement détecté à l'aide d'un test enzymatique ou d'un test immunologique (Harper & Speicher, 2011).

- **Petit modificateur de type ubiquitine (SUMO).**

SUMO est un peptide (~ 11 kDa) trouvé dans la levure (un seul gène codant pour Smt3) et les vertébrés (trois gènes codant pour SUMO-1, SUMO-2 et SUMO3) (Butt et al., 2005). Il a été rapporté qu'il améliore la stabilité et la solubilité des protéines fusionnées en N-terminale (Gupta & Shukla, 2016). L'ubiquitine est la protéine de repliement la plus rapide de la nature et SUMO présente également une structure soluble et se repliant rapidement (Martín-Villanueva et al., 2021). Contrairement à GST et MBP, SUMO n'est pas un tag de purification, le His6 en

fusion avec le tag SUMO a été établi pour faciliter la purification des protéines de fusion taguées SUMO (Butt et al., 2005). Le tag SUMO peut être retiré après purification en utilisant la SUMO protéase qui reconnaît spécifiquement la structure SUMO (Butt et al., 2005).

- **Thiorédoxine A (TrxA).**

Les thiorédoxines sont des oxydoréductases universelles qui réduisent les liaisons disulfures par échange de thio-disulfure. L'une des thiorédoxines d' *E. coli* , la TrxA, est une protéine de 11,6 kDa facilement surexprimée (jusqu'à 40% de la protéine cellulaire totale) et soluble et est très utilisée comme tag de solubilité afin d'éviter la formation de corps d'inclusion lors de la production de protéines recombinantes (LaVallie et al., 2003). TrxA n'a pas de propriétés d'affinité, ce qui nécessite un tag de purification supplémentaire pour la purification des protéines telle que l'étiquette 6 Histidines (LaVallie et al., 2003).

- **NusA**

NusA (55 kDa) est une protéine de terminaison / anti-terminaison de la transcription qui favorise / empêche la pause de l'ARN polymérase lorsqu'elle agit seule ou lorsqu'elle est incluse dans le complexe anti-terminaison, respectivement (Kaur et al., 2018a; Zheng et al., 2003). NusA est un tag de solubilité très performant et a montré une meilleure solubilisation des protéines recombinantes par rapport aux tags de solubilité couramment utilisés (tel que MBP) . Il a souvent été utilisé en combinaison avec d'autres tags d'affinité telles que His-tag (Gupta & Shukla, 2016; Zheng et al., 2003).

- **Protéine disulfure isomérase I (DsbA)**

La protéine disulfure isomérase I (DsbA) est une protéine de 21,1 kDa qui catalyse la formation de liaisons disulfure dans *E. coli* (Berkmen, 2012; Fischer et al., 1993). Lorsqu'il est fusionné à des protéines eucaryotes, un mutant inactif de DsbA dépourvu de la séquence signal périplasmique s'est avéré favoriser l'expression soluble de protéines dans le cytoplasme d'*E. coli* (Gupta & Shukla, 2016). De plus, une comparaison des protéines de fusion DsbA et thiorédoxine a montré que la DsbA augmente la solubilité des protéines de fusion de deux à trois fois par rapport à la thiorédoxine (D & Dk, 2006). Les vecteurs pET-39 et pET-40 disponibles permettent l'expression de DsbA et DsbC, respectivement, dans l'environnement non réducteur du périplasma d'*E. coli* , ce qui peut entraîner une solubilité et un repliement améliorés de la protéine d'intérêt (Berkmen, 2012; Kaur et al., 2018a)

Ainsi, l'utilisation des tags de solubilité est une stratégie permettant d'améliorer la stabilité et la solubilité des protéines d'intérêts. Outre que la solubilité, les partenaires de fusion sont largement utilisés pour la purification des protéines recombinantes. Les marqueurs d'affinité sont utilisés pour la purification en une seule étape de la protéine recombinante à partir des protéines endogènes totales des cellules hôtes.

- **Poly His pour la purification des protéines**

L'étiquette poly (His) est une étiquette de protéine largement utilisée qui se lie à des matrices métalliques. Le nombre de résidus d'histidine varie de 3 à 10 dans le tag polyhistidine (Gileadi, 2017). Le 6 × His-tag offre plusieurs avantages tels que la petite taille (0,84 kDa) qui interfère rarement avec la structure et la fonction des protéines, l'absence de charge électrique, de faibles niveaux de toxicité et d'immunogénicité, utilisation dans des conditions natives et dénaturantes (Bornhorst & Falke, 2000a). La protéine cible peut être élue dans des conditions douces par compétition à l'imidazole. Pour purifier les protéines taguées polyHis, la chromatographie d'affinité des métaux immobilisés (IMAC) est utilisée en fonction de l'interaction entre les ions His chargés négativement et les ions de métaux de transition (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) immobilisés sur une matrice (Bornhorst & Falke, 2000a).

- **Tag SBP ; streptavidin binding protein**

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

III.4.1.2. Elimination des tags par les protéases ; Protéases courantes

L'élimination des protéines de fusion et des étiquettes d'affinité est souvent nécessaire lorsque la présence de l'étiquette de fusion affecte la structure ou la fonction biologique de la protéine d'intérêt. Pour atteindre cet objectif, des séquences spécifiques sont incluses entre le ou les marqueurs et la protéine native, puis coupées avec des protéases spécifiques au site. Les

protéases courantes comprennent l'entérokinase, le facteur Xa, la protéase SUMO, la TEV protéase et la thrombine (Gupta & Shukla, 2016; Kaur et al., 2018a). Les protéases peuvent cliver les protéines de fusion à des sites non spécifiques et les conditions de tampon qui favorisent l'activité et la spécificité de la protéase peuvent ne pas convenir à la protéine de fusion et à la solubilité du produit (Gupta & Shukla, 2016). Il convient de noter que l'efficacité de clivage de la protéase peut varier de manière imprévisible avec chaque protéine de fusion. L'efficacité de clivage peut être améliorée en appliquant une concentration élevée de la protéase ou en prolongeant la digestion. Dans certains cas, le site de clivage est stériquement entravé et des améliorations peuvent résulter de l'inclusion d'acides aminés supplémentaires qui flanquent le site de clivage (Gupta & Shukla, 2016; Kaur et al., 2018a).

❖ Entérokinase

L'entérokinase est une protéase qui reconnaît le site DDDDK ^ X et clive au niveau de la carboxyl lysine avec une efficacité variable qui dépendent de l'acide aminé en position X. Par exemple, l'efficacité de clivage de l'entérokinase variait de 61% pour la proline à 88% pour l'alanine en position X (S. Kim & Lee, 2008).

❖ Facteur Xa

Le facteur Xa est une protéase qui reconnaît I (E / D) GR ^ X, où X peut être n'importe quel acide aminé sauf l'arginine ou la proline (Kaur et al., 2018a), et clive après la carboxyl-arginine. Une protéolyse inefficace et non spécifique a été rapportée pour le facteur Xa (Marblestone et al., 2006). Le facteur Xa est constitué de deux chaînes liées par un disulfure de 27 et 16 kDa; par conséquent, l'activité du facteur Xa peut diminuer dans les tampons avec des agents réducteurs.

❖ Protéase SUMO

La protéase SUMO (*S. cerevisiae* Ulp1) reconnaît la structure tertiaire de SUMO et clive à l'extrémité N-terminale de la protéine fusionnée quelle que soit la séquence à la seule exception étant la proline (Marblestone et al., 2006). La protéase SUMO clive efficacement dans une diversité de conditions tampons, pH (5,5–10,5) et températures (4–37 ° C). En outre, il a été démontré que la SUMO protéase clive efficacement les protéines de fusion dans l'urée à 2 M sans produire de produits de clivage non spécifiques (Marblestone et al., 2006), ce qui peut faciliter la purification des protéines taguées SUMO produites dans les corps d'inclusion.

❖ TEV protéase

La TEV protéase (protease from tobacco etch virus) reconnaît la séquence ENLYFQ[^]S et clive entre la glutamine et la sérine (Kaur et al., 2018a; Miladi et al., 2011). La TEV protéase est hautement spécifique, active sur une variété de substrats et clive efficacement à basse température (Kaur et al., 2018a; Miladi et al., 2011). Un avantage distinct de la TEV protéase par rapport aux autres (Young et al., 2012a) a été mis au point afin d'exprimer et de purifier l'enzyme (Miladi et al., 2011). Des mutations stabilisatrices ont amélioré l'activité de la TEV protéase et les rendements d'expression (Kaur et al., 2018a).

❖ Thrombine

La thrombine est une protéase qui reconnaît LVPR[^]GS et clive entre l'arginine et la glycine (D & Dk, 2006). Bien que le clivage de la thrombine au niveau de la séquence désignée soit relativement spécifique, il y a eu des clivages de la thrombine sur d'autres sites non spécifiques (Kaur et al., 2018a). De plus, les impuretés dans les préparations commerciales de thrombine, ont conduit à des produits de clivage non spécifiques mais les méthodes de purification modernes ont amélioré la pureté de la thrombine (Kimple et al., 2013). Sa stabilité à plusieurs détergents a été rapportée, ce qui lui permet de jouer un rôle spécifique dans la préparation de protéines membranaires pour la caractérisation structurale (Young et al., 2012b).

III.4.2. L'optimisation des conditions de production

Outre que les partenaires de fusion mentionnés, l'optimisation des conditions de production et d'induction (température, inducteur, composants du milieu et additifs) ont été utilisées pour stimuler l'efficacité de l'expression soluble des protéines recombinantes chez *E. coli*. Ainsi, les principales approches récentes couvertes dans la présente partie fournissent des solutions pour l'expression de diverses protéines recombinantes à un niveau soluble souhaité.

III.4.2.1. Température d'induction :

Pendant la production, la température d'induction est un facteur majeur qui affecte la croissance cellulaire, l'expression des protéines recombinantes, et leur repliement. Généralement, l'expression d'une protéine recombinante induit une charge métabolique sur l'hôte et il y a accumulation de protéines cibles dans les corps d'inclusion (Kaur et al., 2018a; Voulgaridou et

al., 2013a). L'agrégation dans des corps d'inclusion est en général favorisée à des températures plus élevées, en raison de la forte dépendance à la température des interactions hydrophobes qui déterminent la réaction d'agrégation (de Groot & Ventura, 2006a). La culture à faible température est une technique bien connue pour éviter ou limiter l'agrégation de protéines recombinantes (Kaur et al., 2018a). En utilisant cette stratégie, la solubilité a été améliorée pour plusieurs protéines, y compris l'interféron -2 humain, la subtilisine E, les fragments Fab, la -lactamase et la kanamycine nucléotidyltransférase (Rosano et al., 2019). De plus, Il a été rapporté dans plusieurs études l'efficacité de la combinaison de la stratégie de tag de solubilisation discuté dans la partie précédente et la diminution de température d'induction (Kaur et al., 2018a; Rosano et al., 2019). Par exemple la progestérone 5-réductase a été exprimée en fusion avec le tag MBP. Son expression a été analysée à différentes températures d'induction ; Le rendement en protéines solubles le plus élevé a été obtenu à 15 ° C et 4 ° C pendant 18 h et 72 h d'incubation, respectivement (Kaur et al., 2018a). Pareillement, ALDH3A1 a été exprimé à des rendements élevés lorsque l'induction a eu lieu à 37 ° C mais la solubilité était extrêmement faible. Lorsque la température de culture a été abaissée à 25 ° C pendant l'induction, la solubilité de l'ALDH3A1 a été significativement améliorée en passant de 2,5% à 37 ° C à 35,5% à 25 ° (Voulgaridou et al., 2013b). Les conditions d'expression de TB10.4 en fusion avec Trx ont été optimisées (Gutiérrez-González et al., 2019) et il a été observé qu'une température plus basse après induction (croissance des cellules pendant 16 h à 18 ° C après addition d'IPTG) augmentait significativement la production de protéine sous forme soluble. Huyen et al., 2015 ont exprimé l'antigène flagellaire FljB de *S. typhimurium* Chez *E. coli* BL21 (Huyen et al., 2014). La protéine a été exprimée en fusion avec Trx, appelée TrxFljB. Ils ont démontré que des températures plus basses utilisées pendant la phase d'induction augmentaient la solubilité du TrxFljB. À 25 ° C, environ 97% de TrxFljB était soluble. Par conséquent, différentes températures de fermentation ont souvent été évaluées pour maintenir un équilibre entre la croissance cellulaire et la production de protéines extracellulaires. Plusieurs études ont révélé que l'induction de températures comprises entre 20 et 25 ° C produisait de meilleurs résultats (Chen et al. 2013; Krause et al. 2016).

III.4.2.2. Concentration d'inducteur

Le système d'expression basé sur le promoteur T7 utilisant l'IPTG comme inducteur a été largement utilisé pour la production de protéines hétérologues dans *E. coli*. L'effet de l'inducteur dans la formation des corps d'inclusion est le plus souvent associé à des systèmes de promoteurs

fortement induits (Malakar & Venkatesh, 2012). Une faible concentration d'inducteur peut entraîner une induction inefficace, tandis qu'une concentration d'inducteur en excès peut entraîner des effets toxiques, comme une croissance cellulaire réduite ou une concentration de protéines recombinantes moins élevée (Malakar & Venkatesh, 2012). Une concentration plus élevée d'inducteur pourrait également conduire à une accumulation de protéine recombinante dans les corps d'inclusion, car le taux de synthèse des protéines dépassait la machinerie de repliement (Kaur et al., 2018a). Ainsi, la concentration de l'inducteur doit être optimisée pour une expression efficace des protéines recombinantes. Ramirez et al. 1994 ont observé que la concentration d'IPTG entre 0 et 1 mM n'affectait pas le taux de croissance spécifique d'*E. coli* (Ramírez et al., 1994). Une quantité élevée d'inducteur dans le milieu conduit à l'expression d'une grande quantité de protéine recombinante, induisant des corps d'inclusion. Garcia-Fraga et al., 2015 ont démontré que des concentrations plus faibles d'IPTG résultent l'activité enzymatique la plus élevée pour HsChiA1p (0,5 mM IPTG) et PtChi19p (0,25 mM), alors que des concentrations d'inducteur très faibles et plus élevées peuvent entraîner une induction inefficace et une diminution de l'activité des protéines, respectivement (García-Fraga et al., 2015). Dans une autre étude, Huyen et al., 2015 ont constaté que l'IPTG est inversement proportionnel à la productivité de TrxFIjB, car l'augmentation de la concentration d'IPTG entraîne une diminution de la productivité de TrxFIjB et une concentration d'IPTG de 0,05 mM était optimale pour une expression efficace de TrxFIjB (Huyen et al., 2014).

III.4.2.3. Compositions du milieu de culture

❖ Milieu commun

Le milieu couramment utilisé en laboratoire pour la culture d'*E. coli* comprend le milieu Luria – Bertani minimal (LB), le milieu riche en nutriments comme le milieu de bouillon tryptone (TB), le milieu Super Broth (SB) et le bouillon Super Optimal (SANGLOT). Bien qu'il s'agisse d'un milieu riche, le milieu LB ne peut soutenir la croissance cellulaire que jusqu'à une densité relativement faible de 1,0 à 3,0, en raison de la réduction des quantités de glucides (et d'autres sources de carbone utilisables) et de cations bivalents ainsi que de la croissance cellulaire (Studier 2005). Les milieux TB, SB et SOB offrent un meilleur choix que le LB pour atteindre des densités cellulaires plus élevées (Rosano et Ceccarelli 2014; Studier 2005), ce qui se traduit par une production totale de protéines plus élevées. Par exemple, les effets de différents milieux sur la production de DPE extracellulaire d'*E. coli* recombinante hébergeant pET22b (+) / pelB-

DPE (D-Psicose-3-épimérase) ont été dosés; les résultats ont montré que l'activité du DPE extracellulaire dans le milieu TB était légèrement supérieure à celle des milieux SB et SOB, qui présentaient une amélioration de 2,78 fois par rapport à celle du milieu LB (Gu et al. 2013).

❖ Milieu d'auto-induction

Une avancée majeure est venue avec le développement du milieu d'auto-induction, qui a résolu de nombreux problèmes liés à l'induction des protéines recombinantes (Studier, 2005). Dans le milieu auto induit, la source de carbone est un mélange de glucose, de glycérol et de lactose (Figure 25).

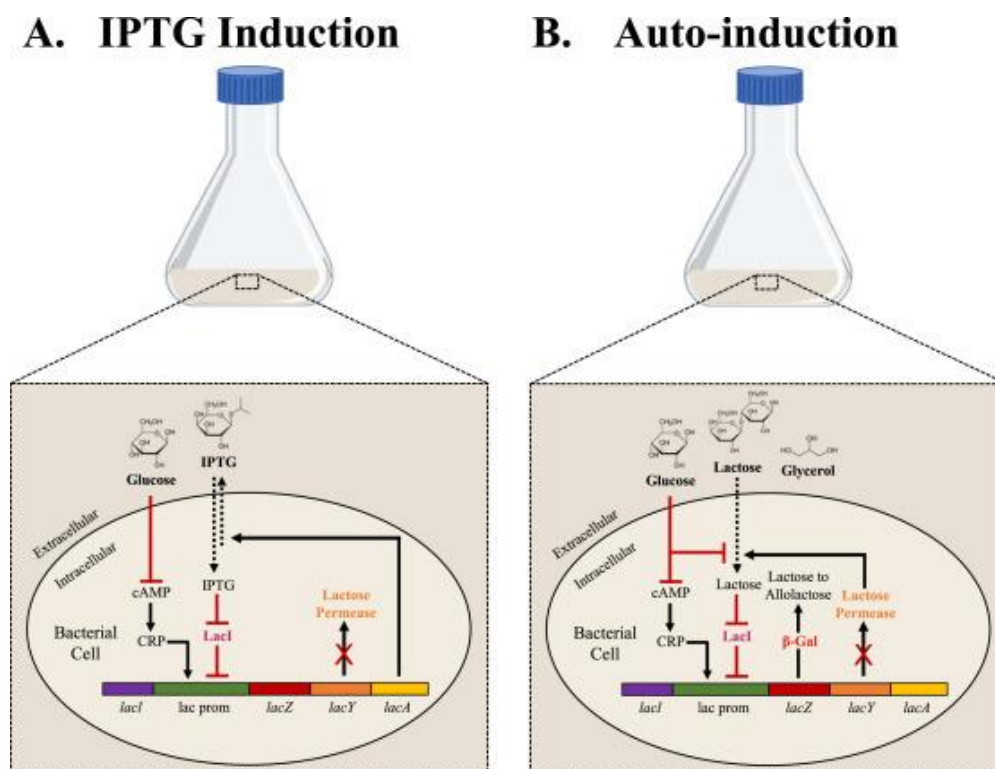


Figure 25 : Comparaison de la stratégie d'auto-induction avec l'induction à l'IPTG

Pendant la croissance, *E. coli* métabolise d'abord le glucose et ensuite le lactose. Lorsque le glucose est disponible dans l'environnement, il empêche l'absorption du lactose et l'expression de protéines recombinantes ne sera pas induite. Une fois que le glucose est épuisé au milieu de la phase stationnaire, le lactose est transporté dans les cellules en tant que source en carbone et induit l'expression de protéines recombinantes (Studier, 2005). De plus, les milieux d'auto-induction peuvent produire un rendement beaucoup plus élevé de protéines cibles et de biomasse que les procédures conventionnelles, ils sont de plus en plus largement utilisés. Nadkarni et al., La densité cellulaire et le fragment d'anticorps recombinant de souris (rFab)

atteignaient respectivement 8,72 et 12 mg L⁻¹ en milieu d'auto-induction, ce qui était trois fois plus élevé que celui du milieu défini avec glucose / IPTG (Nadkarni et al., 2007).

En conclusion, cette section a décrit les stratégies qui augmentent la solubilité d'une protéine d'intérêt et il devrait être clair qu'il n'y a pas de solution universelle pour atteindre cet objectif. Souvent, une analyse parallèle et combinée de différentes stratégies doit être menée afin de définir les conditions optimales d'expression soluble.

Problématique et objectifs

Les biomatériaux ont certainement contribué à l'amélioration de la qualité de vie de la population en apportant des solutions cliniques assez intéressantes et en participant dans le développement des stratégies d'ingénierie tissulaire. Malgré les avancées significatives observées dans le domaine des biomatériaux, plusieurs limites restent encore à surmonter. Un exemple concret est le traitement des maladies de l'os, qui augmentent considérablement avec l'augmentation de l'espérance de vie. La réparation des défauts osseux reste l'un des sujets les plus difficiles à traiter en clinique. Plusieurs efforts sont déployés afin de répondre au besoin urgent et croissant en stratégies d'amélioration des substituts osseux et des biomatériaux disponibles permettant de surmonter les limites de la greffe osseuse (bio disponibilité, rejet immunitaire, problème inflammatoire ..). Des techniques de fonctionnalisation de la surface des biomatériaux ont été rapportées dans ce contexte et ont montré une amélioration significative des propriétés structurales et fonctionnelles de ces derniers. Parmi ces techniques, la bio ingénierie des motifs biomimétiques est apparue comme une approche prometteuse pour améliorer les propriétés biologiques des biomatériaux. Développer des fragments bio fonctionnels délivrant des signaux spécifiques, qui dirigent la fonction cellulaire, en particulier l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines, semble être une approche efficace dans la bio-fonctionnalisation des biomatériaux. La fibronectine humaine, est une protéine adhésive majeure de la matrice extracellulaire. Sa capacité à moduler les interactions entre les cellules et la MEC a été largement reportée et différents domaines fonctionnels impliqués dans ces interactions ont été décrits. Une stratégie efficace de l'obtention de ces domaines fonctionnels est la technologie de l'ADN recombinant offrant plusieurs avantages notamment de ciblage des sites fonctionnels et de rendement de production.

Dans ce contexte, l'objectif de ces travaux de thèse consiste à développer des fragments bio-fonctionnels issue des domaines de la Fibronectine humaine pour la bio activation des biomatériaux. Notre approche repose sur le développement d'un biomatériau bio-fonctionnalisé par des chimères protéiques issus des domaines fonctionnels de la fibronectine humaine en fonction de leurs affinités au récepteur transmembranaire cellulaire et des éléments cible de la MEC afin d'augmenter le potentiel bio adhésif et la bio-intégration des biomatériaux.

Les travaux présentés dans la suite de ce manuscrit se sont structurés comme suit :

- Une synthèse des matériels et méthodes utilisés dans ces travaux a été présentée dans un premier temps
- L'optimisation de l'expression sous forme soluble du domaine bio adhésif de la FN (domaine 9 et 10 III) a été rapporté
- Le développement d'un échafaudage bio adhésif par bio-fonctionnalisation de sa surface par le fragments produit (FNIII9/10) a été par la suite décrit
- Le développement de nouvelles chimères protéiques mimétiques de la FN a été finalement présenté

Chapitre II

Matériels et méthodes

IV. Introduction

Ce chapitre présente l'ensemble des matériels et méthodes utilisées se référant aux différents chapitres suivants. Nous exposant tout d'abord les matériels biologiques ainsi que les biomatériaux utilisés dans cette étude. Les différentes méthodes sont séparées et suivent chacune l'ordre d'apparition dans les chapitres des résultats suivants auxquelles elles se réfèrent. Chaque section porte sur des aspects différents mené tout au long de ces travaux et fournis le principe ainsi que les protocoles utilisés dans chaque partie.

V. Matériels

V.1. Matériels biologiques :

V.1.1.Vecteurs

V.1.1.1. Vecteur de clonage pCR®2.1- TA Cloning ® Kit

Le plasmide pCR®2.1 (Invitrogen) est utilisé principalement dans le clonage des chimères protéiques dans les étapes de sous-clonage des inserts (fragments de Fibronectine humaine). Le TA Cloning ® Kit de PCR ® 2.1 est un moyen rapide pour la stratégie de clonage permettant le TA cloning par l'insertion directe d'un produit PCR dans un vecteur plasmidique en une seule étape. Dans ce modèle (Figure 26), le dernier cycle d'amplification des fragments est réalisé par la Taq polymérase possédant une activité qui ajoute une désoxyadénosine (A) aux extrémités 3' des produits de PCR (produit A sortant) . Le vecteur linéarisé présent dans ce kit, dispose de résidus simples 3' désoxythimidines (T) (T sortant). Cela permet la ligation de l'insert, en une seule étape, par complémentarité de nucléotide Thymine et Adénine (A=T) dans le vecteur pCR®2.1.

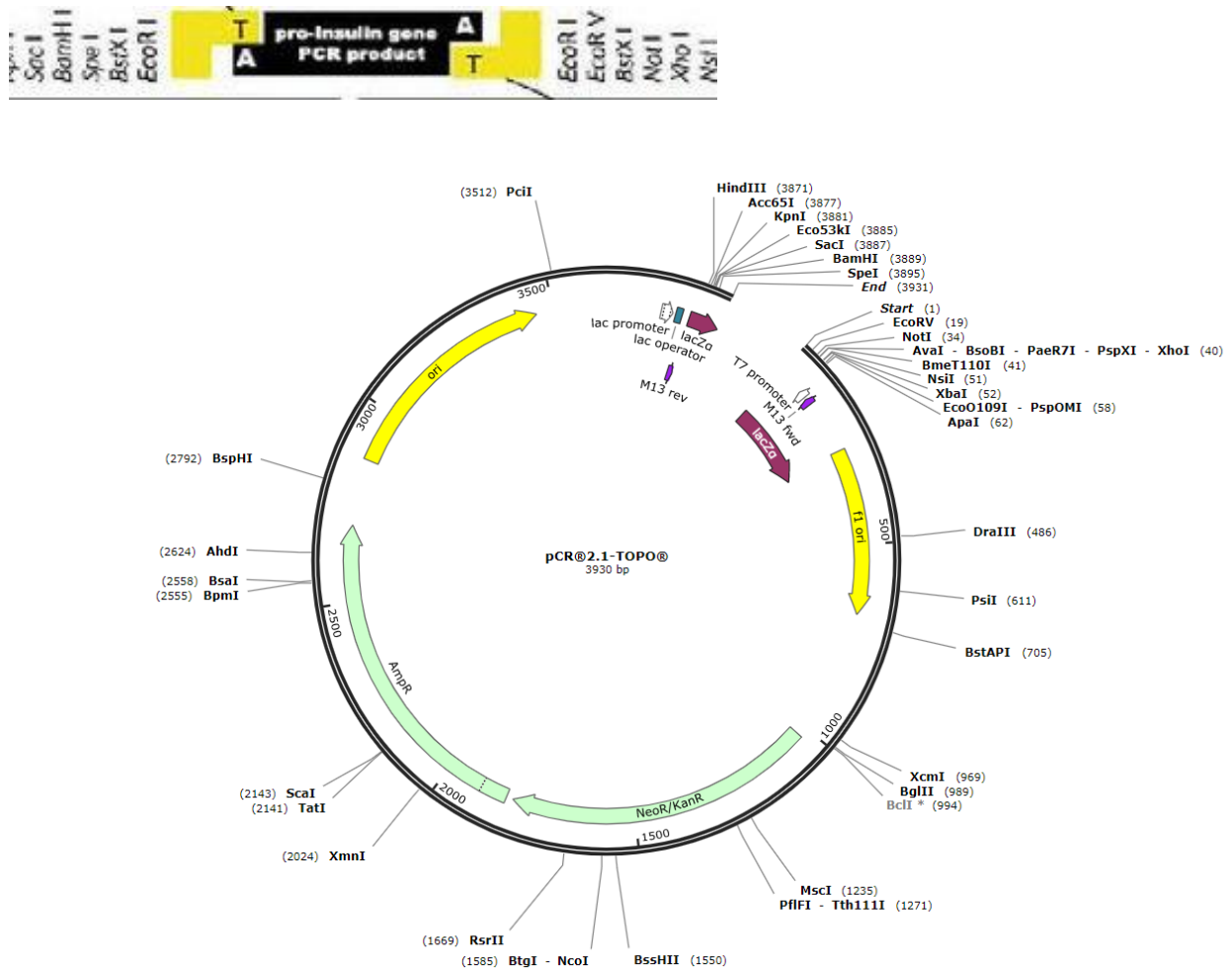


Figure 26 : Carte du vecteur pCR2.1

Amp-R : résistance à l'ampicilline ; *KanR* : résistance à la Kanamycine ; *LacZ α* : Le fragment *LacZ α* de la β-galactosidase ; *ORI*: origine de répliation *E. coli* high copy ; *fl ORI*: origine de répliation du bactériophage *φ1*

V.1.1.2. Vecteur pEBI

Le vecteur pEBI est conçu à partir du vecteur pET 15b en modifiant les partenaires de fusion de ce dernier par l'ajout le partenaire de fusion Colored MultiAffinity Tag 'CMAT' développé dans notre laboratoire (Figure 27) . L'insertion d'une cassette multitags CMAT : colored multi affinity tags composée de deux tags de purification : le tag histidine HIS et le tag Streptavidine binding protéine SBP et un marqueur de coloration le cytochrome b5 suivie d'une séquence de clivage de la TEV protéase , reporté dans nos anciens travaux (Miladi et al., 2013), dans le plasmide pET15b est réalisé à l'extrémité 3' de la séquence operateur . Le schéma ci-dessous présente le vecteur d'expression pEBI (Figure 27). pEBI est utilisé dans cette étude pour l'expression du fragment FNIII9/10 en fusion avec la cassette. Il possède une origine de répliation *E. coli* et le gène de résistance à l'ampicilline. L'expression de protéines d'intérêt est

sous le contrôle du promoteur du bactériophage T7 et opérateur de l'opéron lactose. Le T7 promoteur est activé par l'ARN polymérase T7 dont le gène est présent sur le chromosome bactérien des souches d'*E.colis utilisés* et dont l'expression est sous le contrôle du promoteur lacUV5, inductible par l'IPTG.

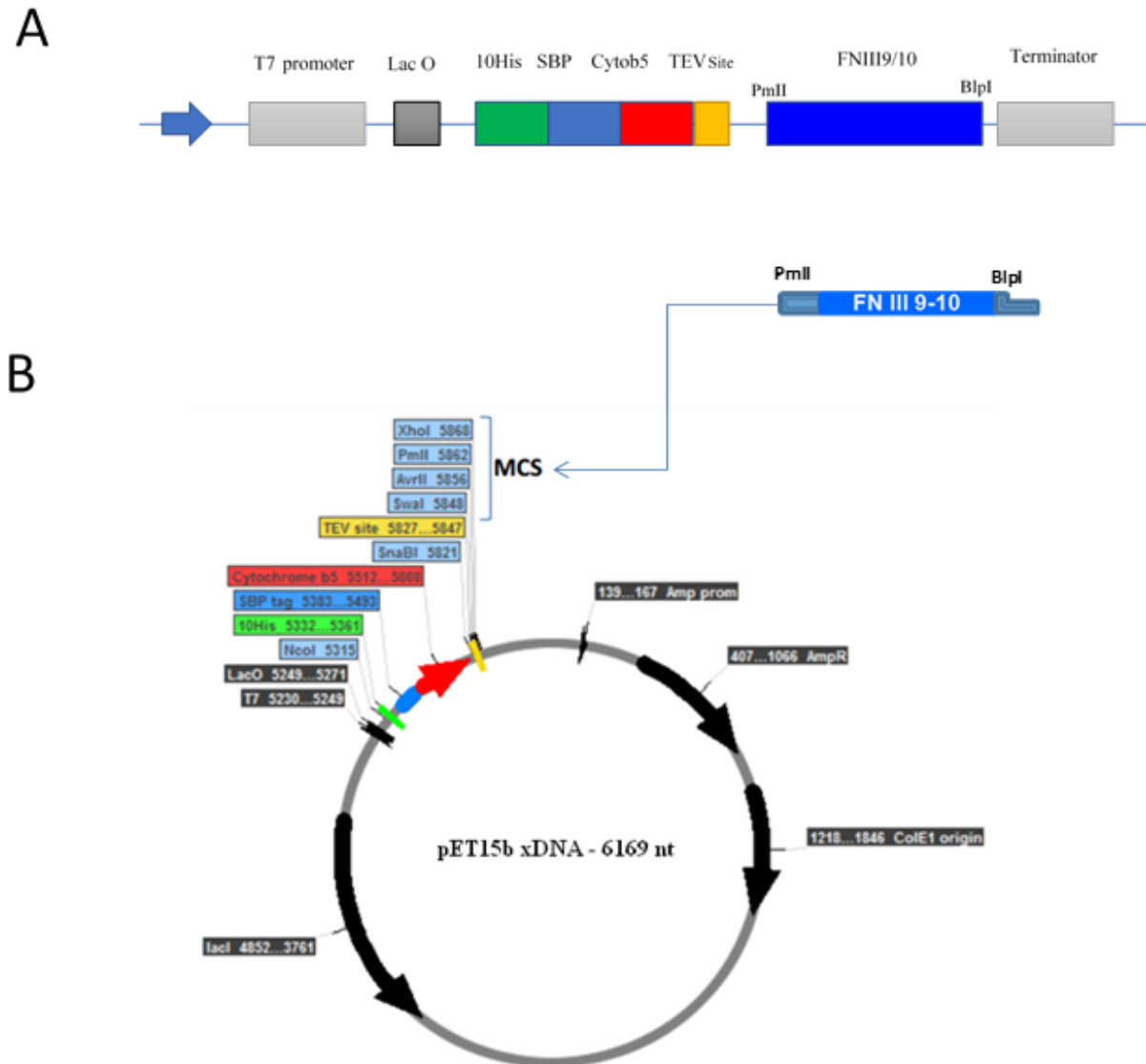


Figure 27 : Carte du vecteur d'expression pEBI

(A) *pET15b + CMAT-FNIII9 / 10*; (B) Conception schématique du fragment cloné: le gène *rFNIII9 / 10* était sous le promoteur *t7* et le contrôle *lac O* pour une surexpression inductible, et en fusion avec *CMAT*, contenant les étiquettes *His* et *SBP* pour la purification des protéines, *cyto b5* pour le suivi coloré de l'expression

V.1.1.3. Vecteur pET SUMO Champion™

Le vecteur d'expression pET SUMO Champion™ permet une surexpression des protéines d'intérêt sous forme solubles dans *E. coli*. Il contient un partenaire de fusion de type

modificateur lié à l'ubiquitine (Small Ubiquitin-like modifier: SUMO), appartenant à la famille des protéines liées à l'ubiquitine. Il a été démontré que le tag SUMO en tant que partenaire de fusion N-terminal améliore la production de protéines recombinante dans les systèmes d'expression procaryotes et eucaryotes, par une stabilité et solubilité des protéines significativement améliorées (Figure 28). Après l'expression et la purification de la protéine de fusion, le SUMO-tag peut être clivé par la protéase hautement spécifique SUMO protéase générant la protéine native. Le système d'expression pET SUMO Champion™ offre une solubilité améliorée grâce au tag SUMO N-terminale, élimine le risque de digestion interne de la protéine d'intérêt, quelle que soit sa séquence d'acides aminés par une stabilité accrue avec la fusion SUMO et un clivage hautement spécifique pour la récupération de la protéine dépourvu du tag. Le vecteur est linéarisé et T sortant ce qui permet le TA clonage en une seule étape. L'expression de la protéine d'intérêt est sous contrôle T7lac et en fusion avec 6xHis tag pour sa détection et sa purification .



Figure 28: Carte du vecteur pET SUMO Champion™

L'antibiotique de sélection est le Kanamycine ; pBR322 ori : origine de répllication (Champion™ PET SUMO

Expression System, n.d.)

V.1.2.Souches bactériennes

Les fragments recombinant produits dans cette étude sont exprimés dans le système procaryotes *E. coli*. Plusieurs souches bactériennes de *E. coli* sont utilisé pour le clonage et de l'expression des fragments de la fibronectine humaine. Le tableau ci-dessous décrit le génotype de chaque souche ainsi que leur source :

Tableau 11: Génotypes des souches bactériennes utilisées

Souche de <i>E. coli</i>	Génotype	Source
TOP 10F'	<i>F'</i> (<i>lacIq Tn10 (TetR) mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) Ø80lacZ M15 lacX74 recA1 deoR araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	novagen
BL21 (DE3) pLysS	<i>E. coli</i> str. B F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB⁻ mB⁻) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>] [<i>malB</i>]^{K-12}(λ^S) pLysS[<i>T7p20 ori_{p15A}</i>])(Cm^R)</i>	Institut curie
BL21 STAR RARE	<i>F- ompT lon hsdSB (rB- mB-) gal dcm rne131 (DE3) pRARE2 (CamR)</i>	Institut curie
BL21 pso DsbC	<i>F' lac, pro, lacIq / Δ(ara-leu)7697 araD139 fhuA2 lacZ::T7 gene1 Δ(phoA)Pvull phoR ahpC* galE (or U) galK λatt::pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, lacIq) ΔtrxB rpsL150(StrR) Δgor Δ(malF)3</i>	Institut curie
KRX	[<i>F'</i> , <i>traD36, ΔompP, proA+B+, lacIq, Δ(lacZ)M15] ΔompT, endA1, recA1, gyrA96 (Nalr), thi-1, hsdR17 (rk-, mk+), e14- (McrA-), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), Δ(rhaBAD)::T7 RNA polymerase.</i>	promega

V.1.2.1. *E. coli* TOP 10F'

La souche TOP 10F' de la bactéries *E. coli* (Invitrogen) est utilisée utilisées pour le clonage. Ces bactéries offrent l'avantage de sélectionner les colonies après la transformation grâce à la coloration blanc / bleu (pour les plasmides comportant le gène Lac Z).

V.1.2.2. *E. coli* KRX

La souche *E. coli* KRX est utilisée pour les tests d'optimisation de la production des fragments recombinant de la fibronectine humaine. Elle contient un gène codant pour la T7 ARN polymérase, contrôlé par un promoteur inductible par le rhamnose (Figure 29). Cette souche d'expression peut être utilisée comme souche de clonage et permet le test de screening blanc/bleu. D'autre part, elle donne une expression pré-inductionnelle plus faible que les autres souches d'*E. coli* et une expression post-inductionnelle plus élevée.

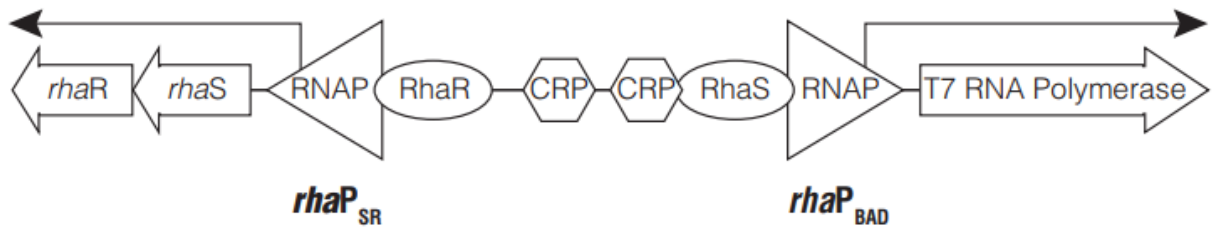


Figure 29 : Mécanisme de contrôle du système pET dans la souche KRX

V.1.2.3. *E. coli* BL21 pLysS

Au cours de ce travail, nous avons également utilisé la souche *E. coli* BL21 (DE3) pLysS comme souche d'expression afin de définir les conditions optimales de l'expression des différents fragments recombinant étudiés. La souche BL21 pLysS le prophage λ DE3 contenant un gène de l'ARN polymérase du bactériophage T7. Ce gène est contrôlé par le promoteur lacUV5 inductible par IPTG.

E. coli BL21 (DE3) pLysS contient aussi le plasmide pLysS intégrant un gène de résistance au chloramphénicol permettant la sélection de bactéries transformées. Ce plasmide code aussi pour une protéine bi-fonctionnelle : le lysozyme. Cette dernière se fixe sur l'ARN polymérase et inhibe la transcription du gène d'intérêt. En effet, la quantité de protéine produite sera plus faible, ce qui est intéressant pour l'inhibition de la production des protéines toxiques pour la bactérie (Figure 30).

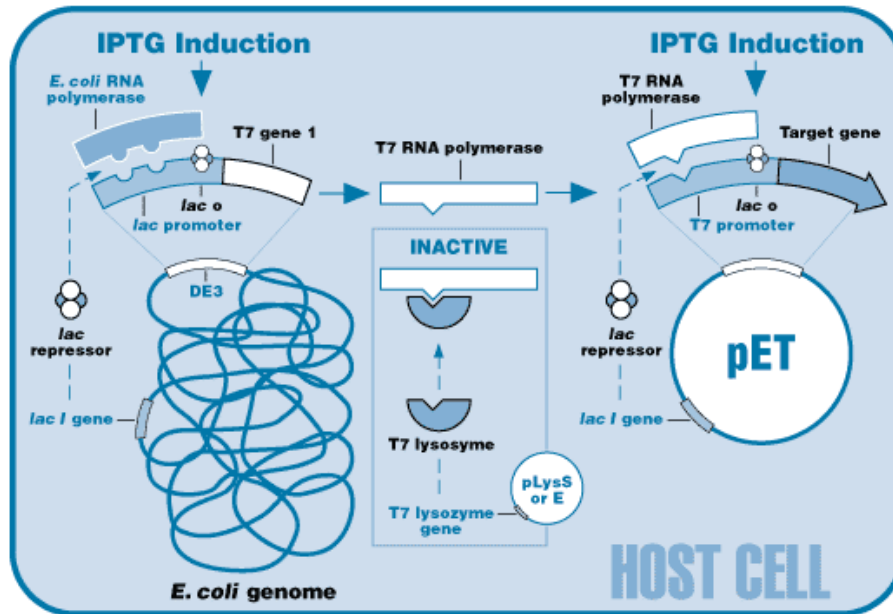


Figure 30 : Mécanisme de contrôle du système pET dans la souche BL21 pLysS

V.1.2.4. *E. coli* BL21 DsbC

La souche BL21 DsbC contient un vecteur d'expression contenant un poly nucléotide recombinant codant pour la DsbC (enzyme disulfure band) qui est une isomérase de liaison disulfure procaryotique ce qui permet le repliement des protéines dans une conformation correcte et active (Figure 31)

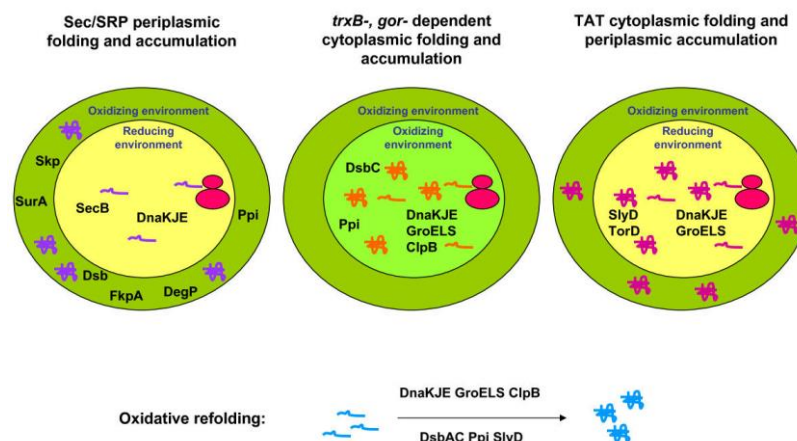


Figure 31 Refolding dans le compartiment cytoplasmique chez la souche BL21 DsbC

V.1.2.5. *E. coli* BL21 pRARE

La souche BL21 pRARE contient un plasmide pRARE qui apporte sept codons d'ARNt rares pour les bactéries (les codons AGA, AGG et CGA d'arginine rare, le codon GGA de glycine, le codon d'isoleucine AUA, le codon de leucine CUA et le codon de proline CCC). Cette souche

était conçu pour améliorer l'expression de nombreuses protéines recombinantes humaines dans *E.coli* (Figure 32).

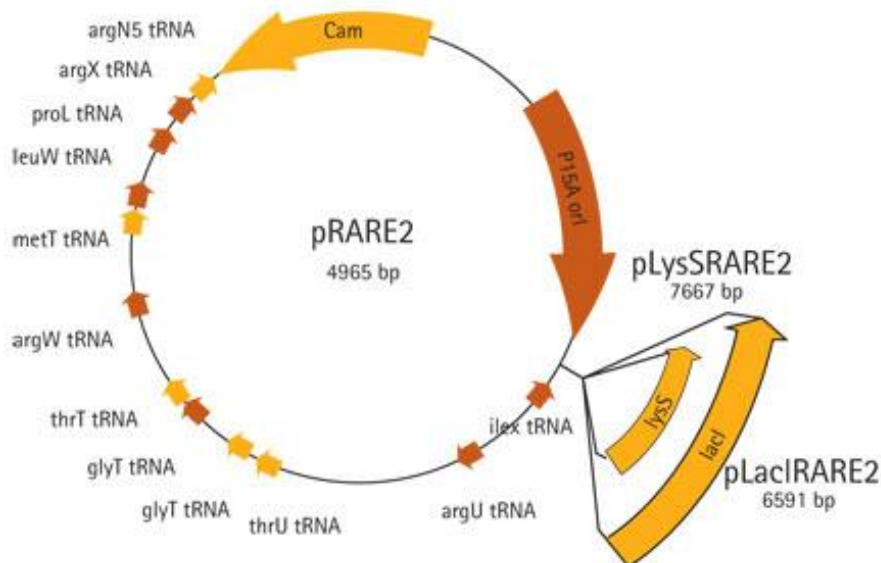


Figure 32 : Carte de restriction du plasmide pRARE

Le vecteur pRARE contient les codons AGA, AGG et CGA d'arginine rare, le codon GGA de glycine, le codon d'isoleucine AUA, le codon de leucine CUA et le codon de proline CCC

V.1.3. Cellules humaines :

Les cellules utilisées pour l'étude *in vitro* de l'activité biologique des fragments de la fibronectine humaine produites, plus particulièrement l'adhésion et la prolifération cellulaire, sont les fibroblastes gingivales humaines (HGF) : Ce sont des cellules primaires humaines extraites de tissus gingivales humains sains selon le protocole approuvé par le comité d'éthique pour la protection des patients des hôpitaux. Ces cellules ont été obtenues par biopsie de la gencive avec consentement des patients. Ces cellules sont utilisées en raison de leur origine humaine et leur disponibilité dans notre laboratoire. De plus les tests de validation biologique menés dans notre étude à savoir l'adhésion et la prolifération cellulaire font intervenir la même famille de récepteurs transmembranaires cellulaires étudiés que les ostéocytes et les CSMs (voir tableau 4 chapitre 1 ; Section II.4.1 p 49).

V.2. Biomatériaux :

V.2.1. L'échafaudage Poly-Caprolactone Uréthane PCLU :

Le biomatériau utilisé dans cette étude est le poly-caprolactone uréthane (PCLU) (Figure 33).

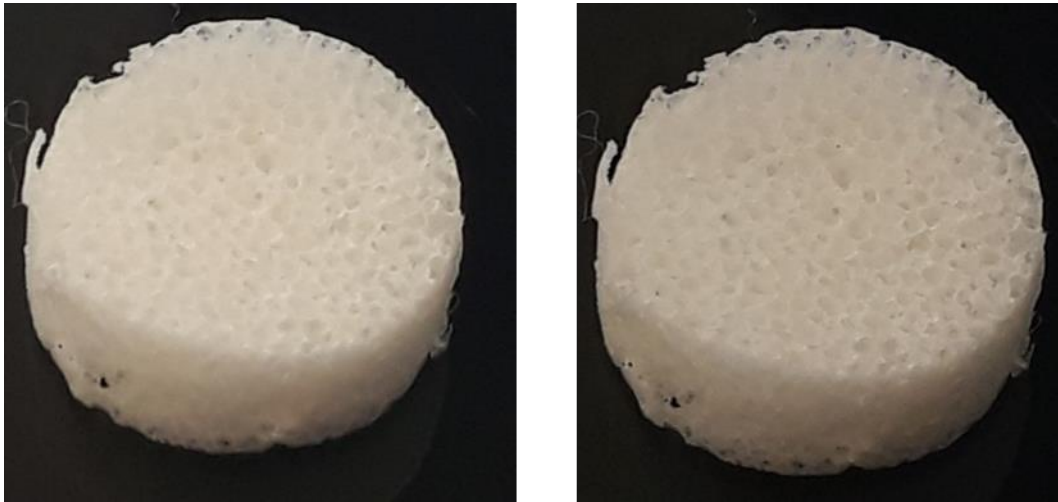


Figure 33 : Photos des disques de poly-caprolactone uréthane (PCLU)

Les échafaudages à base de polyester polycaprolactone sont des candidats dans l'ingénierie du tissu osseux en raison de leur biocompatibilité, biodégradabilité, disponibilité facile et leur rentabilité. Récemment, des échafaudages à base poly-uréthane occupent de plus en plus une place importante dans l'ingénierie tissulaire car le caractère élastomère offre une alternative aux échafaudages thermoplastiques rigides conventionnels puisque l'inadéquation des modules d'Young est réduite et le matériau est capable de restaurer de grandes déformations mécaniques. Des échafaudages élastomères à base (poly-caprolactone uréthane (PCLU) biodégradables, développé au sein du laboratoire URB2i, possèdent les caractéristiques mécaniques et biologique requises pour l'ingénierie des tissus osseux. De plus, leur comportement élastomère et leur porosité adéquates sont mis à profit dans cette étude (Changotade et al., 2015; Rohman et al., 2019). Les échafaudages élastomères à base de poly (ϵ -caprolactone uréthane) réticulé (PLCU) sont obtenus grâce au procédé HIPE (High Internal Phase Emulsion) et le procédé de de synthèse a été décrit dans les travaux de Rohman G. et al. (2019) (Rohman et al., 2019). Le tableau 12 résume les propriétés du PCLU utilisées :

Tableau 12 : Caractéristiques de PCLU utilisé (Changotade et al., 2015; Rohman et al., 2019)

<i>Procédé de synthèse</i>	HIPE
<i>Composition</i>	% C = 71.2 ± 0.6 wt.%, % O = 28.8 ± 0.6 wt.%
<i>Densité</i>	0.14 g/ cm ²
<i>Porosité</i>	85,1 % - 86 %
<i>Description des pores</i>	Interconnectés et multi-échelles

<i>Taille des pores</i>	600 à 1800 μm (pores larges) 150 μm (pores petites)
<i>Epaisseur des parois</i>	104 \pm 28 μm
<i>Module élastique</i>	161 \pm 14 kPa

V.2.2.L'os xénogénique

L'os xénogénique Laddec® fabriqué par la société Ost Développement est un substitut osseux commercialisé issu d'os de bovin décellularisé. C'est un biomatériau d'origine naturelle. La structure Laddec® (Figure 34).



Figure 34 : Photo de morceau de Laddec®

La structure Laddec®, une xéno greffe bovine hautement purifiée, est une matrice de collagène similaire à la structure osseuse humaine. Il est composé essentiellement de 90% de collagène. Ce matériau a été utilisé dans l'étude de l'activité biologique des chimères protéiques possédant le domaine d'interaction avec le collagène.

VI. Méthodes :

VI.1. Production de fragment FNIII9/10 :

Le fragment FNIII9/10 issu des domaines 9 et 10 de la fibronectine humaine est exprimés dans le système bactérien *E.coli*. Le schéma ci-dessous (Figure 34) résume la démarche expérimentale. Le vecteur recombinant pEBI présentant l'insert codant pour les domaines 9 et 10 de la fibronectine a été préparé précédemment dans notre laboratoire. Les bactéries de production sont transformées par le vecteur pEBI contenant la séquence d'ADN d'intérêt, puis les souches transformées sont sélectionnées et cultivées dans le milieu de croissance pour atteindre une croissance bactérienne exponentielle ensuite l'induction de l'expression du gène est réalisée. Les protéines produites sont extraites par lyse enzymatique ensuite doublement purifiées sur les colonnes d'affinités. L'analyse des différentes étapes d'extraction et purification est réalisée par l'électrophorèse dénaturante SDS PAGE.

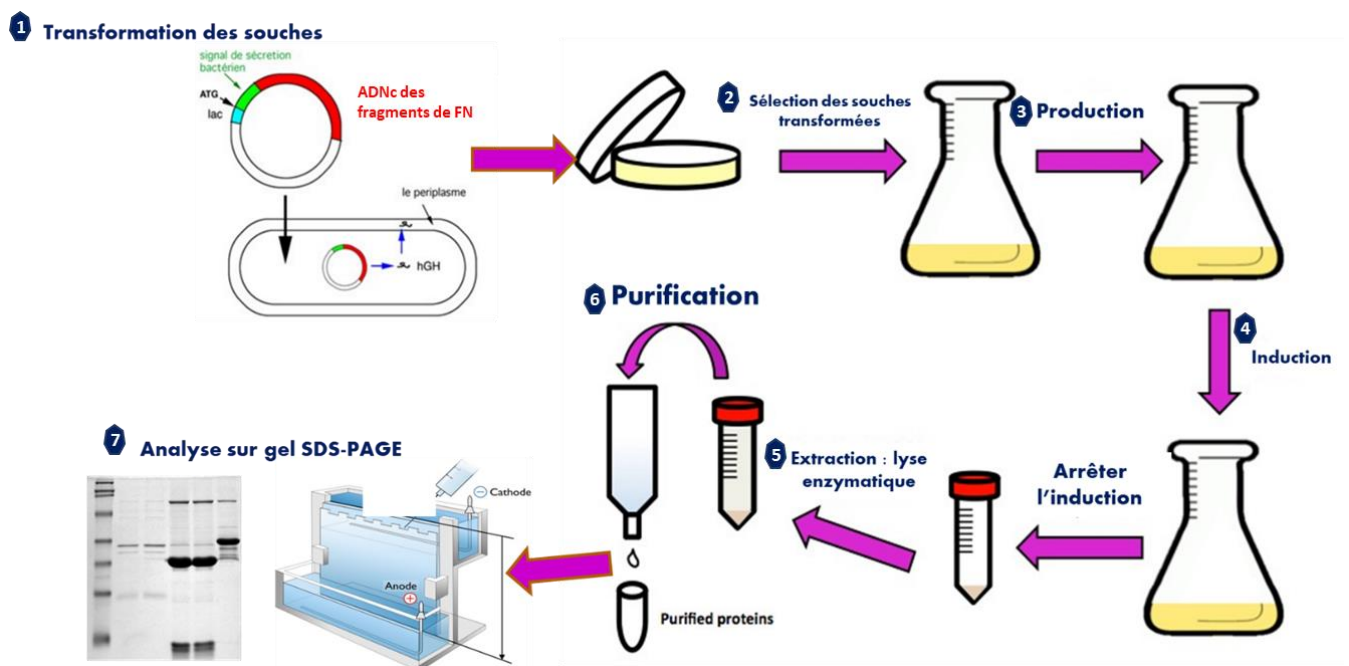


Figure 35: Schéma synthétique des étapes de production des protéines recombinantes issues des domaines de la FN

VI.1.1.Expression du fragment FNIII9/10

VI.1.1.1. Transformation des bactéries compétente par le vecteur pEBI-FNIII9/19

La transformation des souches compétente est réalisée par choc thermique. Le plasmide, de l'ADN chargé négativement, est attiré par les cations divalents présent sur la membrane bactérienne. Le choc thermique fragilise la membrane et permet la pénétration de l'ADN. 50 ng de vecteur recombinant sont mis en contact avec les bactéries compétentes décongelées lentement dans la glace. Le mélange est incubé pendant 30 minutes dans la glace. Pour le choc thermique, les bactéries sont incubées 90 secondes à 42°C puis placées dans la glace pendant 5 minutes. Le milieu de culture est ensuite ajouté (500 µL) et les bactéries sont incubées à 37°C pendant 45 minutes sous agitation. Afin de sélectionner les souches transformées, les bactéries sont étalées sur milieu LB-agar additionné de 100 µg/mL d'ampicilline, et incubées à 37°C durant 16 heures.

VI.1.2.Optimisation de l'expression du fragment FNIII9/10 sous forme soluble chez *E. coli*

Dans le but de définir les conditions optimales d'expression sous forme soluble du fragment bio adhésive issu du domaine 9 et 10 de la FN humaine, une étude d'optimisation combinée a été réalisée. L'effet des souches d'*E. coli*, la température d'induction, concentration l'inducteur et les milieux de culture a été investigué.

VI.1.2.1. Design des expériences d'optimisation :

➤ Conception d'expériences

Le but des expériences (Tableau 13) est d'identifier des niveaux optimaux de conditions de production pour une expression soluble élevée de rFNIII9 / 10 dans *E. coli*. À cette fin, différents facteurs ont été évalués à plusieurs niveaux (tableau 13, Figure 36). Des expériences ont été réalisées avec quatre souches à des paramètres différents à des niveaux mixtes et la combinaison de ces facteurs conduit à un processus trop optimisé pour la production de rFNIII9/10.

Tableau 13: Paramètres de l'étude d'optimisation de la production de FNIII9/10

Paramètres	Niveaux		
Température	18 °C	25°C	37°C
Concentration de l'IPTG	0,5 mM	1 mM	0,1mM
Souches de <i>E. coli</i>	BL21 (DE3) pLysS	BL21 (DE3) STAR pRARE	BL21 (DE3) DsbC KRX
Milieux	LB		ZYM autoinduction medium

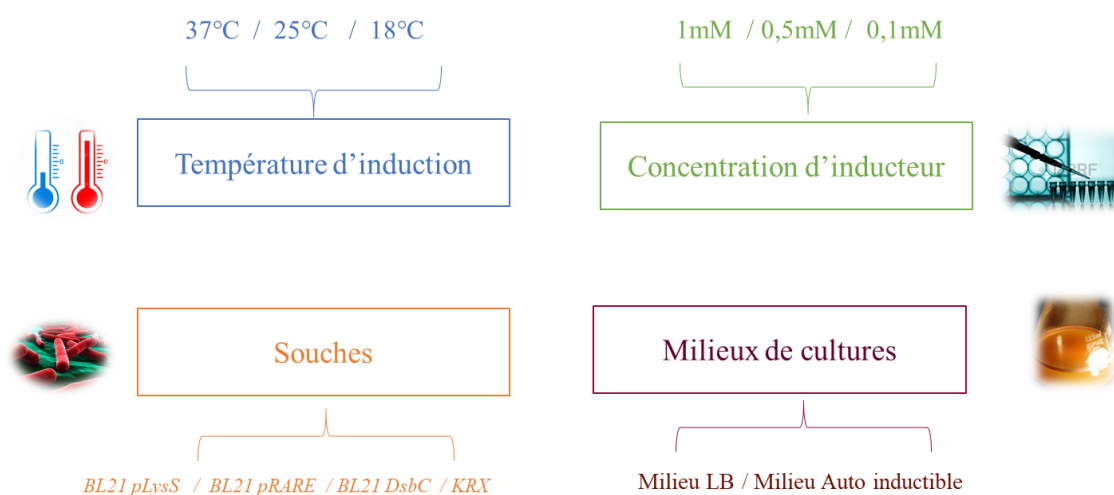


Figure 36 : Schéma synthétique des paramètres étudiés

➤ Criblage de différentes souches recombinantes

Quatre souches recombinantes d'*E. coli* ont été utilisées dans cette étude pour étudier la souche hôte favorable pour l'expression soluble de rFNIII9/10 dans diverses conditions (tableau 11). Les souches ont été transformées avec le vecteur pET15b + CMAT-FNIII9/10 recombinant et ont été cultivées séparément pour une étude comparative dans plusieurs conditions.

➤ Criblage du milieu de culture et optimisation de la température d'induction et la concentration d'inducteur

Les niveaux présentés dans le tableau 13 résument les facteurs testés de cette étude. Les souches recombinantes ont été cultivées dans du milieu LB à 37 ° C, 250 rpm jusqu'à ce que la biomasse atteigne la phase de croissance exponentielle. À une DO600 nm d'environ 0,5, l'induction a été réalisée dans différentes conditions testées. Pour une étude d'optimisation de la température, les

cellules ont été incubées après induction à 37 ° C, 25 ° C et 18 ° C avec 0,5 mM d'IPTG. Diverses concentrations d'IPTG ont ensuite été testées (0,1 mM / 0,5 mM et 1 mM) à une température d'induction optimale. Enfin, le milieu d'auto-induction ZYM a été utilisé pour évaluer son influence sur l'expression de rFNIII9 / 10. Les souches ont été cultivées dans du milieu ZYM pendant une nuit à 25 ° C pour comparer son effet dans les mêmes conditions optimales avec l'induction du milieu LB / IPTG.

VI.1.2.2. Production de protéines dans à l'échelle Erlen

Les souches de *E. coli* transformées avec le plasmide recombinant ont été cultivées pendant une nuit sur une plaque d'agar LB contenant un antibiotique approprié tel que cité dans le tableau XX à 37 ° C. Une préculture (10 ml) préparée à partir d'une colonie isolée a été utilisée pour inoculer 100 ml de milieu LB supplémenté avec des antibiotiques selon la souche étudiée. Pour les cultures en milieu LB, les bactéries recombinantes sont cultivées à 37°C sous agitation à 225 rpm dans le milieu contenant l'antibiotique. La croissance bactérienne est suivie par mesure de DO à 600nm toutes les 15 minutes jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance à une D_{0600} comprise entre 0,4 et 0,6. L'induction est alors réalisée en ajoutant la concentration appropriée de d'isopropyl- β -D-Thiogalacto-pyranoside (IPTG) et modification de la température selon l'expérience d'optimisation. Pour les cultures en milieu ZYM auto induit, les cultures sont réalisées dans les mêmes conditions de croissances sans étape d'induction par IPTG. Brièvement les bactéries sont cultivées dans le milieu ZYM additionné par les antibiotiques appropriés à 37°C sous 225 rpm d'agitation jusqu'à la phase exponentielle de croissance ensuite la température d'incubation est modifiée. Après 16 heures d'incubation, les cellules ont été récoltées par centrifugation à 2000 rpm pendant 15 min (4 ° C) puis lavées 3 fois avec du PBS. Les protéines recombinantes seront, ensuite, extraites et purifiées à partir du culot bactérien.

VI.1.3. Production de protéines en bioréacteur

La production du fragment FNIII9/10 a été transposée à l'échelle fermenteur dans les conditions optimales d'expression sous forme soluble. Les cultures en bioréacteur ont été effectuées à 37 ° C, pH 7,0, à la vitesse d'agitation de 600 rpm et à une vitesse d'aération de 1 VVM (volume par volume par minute). Des bioréacteurs Sartorius BIOSTAT de 3L équipés d'un contrôleur numérique intégré pour le pH, la température, l'agitation, l'oxygène dissous (OD) et des pompes péri-staltiques pour l'ajout d'acide, de base, d'antimousse et de nutriments ont été utilisés dans cette étude (Sartorius AG, Gottingen , Allemagne). Deux litres de milieu LB ou ZYM ont été

inoculés avec 100 ml de préculture. Des solutions de NaOH 2 M et de HCl 2 M ont été utilisées pour maintenir le pH. Le suivi de la croissance bactérienne ainsi que l'expression du FNIII9/10 a été réalisé tout au long de la production. Des échantillons prélevés dans des bioréacteurs à différents moments ont été analysés, pour la DO à 600nm (biomasse) et DO à 400nm (pour l'expression des protéines). Au départ, pour les deux milieux, la culture a été réalisée à 37 ° C, 600 rpm jusqu'à ce que la biomasse atteigne la première phase de croissance exponentielle. A une DO600 nm d'environ 0,4-0,6 l'induction a été réalisée dans les conditions optimales obtenus dans l'étude à l'échelle Erlen en présence de 2 mM de précurseur d'hème. Après 16 heures d'incubation, les cellules ont été récoltées par centrifugation à 2000 rpm pendant 15 min (4 ° C) puis lavées avec du PBS. Les protéines recombinantes seront, ensuite, extraites et purifiées à partir du culot bactérien.

VI.1.4.Extraction des protéines par lyse enzymatique

Les protéines sont extraites par lyse enzymatique. Le principe de la lyse enzymatique est basé sur la digestion de la couche de peptidoglycane de la paroi bactérienne par le lysozyme en présence du tampon contenant un agent chélateur et détergent pour favoriser la lyse cellulaire. Le culot bactérien a été resuspendu dans le tampon de lyse contenant 1mg/ml de lysozyme, 0,1mg de DNase, 0,5% Triton X-100 avec un cocktail d'inhibiteur de protéase et tamponnée au phosphate (PBS), pH 7,4. Le mélange est incubé pendant 1h dans de l'eau glacée, puis surnageant (fraction soluble) et les fractions de culot de lysat (fraction insoluble) ont été séparées par centrifugation à 13 000 rpm pendant 30 minutes.

VI.1.5.Purification et quantification des protéines

Grâce au partenaire de fusion 'CMAT', une double purification de fragment FNIII9 /10 a été réalisée.

VI.1.5.1. Purification sur billes de nickel :

La présence du tag HIS permet la purification du fragment FNIII9/10 par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) sur colonne de nickel. Le principe de cette chromatographie est basé sur l'affinité entre le tag His et le nickel greffé sur la phase stationnaire. La chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés est basée sur

l'interaction entre un métal de transition, ici le Ni^{2+} immobilisé sur une matrice par chélation, et la chaîne latérale des résidus His. Les groupements donneurs d'électrons sur le cycle imidazole de l'His forment des liens de coordination avec le Ni^{2+} de la résine, permettant ainsi la liaison des protéines à la résine. La fraction soluble des protéines a été chargée sur les billes de nickel nickel His-Select (Sigma), préalablement équilibré dans le tampon PBS. Le mélange est incubé pendant 1 h à 4 ° C. Après centrifugation à 2000 rpm pendant 10 min et élimination des protéines non retenues, les billes sont lavées avec trois volumes de colonne de PBS (pH 7,4) contenant 15 mM d'imidazole pour éliminer les protéines contaminantes de *E. coli*. L'élution est réalisée par 250 mM d'imidazole.

VI.1.5.2. Purification sur colonne Strep-Tactin®

Afin de récupérer la protéine d'intérêt hautement purifiée, une deuxième purification basée sur le tag SBP présent dans le partenaire de fusion a été réalisée. Le principe de cette chromatographie d'affinité repose sur l'interaction entre le tag SBP et la streptavidine. Le tag SBP se lie sélectivement à la colonne à Strep-Tactin®, une streptavidine modifiée. L'affinité de liaison à la Strep-Tactin® est près de 100 fois supérieure à celle de streptavidine. Cette technologie permet la purification en une étape des protéines recombinantes portant l'étiquette SBP. Les fractions éluées de la première étape de purification ont été rassemblées, diluées cinq fois dans du PBS et chargées sur des colonnes Strep-Tactin® Spin Prep Kit (Novagen). Préalablement équilibrées avec 500 µL de tampon de lavage (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Les protéines liées non spécifiquement ont été éliminées par quatre étapes de lavage, chacune avec 100 µL de tampon de lavage et la protéine marquée SBP a été éluée avec 150 µL de tampon d'élution (150 mM NaCl, 100 mM Tris – HCl, 1 mM EDTA, 2 mM D -biotine, pH 8,0). La protéine purifiée est dialysée et puis congelée pour stockage à -80 ° C.

VI.1.5.3. Dialyse et stockage des protéines

Afin d'éliminer les traces des solvants et de préparer la protéine recombinante purifiée dans son tampon de conservation, les échantillons sont dialysés pendant 20 h contre un tampon de dialyse composé [50 mM Tris-HCl (pH 8), 50% glycérol, 1 mM EDTA, 5 mM DTT and 0.1% Triton X-100] ensuite stockée à -80 ° C. Avant chaque analyse, les protéines stockées sont dialysées contre le tampon PBS pour éliminer les traces du tampon de conservation.

VI.1.6. Analyses de la protéine produite

VI.1.6.1. Suivi qualitatif de l'expression de la protéine

Le suivi en temps réel de la production et de la purification des protéines a été évalué qualitativement en suivant l'apparition d'une coloration rouge lors des processus de manipulation grâce au partenaire de fusion CMAT contenant le tag cytochrome b5. La couleur émise par le cytochrome b5 en présence de l'acide δ -aminolévulinique (ALA) a été exploitée pour le suivi de l'expression de la protéine de fusion comme décrit précédemment dans les travaux de Miladi et al. La couleur rouge était visible à l'œil nu pendant toutes les étapes de production portant comme validation qualitatif de l'expression de la protéine d'intérêt. L'absorbance des fractions de lysat a été mesurée à 400 nm afin de suivre et détecter la présence du fragment FNIII9/10.

VI.1.6.2. Quantification des protéines par dosage BCA

Le dosage de la quantité de protéines dans les différents échantillons est effectué avec le kit de dosage des protéines : dosage BCA (PIERCE). Le dosage BCA (Pour BiCinchoninic acid Assay), ou BC Assay, est un dosage colorimétrique des protéines, basé sur l'interaction des protéines avec l'acide bicinchoninique. La gamme étalon est préparée selon la recommandation du fournisseur. Un mélange de solutions A et B du kit est préparé en ajoutant 50 volumes de solution A à un volume de solution B. Avant le dosage, les échantillons sont préparés comme suit : 200 μ l du mélange A+B sont ajoutés à 20 μ l de l'échantillon à doser ainsi qu'aux échantillons de la gamme étalon. Une incubation de 30min à 37°C est réalisée dans l'appareil FLUOstar Omega (BMG Labtech). A la fin de l'incubation l'appareil permet de mesurer la Densité Optique à 562nm pour l'ensemble des échantillons. A partir des résultats fournis on trace la droite d'étalonnage $[A_{562nm} = fct([Protéine]_{\mu g.ml})]$ afin de déterminer la concentration de l'échantillon

VI.1.6.3. Analyse SDS-PAGE

Les protéines produites sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du dodécylsulfate de sodium (SDS). La SDS PAGE est la technique fondamentale la plus utilisée pour l'analyse des protéines. C'est une technique essentiellement analytique au cours de laquelle les protéines, dénaturée et portant une charge apparente négative grâce à l'intercalation de SDS, sont séparées dans un champ électrique par migration à travers un support réticulé, le gel de polyacrylamide, en fonction de leur masse molaire. Les protéines ainsi séparées peuvent

être visualisées par coloration. Les gels de polyacrylamide utilisés sont de 12% et de 1 mm d'épaisseur, fournis par Invitrogen (NuPage Novex Bis-Tris Gels). L'échantillon à analyser est préalablement dilué avec du tampon de charge. Ce dernier contenant le SDS, charge toutes les protéines négativement. Une dénaturation thermique par chauffage à 95°C pendant 10 min dans un thermomixer est ensuite réalisée afin de rompre les structures secondaires et tertiaire des protéines qui migrent en fonction de leurs poids moléculaires vers l'anode. Un volume de 20µl est déposé dans chaque puits du gel et la migration s'effectue pendant 45 minutes à 200 V. Après la migration, les gels incubés dans la solution de coloration (5 volumes méthanol, 1 volume acide acétique, 5 volumes H₂O distillée et 0.25% bleu de coomassie) 3 heures sous agitation. La décoloration est réalisée, sous agitation, pendant 1 à 2 heures dans du tampon de décoloration (30% éthanol, 10% acide acétique). Les gels ont été capturés avec la caméra ImageQuant 350.

VI.1.6.4. Analyse Western blot modifié :

Les protéines de fusion recombinantes ont été identifiées par Western blot modifié en utilisant la streptavidine-peroxydase conjuguée à une peroxydase de raifort (HRP) et au substrat TMB. La présence du tag SBP permet de simplifier l'analyse western blot sans recours à un anticorps spécifique. La protéine de fusion purifiée est analysée sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE. Après migration, le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est réalisé à l'appareil iBlot Dry Blotting System (Invitrogen). La membrane est ensuite bloquée par une solution de saturation puis incubée pendant 1h dans la solution de streptavidine couplée à la peroxydase. Après plusieurs bains de lavages la révélation se fait à la suite de l'ajout du substrat TMB pour les membranes permettant une détection spécifique des bandes correspondant aux protéines d'intérêt. Après lavage de la membrane, la photographie est réalisée grâce à un système d'imagerie GE Health care.

VI.2. Etude de l'activité biologique du fragment FNIII9/10

Dans le but d'évaluer l'activité du fragment produit *in vitro*, nous avons dans un premier temps investigué la liaison spécifique aux intégrines par un test biochimique de liaison (binding). Ensuite des surfaces bio-adhésives ont été développées par coating avec le fragment FNIII9/10 l'adhésion cellulaire des HGFs sur des plaques traitées a été étudié.

Nous avons exploité la propriété du tag SBP à interagir avec la streptavidine afin de détecter la protéine de fusion ;

VI.2.1. Binding de rFNIII9 / 10 aux récepteurs $\alpha 5\beta 1$

Pour étudier l'interaction de rFNIII9 / 10 avec les intégrines $\alpha 5\beta 1$, un test biochimique de liaison a été réalisée (Figure 37).

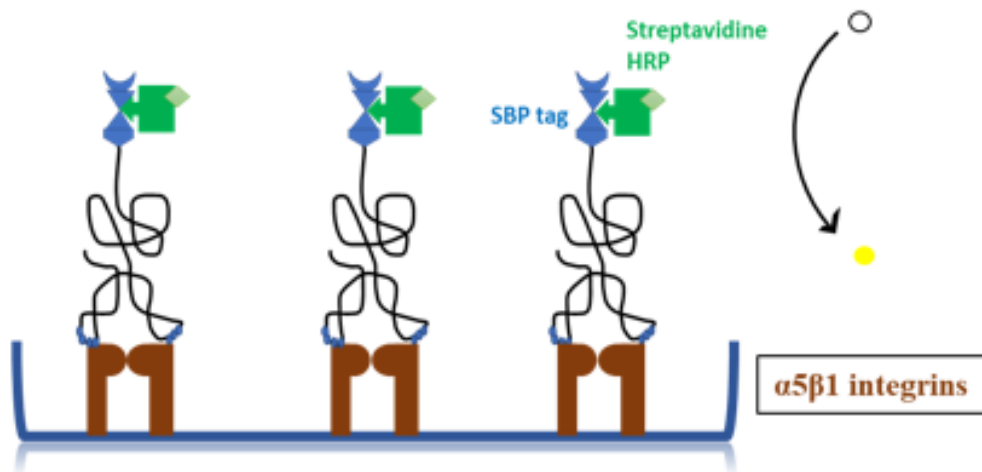


Figure 37 : Présentation schématique du principe de binding test

Les puits d'une plaque de microtitration ont été revêtus pendant une nuit à 4 ° C avec 100 μ l d'intégrines $\alpha 5\beta 1$ diluées dans du PBS à plusieurs concentrations. Les puits ont ensuite été lavés avec 0,02% de tween PBS trois fois puis bloqués avec 1% de BSA dénaturé pendant 2 h à 37 ° C. Le rFNIII9 / 10 préparé dans un tampon de liaison (50 mM de trisHCL (pH 7,4), 100 mM de NaCL, 2 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 1 mM de MnCl₂) a été ajouté et laissé interagir pendant 2 h à 37 ° C. Après 2 h d'incubation, la solution de rFNIII9 / 10 est retirée et les plaques lavées trois fois avec 200 μ l de PBS 0,05% Tween-20. De la streptavidine-peroxydase à une dilution de 1: 5 000 (dans du PBS, 0,05% de Tween-20) a ensuite été ajoutée et incubée pendant 1 h à température ambiante sous agitation douce. Après avoir retiré la solution de streptavidine-peroxydase, les plaques sont lavées à nouveau comme décrit ci-dessus. Pour la mesure de l'activité enzymatique, 150 μ l de substrat TMB ont été ajoutés et les plaques ont été incubées pendant 30 minutes. Après acidification avec 150 μ l de solution d'arrêt 0,5 MH₂S₀₄, l'absorbance de chaque puits a été lue avec un lecteur de microplaques à 450 nm.

VI.2.2. Quantification du rFNIII9-10 adsorbé passivement à l'aide du test d'immobilisation enzymatique

Nous avons exploité le partenaire de fusion CMAT afin d'évaluer spécifiquement l'adsorption du FNIII9/10 par le baie du tag SBP.

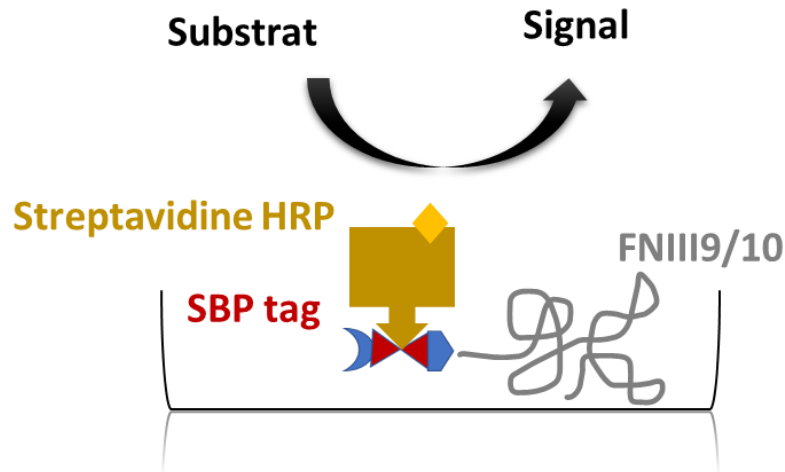


Figure 38 : Principe de la technique d'immobilisation enzymatique

Le rFNIII9 / 10 a été adsorbé passivement sur la surface des puits en polystyrène pour déterminer les niveaux de saturation et pour étudier ses propriétés d'adsorption. Les puits de polystyrène ont été rincés deux fois avec du PBS puis incubés avec des dilutions en série (1: 2) de protéine, en commençant à une concentration de 1 µg / µl. L'adsorption pendant 1 h et une nuit à 37 ° C a été étudiée. Les protéines non liées ont été éliminées par lavage plusieurs fois avec du PBS. Le rFNIII9 / 10 adsorbé a été quantifié par un test d'immobilisation enzymatique comme décrit précédemment (Miladi et al.) . Brièvement, les puits ont été lavés trois fois avec 200 µl de PBS + 0,05% de Tween-20. Les puits ont été ensuite bloqués avec 1% BSA dénaturée par la chaleur pendant 1h. La streptavidine-peroxydase à une dilution de 1: 5 000 (dans du PBS + 0,05% de Tween-20) a ensuite été ajoutée et incubée pendant 1 h à température ambiante sous agitation douce. Après avoir retiré la solution de streptavidine-peroxydase, les plaques ont été lavées à nouveau comme décrit ci-dessus. Pour la mesure de l'activité enzymatique, 150 µl de substrat TMB ont été ajoutés et les plaques ont été incubées pendant 30 minutes. Après acidification avec 150 µl de solution d'arrêt 0,5 MH2S04, l'absorbance de chaque puits a été lue avec un lecteur de microplaques à 450 nm. Pour les dosages BCA, les

protéines adsorbées ont été solubilisées à partir de la surface en utilisant 50 µl de Guanadine-HCL 4 M pendant 1 h. 200 µl de réactif A+B du kit BCA ont été ajoutés et incubés pendant 30 minutes à 37 ° C. L'absorbance a été mesurée à 562 nm par le lecteur de plaque FLUOstar.

VI.2.3. Etude de l'adhésion cellulaire

VI.2.3.1. Culture de fibroblastes gingivaux

Des fibroblastes gingivaux humains (HGF) ont été utilisés dans cette étude. Les fibroblastes gingivaux humains sont des cellules humaines primaires dont l'adhésion sur la fibronectine est médiée par les intégrines $\alpha 5 \beta 1$. Les cellules ont été cultivées dans du DMEM supplémenté avec 10% de sérum veau fœtal et 1% de pénicilline / streptomycine dans une étuve thermostatée à 37 ° C et sous une atmosphère à 5 % de CO₂ dans des flasques de culture de 75 cm³ en conditions stériles. Le milieu est changé après 24 h puis tous les 2 jours. Le passage des cellules est réalisé par trypsination (Trypsine/EDTA, Sigma à 0,5 %) pendant 2 min à 37 ° C. Les cellules sont stockées par congélation à (-80 ° C). Pour cette congélation, elles sont préparées à 10⁶ cellules par mL dans un milieu contenant du DMEM, 20 % de sérum de veau fœtal et 20 % de diméthyl sulfoxyde (DMSO, Sigma). La densité cellulaire est mesurée avec le compteur automatique Vi-CELL™ XR.

VI.2.3.2. Ensemencement des cellules

Des plaques non traitées (48 puits) ont été recouvertes du fragment FNIII9/10 recombinant diluées dans du PBS comme décrits préalablement (section III.2.1) pendant 1h à 37 ° C. La protéine non liée a été éliminée et les puits ont été lavés avec du PBS et bloqués avec 1% de BSA dénaturée pendant 1 h. Les cellules HGF ont été préparé dans le milieu DMEM avec 1% de pénicilline / streptomycine sans l'ajout de SVF etensemencées à $1,4 * 10^5$ cellules / cm². Les cellules sont laissées adhérer pendant 2 h à 37 ° C, 5% de CO₂ dans un milieu sans sérum sur des puits traitées avec différentes concentrations de FNIII9/10 afin d'évaluer l'effet dose du fragment produit sur l'adhésion cellulaire. De plus l'adhésion sur les puits saturés en FNIII9/10 a été évalué avec une cinétique de 1h , 2h et 3h afin de suivre l'effet du FNIII9/10 sur attachement cellulaire précoce. Après incubation les cellules non adhérentes sont éliminées par lavages au PBS 3 fois et les cellules adhérentes sont marquées et évaluées.

VI.2.3.3. Comptage et marquage des cellules par la Calcein AM

Afin d'évaluer l'adhésion cellulaires, les cellules ont été marqué par le marqueur fluorescent la calcéine AM en utilisant le kit de comptage Fluorescent cell counting kit (sigma-aldrich). Les

calcéines sont des sondes fluorescentes utilisées pour le marquage du cytoplasme des cellules vivantes. La calcéine AM, non fluorescente, est perméable à la membrane cellulaire. Elle est hydrolysée par estérases intracellulaires pour former de la calcéine anion fluorescente. Après incubation, les cellules ont été lavées avec du DPBS et marquées avec de la calcéine-AM, pendant 30 min, pour évaluer la densité des cellules adhérentes. La fluorescence a été ensuite mesurée à 535 nm émission/ 485 nm excitation dans le lecteur de plaque FLUOstar. De plus, les cellules ont été photographiées avec un microscope à fluorescence à un grossissement de 4,5. Les cellules sont observées avec un microscope (Nikon Ellipse TE200) équipé en champ clair et en épi-fluorescence (lampe au mercure 100W et filtre pour la FITC (495/520nm) et la rhodamine (560/590 nm)). Les images sont capturées à l'aide d'une caméra numérique (DMX1200, Nikon)

VI.3. Bio-fonctionnalisation du PCLU avec le fragment bio adhésive rFNIII9/10

Afin de développer un échafaudage adhésif, le fragment recombinant a été adsorbé passivement à la surface des disques de PCLU. Les propriétés d'association du fragment FNIII9/10 et PLCU sont étudiées en évaluant la saturation, le relargage et la réponse cellulaire.

VI.3.1. Lavage et préparation de l'échafaudage PCLU

L'échafaudage PCLU est préparé par des bains de lavage dans de l'eau stérile et l'éthanol 70% sous vide et stérilisé ensuite par autoclavage. Les disques de PCLU (1 cm de diamètres/0.3cm hauteur) sont pesés individuellement puis lavés à l'eau stérile sous vide pendant 1h. L'eau est ensuite changée puis le PCLU est lavé à l'eau stérile pendant 4 heures. L'eau stérile est remplacée par l'éthanol 70% et PCLU est incubé pendant 1h sous vide. Deux lavages par l'eau stérile sont par la suite réalisés pendant toute la nuit et puis 1h respectivement. Les disques de PCLU sont autoclavés en milieu humide pour l'utilisation en culture cellulaire.

VI.3.2. Etude de la saturation du PCLU par le fragment

FNIII9/10

Le rFNIII9 / 10 a été adsorbé passivement sur la surface de PCLU pour déterminer les niveaux de saturation et pour étudier ses propriétés d'adsorption. Les disques de PCLU ont été rincés deux fois avec du PBS pendant 1 h sous vide et ensuite incubés avec des dilutions en série (1: 2) de protéine, en commençant à une concentration de 3 mg / ml pendant 4h30 sous vide. Les protéines non adsorbées ont été éliminées par lavage 3 fois avec 1ml du PBS sous vide. Les protéines adsorbées sont récupérées par solubilisation par 1 ml de Guanidine-HCL 4 M pendant 1 h sous vide. Les protéines sont ensuite quantifiées par dosage BCA en ajoutant de réactif de kit BCA ont été ajoutés et incubés pendant 30 minutes à 37 ° C. L'absorbance a été mesurée à 562 nm.

VI.3.3. Etude du relargage du FNIII9/10

Les études de cinétique de relargage ont été réalisées dans un tampon phosphate (PBS, pH 7,4). Des disques de PCLU (5mm de diamètre, 2 mm d'hauteur) sont incubées pendant 4h30 dans la solution de rFNIII9/10 à la concentration de saturation comme décrit dans la section précédente. Les disques de PCLU traités sont ensuite rincés 3 fois avec 1ml de PBS pendant 5 min sous vide, ensuite incubées dans 1 ml de PBS. Des solutions sont incubées sous agitation à température ambiante pour suivre la libération de FNIII9/10 dans des conditions déstabilisantes et d'autre sont placés à 4°C afin d'étudier la libération dans les conditions de stockage. La libération de FNIII9/10 été évalué par quantification des protéines relarguées dans la solution par dosage BCA et par solubilisation des protéines adsorbées comme décrit dans la section précédente. Chaque aliquot est analysé par spectroscopie UV-visible pour le dosage BCA des protéines.

VI.3.4. Etude de la réponse cellulaire

VI.3.4.1. Colonisation des échafaudages par les cellules

Les cellules ont été cultivées comme décrit à la section précédente. Afin d'étudier l'efficacité d'échafaudage PCLU traités par le fragment FNIII9/10, l'adhésion et la prolifération cellulaire sur ce dernier ont été investigué. Les échafaudages PCLU fonctionnalisés par FNIII9/10 (1 cm de diamètre, 2 mm de hauteur) ont été préparés et placés au fond des puits des plaques de

polystyrène non traités (plaques de 24 puits). Pour les tests d'adhésion cellulaire, les cellules au passage 7 remis en suspension dans le milieu DMEM supplémenté de 1% de pénicilline / streptomycine et ont étéensemencés soigneusement sur les disques de PCLU-FNIII9/10 à 7×10^5 cellules par matériau. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO_2 pendant 1h et 3h. Les matériaux sont ensuite lavés 3 fois avec du PBS (- Ca^{2+} / - Mg^{2+}) pour éliminer les cellules non adhérentes. Pour les tests de prolifération cellulaire, les cellules ont étéensemencé à 3×10^5 cellules par matériau et laissé adhérer pendant 3h ensuite les cellules non fixées sont éliminées par lavage au milieu DMEM. Le milieu de culture contenant DMEM supplémenté de 1% de pénicilline est ajouté par la suite et changé au bout de 24h . Le milieu de culture contenant DMEM supplémenté de 1% de pénicilline / streptomycine et 10% de SVF est changé tout les 2 jours. Les plaques sont incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO_2 pendant 20 jours.

VI.3.4.2. Comptage cellulaire :

A la fin de chaque incubation, les échafaudages ont été soigneusement rincés avec du PBS (- Ca^{2+} / - Mg^{2+}) et incubés à 37°C pendant 10 min dans une solution de trypsine (0,05%) et de collagénase (0,025%). Ensuite, le surnageant a été récupéré et centrifugé, et le culot de cellules a été remis en suspension. Afin de décoller toutes les cellules de l'échafaudage, cette opération est répétée trois fois. Le nombre de cellules a été déterminé par comptage avec un compteur automatique Vi-CELL™ XR pour évaluer l'efficacité de la d'adhésion et la migration cellulaire sur les échafaudages PCLU-FNIII9/10. Les fractions sont collectées et chargé dans les coupelles de comptage. Le comptage automatisé dans le système Vi-CELL™ XR repose sur l'analyse d'image numérique des cellules après coloration au bleu trypan pour le comptage automatique des cellules. La suspension cellulaire à quantifier est aspirée et mélangée avec le bleu de trypan ensuite des images sont capturés par coupe et le nombre de cellules est ainsi déterminés.

VI.3.4.3. Imagerie 3D par microscope 3D numérique

Pour l'imagerie 3D, les échafaudages ont été rincés dans du PBS, et les cellules sont fixées dans du PFA (4%) pendant une nuit. Les images ont été réalisées à l'aide d'un microscope 3D numérique (microscope 3D Keyence VHX 5000) équipé d'une console de commande complète. Pour la coloration des cellules, les échafaudages ont été rincés à l'eau distillée suite à la fixation avec du PFA puis ont été immergés dans une solution d'hémalum (0,2% d'hématéine dans de l'alun de potassium aqueux à 5%) pendant 5 min et rincés avec l'eau du robinet pendant 5 min

[38]. La coloration à l'hémalum permet d'identifier et observer les cellules fixées sur les échafaudages. L'hématoxyline est un colorant basique donnant une couleur bleu ou bleu-foncé aux composés acides des cellules et tissus. Ainsi la chromatine des noyaux composée de l'ADN se colore en bleu foncé. De plus, le cytoplasme est coloré plus ou moins intensément en bleu dû aux ribosomes qui contiennent l'acide ribonucléique. Enfin, les échafaudages colorés ont été stockés dans de l'éthanol à 70% en volume jusqu'à l'observation.

VI.4. Développement des nouvelles chimères protéique issus des domaines de la FN

Des chimères protéiques issus des domaines bio-fonctionnels de la fibronectine humaine ont été construites, clonées et produites dans cette étude. Nous détaillons dans cette partie la stratégie adoptée de design et clonage de ces chimères. Les chimères protéiques conçus sont ensuite produites chez le système bactérien *E. coli* et les protocoles de production et de purification sont identiques au procédé décrit dans la section II.1. Cette partie est ainsi présentée brièvement afin d'éviter la répétition des protocoles.

VI.4.1.Design des constructions chimérique :

Afin de développer des fragments mimétiques de la FN, différentes combinaisons des domaines fonctionnels de la FN ont été proposés. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux domaines impliqués dans l'interaction avec les récepteurs transmembranaires cellulaires. D'autres chimères impliquant les domaines d'interaction avec les éléments de la MEC sont intégrés, plus précisément le domaine d'interaction avec les héparines (DHB) de la MEC et le domaine d'interaction avec le collagène (DCB) de la MEC. Les nouvelles chimères protéiques issues de combinaisons de ces différents fragments ont été développées ; des outils de recherches de séquences bio-informatiques ont été utilisés pour la préparation des séquences codantes pour ensuite être synthétisées et clonées dans des vecteurs pour la construction de notre banque.

VI.4.1. Outils bio-informatiques pour la préparation des séquences

La préparation et la validation des séquences nucléotidiques codantes ont été accomplis avec les outils bio-informatique suivants :

Banques de séquences nucléiques

L'outil NCBI « National Center for Biotechnology Information (NCBI) » « Centre américain pour les informations biotechnologiques » (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) , est le serveur de l'institut national américain pour l'information biologique moléculaire. Ce lien regroupe les banques de donnée des ADNc ainsi que des logiciels de d'analyses des séquences nucléotidiques

GeneBank- NCBI : La GenBank est une base de données américaine des séquences d'ADN disponible sur NCBI. Cette banque est la librairie de toutes les séquences de nucléotides publiquement disponibles et leur traduction en protéines.

EMBL : La base de données sur les séquences nucléotidiques du Laboratoire européen de biologie moléculaire (EMBL) (<http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>) est hébergé à l'Institut européen de bioinformatique (EBI) dans le cadre d'une collaboration internationale avec la Banque de données ADN de Japon (DDBJ) et GenBank (États-Unis). Les données sont échangées quotidiennement entre les bases de données collaboratives.

ENA : « European Nucleotide Archive (ENA) » (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>) est l'archive des informations de séquençage des nucléotides dans le monde, couvrant les données brutes de séquençage, les informations d'assemblage des séquences et les annotations fonctionnelles.

Banques de séquences protéiques

Uniprot : « Universal Protein Resource » (base de données universelle de protéines) (www.uniprot.org) . C'est une base de données de séquences de protéines européenne. Elle combine et regroupe toutes les données des différentes bases protéomiques ; les données des bases Swiss-Prot, TrEMBL et Protein Information Resource (PIR)

ExPASy (the Expert Protein Analysis System) (<http://www.expasy.org>), est un serveur fourni en tant que service à la communauté des sciences de la vie par une équipe multidisciplinaire de

l'Institut suisse de bioinformatique (SIB). Il donne accès à une variété de bases de données et d'outils analytiques dédiés aux protéines et à la protéomique.

Swissprot : c'est la banque de données de séquences protéiques. Swiss-Prot a été créé en 1986 par Amos Bairoch durant son doctorat et développé par l'Institut suisse de bioinformatique et l'Institut européen de bio-informatique

Les séquences codantes des domaines d'intérêt sont recherchées dans la base de données NCBI blast tool et vérifiés par alignement avec la séquence ADNc de la FN . La source des séquences nucléotidiques est la base de données Uniprot. Les domaines fonctionnels de la FN sont identifiés puis la séquence d'ARNm mature est recopiée. L'outil Reverse Complement (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.htm) est utilisé ensuite pour la réversion de la transcription ainsi pour désigner la séquence reverse complémentaire de la séquence d'ADN anti-sens et ce dans le but d'obtenir le sens (5'-3'). Ces étapes nous permettent de récupérer la séquence codante du domaine de la Fibronectine. Plusieurs iso formes sont alors proposées. Celle qui présente le meilleur score de similarité est alors sélectionnée. Les séquences construites sont ensuite validées par alignement par l'outil Multiple Sequence Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) dans le but de déterminer une séquence consensus via

via	HIV	sequence	data	base
-----	-----	----------	------	------

 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/consensus.html>). Une fois le consensus obtenu, un alignement avec la base de données via NCBI blast tool est réalisé afin de trouver les correspondances à nos séquences avec les différents isoformes de la FN. Une dernière validation est réalisée par l'outil Uniprot par alignement de nos séquences traduites avec la banque des protéines humaine afin de localiser les domaines produits sur la fibronectine et comparer les résultats avec les différents domaines identifiés de la FN.

VI.4.2.Stratégie de clonage des chimères protéique

La séquence codante préparée pour chaque chimère a été synthétisée par la compagnie GenScript et insérée dans le plasmide pUC47. Cette séquence a été optimisée pour le système d'expression *E. coli* par l'ajout des codons stop adéquats. La séquence codante pour chaque chimère a été préparée à partir du vecteur de synthèse par PCR puis clonée dans le vecteur d'expression pET SUMO CHAMPION. Les clones positifs ont été ensuite criblés et les vecteurs recombinants ont été préparés par des mini préparations plasmidiques pour être finalement évalués et validés

VI.4.2.1. Préparation des constructions par PCR :

La séquence codante pour chaque chimère est synthétisée par PCR à partir du vecteur en utilisant deux couples d'amorce présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 15) . La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique d'amplification de séquences connues d'ADN à l'aide d'un couple d'amorce s'hybridant sur les extrémités de la séquence pour la cadrer. Le cycle de la PCR est composé de trois étapes réalisées à des températures caractéristiques ; une première étape de dénaturation à 95°C au cours de laquelle la matrice de l'ADN double brin est dénaturé résultant deux brins monocaténaire simple. L'étape suivante est l'hybridation des amorces réalisée à une température dépendante de la composition en nucléotides des amorces. Elle est calculée par la formule : $T_a = [2(A+T) + 4(G+C)] - 10^\circ\text{C}$ où A, T, C et G représentent respectivement le nombre d'adénine, de thymidine, de cytosine et de guanidine dans le primer. Le logiciel «Tm calculator » NEB est un moyen simple pour la calculer également. La dernière étape est l'étape d'élongation ou polymérisation à 72°C permettant la synthèse du brin complémentaire pour chaque matrice par une ADN polymérase.

L'amplification des séquences chimères protéiques est réalisée pour les 34 cycles avec Pfu ADN polymérase et pour de dernier cycle de chaque PCR avec une Taq DNA polymérase (Invitrogen). Le produit de la réaction est analysé sur gel d'agarose 1%.

Le tableau 14 résume le mélange réactionnel préparé pour chaque réaction :

Tableau 14 : Mélange réactionnel PCR

Réactifs	Volume (µL)	Concentration finale
ADN matrice	V (100 à 200 ng)	2 à 4 ng/µL
Tampon PCR (10x)	5	1X
dNTP (10 mM)	1	0,2 mM
Primer sens (100 ng/µL)	1	2 ng/µL
Primer antisens (100 ng/µL)	1	2 ng/µL
H2O	qsp 50 µL	
DNA polymérase	1 µL	

Tableau 15 : Couples d'amorces pour la synthèse des inserts

Chimère	Amorces	Tm (°C)
CH1	Sens : 5' <i>ctttgcacgtgcctgggc</i> 3'	60,7
	Antisens : 5' <i>ttaaatggaaattggcttgctgc</i> 3'	59,3
CH2	Sens : 5' <i>ctttgcacgtgcctgggc</i> 3'	60,7
	Antisens : 5' <i>ttaaatggaaattggcttgctgc</i> 3'	59,3
CH3	Sens : 5' <i>atccagtggaaatgcaccacag</i> 3'	61,3

	Antisens : 5' ttaaattggaattggcttgctgc 3'	59,3
CH4	Sens : 5' ggtcttgattccccaactgg 3'	60,5
	Antisens : 5' ttagaagccacagctgcct 3'	60,5
CH5	Sens : 5' ctttgcacgtgctgggc 3'	60,7
	Antisens : 5' ttatggctgtggtgcattcca 3'	59,4
CH6	Sens : 5' atccagtggaatgcaccacag 3'	61,3
	Antisens : 5' ttatgtgctggtgctggtgg 3'	60,5
CH7	Sens : 5' ggtcttgattccccaactgg 3'	60,5
	Antisens : 5' ttaaattggaattggcttgctgc 3'	59,3

VI.4.2.2. Electrophorèse sur gel d'agarose

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

VI.4.2.3. Clonage de l'insert dans le vecteur pET SUMO :

Le vecteur pET SUMO est vecteur linéaire et T sortant ce qui permet le TA clonage en une seule étape. L'amplification par PCR avec les amorces spécifiques pour chaque construction a résulté la préparation de l'insert avec une étape d'amplification par la Taq DNA polymérase ajoutant un A sortant pour chaque séquence. Le produit est ensuite ligué dans le plasmide pET SUMO Champion pour obtenir le plasmide recombinant. 2 μ l du vecteur est incubé avec 2 μ l de

produit PCR frais en présence d'une T4 DNA ligase du kit pET SUMO (Invitrogen) pendant une nuit à 15°C (tableau 16). Le rapport de ligation (plasmide / insert) utilisé pour chaque réaction est 1 :1 pour garantir une meilleure ligation.

Tableau 16 : Mélange réactionnel ligation

Réactifs	Volume (µL)	Concentration finale
Produit PCR	2	2 à 4 ng/µL
Tampon de ligation	1	1X
Vecteur pET SUMO	2	2,5 ng/ µL
H2O	qsp 10 µL	
DNA polymérase	1 µL (0.4U)	

VI.4.2.4. Transformation des bactéries compétentes par le produit de la ligation

Afin de cribler les vecteurs recombinants refermant les séquences dans la bonne orientation et de valider l'étape de clonage, les bactéries One Shot® Mach1™ -T1R compétente sont transformées par le produit de ligation. One Shot® Mach1™ -T1R chimiquement compétente sont inclus dans le kit du plasmide pET SUMO pour faciliter la transformation. La transformation est réalisée par choc thermique, 2 µL de produit de ligation sont mis en contact avec 100 µL de bactérie compétente dans des tubes stériles et le mélange est incubé 30 minutes dans la glace. Le mélange est ensuite passé pendant 90 secondes à 42°C puis placé dans la glace pendant 5 minutes. Après l'ajout de 500 µL de milieu SOC, les tubes sont incubés à 37°C pendant 45 minutes sous agitation. Les cellules sont ensuite collectées par centrifugation pendant 2 minutes à 5000 rpm, et le culot bactérien est resuspendu dans 100 µL de milieu de culture. Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur milieu LB-agar additionné de 34.6 µg/mL de kanamycine, puis incubées à 37°C durant 16 heures.

VI.4.2.5. Criblage des clones positifs

Un premier criblage des clones ayant intégré le vecteur pET SUMO est réalisé par culture dans un milieu LB agar contenant l'antibiotique de sélection Kanamycine. Les clones ayant intégrés le vecteur poussent sur le milieu sélective puisque le plasmide pET SUMO contient un gène de résistance à la Kanamycine alors que les clones négatives ne pourront pas pousser sur le milieu. Ainsi les colonies récupérées à la fin de l'incubation dans le milieu LB-agar additionné de 34.6 µg/mL de kanamycine à 37°C ont été repiquée pour un criblage des vecteurs recombinants renfermant l'insert avec la bonne orientation. Les colonies sont criblées par PCR sur colonie

avec les amorces validant le sens d'insertion puis les clones positifs retenues une mini préparation plasmidique est réalisée pour la récupération des vecteurs recombinant et une validation finale par digestion enzymatique et séquençage est mené.

➤ **PCR sur colonie :**

La ligation de la séquence d'intérêt dans le vecteur pET SUMO est analysée par PCR sur colonie. Cette méthode permet le criblage d'un grand nombre de clones et de vérifier le sens d'insertion pour le TA cloning. Les colonies ont été repiquées et remise en suspension séparément dans 50 µl du mixte PCR (voir tableau 14) puis incubées pendant 10 min à 94°C pour une lyse cellulaire et inactivation des nucléases. Une amplification de 30 cycles est ensuite programmé et les produits sont analysés sur gel d'agarose 1%. Pour confirmer l'insertion et la bonne orientation des constructions, les amorces sens utilisées pour chaque insert est l'amorce promoteur T7 sens (5' - **TAATACGACTCACTATAGGG**- 3') et l'amorce antisens est celle spécifique à la séquence en anti sens (voir tableau 15).

➤ **Mini préparation de plasmides pour l'extraction des vecteurs recombinants et la sélection de clones positifs**

Les clones validés par PCR ont étéensemencé dans 10 ml de LB (+Kanamycine) et incubés pendant 16 h sous à 37°C, 225 rpm. Les cellules ont été ensuite collecté par centrifugation et les vecteurs recombinants ont été préparé à partir des clones validés par une mini préparation plasmidique (Zhou et al., 1990). Le principe de la technique repose sur une lyse alcaline permettant l'isolement sélective des vecteurs plasmidiques. Le kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen a été utilisé. La procédure de préparation avec ce kit repose sur une procédure de lyse alcaline-SDS modifiée suivie d'une purification de l'ADN plasmidique sur des colones en silice. L'ADN lié est élué dans le tampon Tris-EDTA. Pratiquement, le culot bactérien obtenu est resuspendu dans 250 µL de tampon A1 (50 mM Tris-HCl, PH 8; 10 mM EDTA; 100µg/mL RNase A) et transféré dans un microtube. La lyse est réalisée par l'ajout de 250µL de la solution A2 (200 mM NaOH; 1% SDS). Le SDS complexe les phospholipides et les composants protéiques de la membrane tandis que les conditions alcalines permettent la lyse tout en dénaturant l'ADN chromosomique et les protéines. Quand la solution devient visqueuse, nous ajoutons 350 µL du tampon A3 (3 M potassium acétate, PH 5,5) et immédiatement nous mélangeons par inversion du tube 4 à 6 fois. La forte concentration en sels entraîne la précipitation de protéines dénaturées, de l'ADN chromosomique, des débris cellulaires et du SDS, tandis que l'ADN plasmidique se renature correctement. Après une centrifugation à 13000

rpm pendant 10 minutes, le surnageant est transféré dans une colonne Qiaprep et centrifugé 1 minute à 1 000 rpm. L'ADN plasmidique est lavé et le filtrat éliminé chaque fois par centrifugation 1 minute à 13000 rpm. L'ADN plasmidique est éluée avec 50 µL du tampon EB (10 mM Tris HCl, pH 8,5). La qualité de la préparation d'ADN plasmidique est analysée par visualisation sur un gel d'agarose 1% (dépôt de 2 µL d'échantillon pour un volume total de dépôt de 10 µL).

➤ **Par digestion enzymatique**

La digestion enzymatique est la technique de base pour la sélection de clones positifs. La digestion est effectuée sur des échantillons d'ADN plasmidique purifiés afin de valider l'insert. 1 à 2 microgrammes d'ADN plasmidiques sont digérés par des enzymes de restriction spécifiques pour chaque construction. Le choix de ces enzymes est réalisé par une analyse des cartes de restriction des vecteurs recombinants sur le logiciel serialCloner de manière à avoir une à deux enzymes qui coupent de part et d'autre et à l'intérieur de l'insert. L'échantillon à analyser est mélangé à 1 µL d'enzyme de restriction (EcoRI pour toutes les constructions et EcoRI et SalI pour CH5) (10U/µL), 2 µL de tampon de réaction 10X SB fourni par Sigma-Aldrich™ (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 8) et de l'eau ultrapure stérile en quantité suffisante pour 20 µL. Ensuite, la réaction est incubée pendant 2 heure à 37 °C. La digestion est contrôlée sur gel d'agarose 1% par séparation électrophorétique et les profils ainsi que la taille des séquences sont comparés aux résultats in silico préparés pour validation (Figure 39).

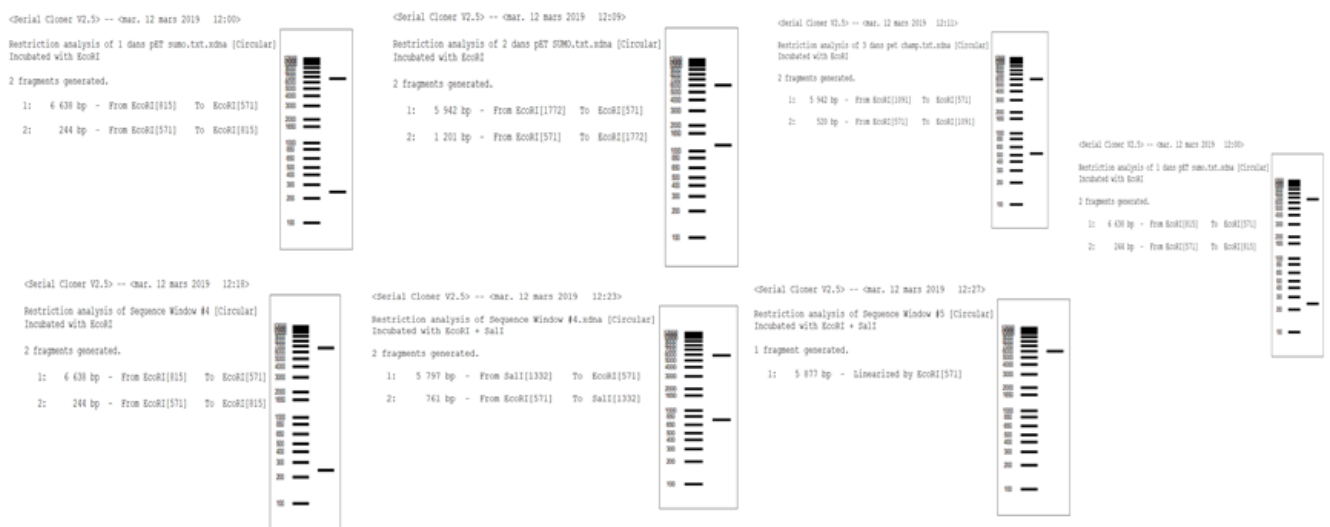


Figure 39 : Digestion in silico des différentes constructions

➤ **Par séquençage**

Dans le but de valider les séquences, l'orientation ainsi que l'absence de mutation de chaque construction validée par les tests préalables, un séquençage selon la méthode Sanger Big Dye Terminator a été réalisé à partir des vecteurs recombinants préparés. Cette méthode permet de fournir un alignement des nucléotides composant le fragment d'intérêt.

VI.4.3. Expressions des chimères protéiques dans le système bactérien *E. coli*

Pour chaque construction, et à l'issue du clonage et validation des séquences codants des chimères protéiques dans le vecteur d'expression pET SUMO, les souches d'expression de *E. coli* ont été transformées par les plasmides recombinants et la surexpression des chimères a été évaluée. Les étapes d'expression d'extraction et de purification des chimères protéiques suivent les mêmes protocoles présentés dans la première section : « II.1 Production de fragment FNIII9/10 ». Afin d'éviter la répétition, uniquement les nouvelles techniques sont détaillées dans cette section.

VI.4.3.1. Productions des chimères protéiques

Pour chaque construction les bactéries recombinantes, transformées par choc thermique avec les vecteurs validés, ont été cultivées à 37°C sous agitation à 250 rpm dans le milieu LB contenant l'antibiotique de sélection des souches et vecteurs. L'inoculation est réalisée à partir d'une pré-culture (sur milieu LB+ATB). Les cellules ont été cultivées à 37 °C avec une agitation de 250 rpm jusqu'à une DO600 \approx 0,4 indiquant la phase exponentielle de croissance. L'expression de la protéine recombinante a ensuite été induite avec l'ajout l'IPTG et la culture a été incubée à une température qui dépend de la souche et de la protéine surexprimée. Une optimisation des conditions de surexpression soluble a aussi été effectuée la souche BL21 DsbC a été retenue comme souche optimale de l'expression des toutes les chimères protéiques. Avec les mêmes protocoles décrites dans la section précédente, les protéines recombinantes sont, ensuite, extraites par lyse enzymatique et purifiées par chromatographie d'affinité sur des billes de nickels grâce à la queue polyhistidine à l'extrémité N- ou de la protéine, provenant du vecteur d'expression pET SUMO. L'expression et la purification des chimères protéiques sont contrôlés par analyse SDS-PAGE des fractions protéiques issus de chaque étape.

VI.4.3.2. Solubilisation des protéines par le Sarkosyl

Pour certaines chimères, nous avons observé une forte expression insoluble même avec des conditions optimisées. Ainsi, une étape de solubilisation par le sarkosyl a été réalisée. Le Sarkosyl (alias N laurylsarcosine) est un détergent doux utilisé généralement dans les protocoles de purification des protéines (Filip et al., 1973; Frankel et al., 1991). Bien qu'il ait un groupe carboxylate chargé négativement similaire au SDS, il n'a pas d'effet dénaturant similaire. Il a été démontré qu'il solubilisait des protéines recombinantes mal repliées à partir de corps d'inclusion et de membrane cytosolique bactérienne (Filip et al., 1973; Frankel et al., 1991). Dans de nombreuses études précédentes qui utilisent le sarkosyl pour solubiliser les protéines de CI, les tampons de lyse contiennent généralement de faibles pourcentages, de 0,1% à 2%, de sarkosyl (Burgess, 2009). Un tampon de lyse contenant 2% de sarkosyl (Cat. N ° 61207-5000; Acros, Morris Plains, NJ, USA) ont été utilisées pour solubiliser les chimères insolubles. Les bactéries ont été re-suspendu dans 10 ml de tampon de lyse enzymatique contenant 1mg/ml de lysozyme, 0,1mg de DNase, 250 mM de NaCl avec un cocktail d'inhibiteur de protéase et tamponnée au phosphate (PBS), pH 7,4 et incubés pendant 1h à 4°C. Le sarkosyl (2%) est ensuite ajouté, incubé pendant 2 h sous agitation à 4°C. Enfin, 4% de Triton X100 est puis ajouté et le mélange est incubé pendant 5 min à température ambiante. Une centrifugation à 12 000 rpm pendant 30 min permet de séparer les fractions soluble et insoluble.

VI.4.4. Validations de chimères protéiques produites :

L'activité biologique des chimères produites et validés a été évalué par des tests *in vitro*.

VI.4.4.1. Tests d'adhésion cellulaire :

Les cellules ont été cultivées dans du DMEM supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal et 1% de pénicilline / streptomycine à 37 ° C dans 5% de CO₂. Des plaques de culture non tissulaire (48 puits) ont été recouvertes de protéines recombinantes à analyser préparée dans du PBS aux concentrations indiquées pendant 60 min à 37 ° C. Les protéines non fixées ont été éliminée et les puits ont été lavés avec du PBS et bloqués avec 1% de BSA dénaturée pendant 1 h. Les cellules hGF ont étéensemencées à $1,4 \times 10^5$ cellules/cm² et ont été laissées adhérer pendant 3 h à 37 ° C, 5% de CO₂ dans un milieu sans sérum. Après incubation, les cellules ont été lavées avec du DPBS et marquées avec de la calcéine-AM, dans du DPBS + 2 mM de dextrose pendant 45 min, pour calculer la densité des cellules adhérentes. De plus, les cellules ont été photographiées avec un microscope à fluorescence Nikon TE-300 à un grossissement de 4,5.

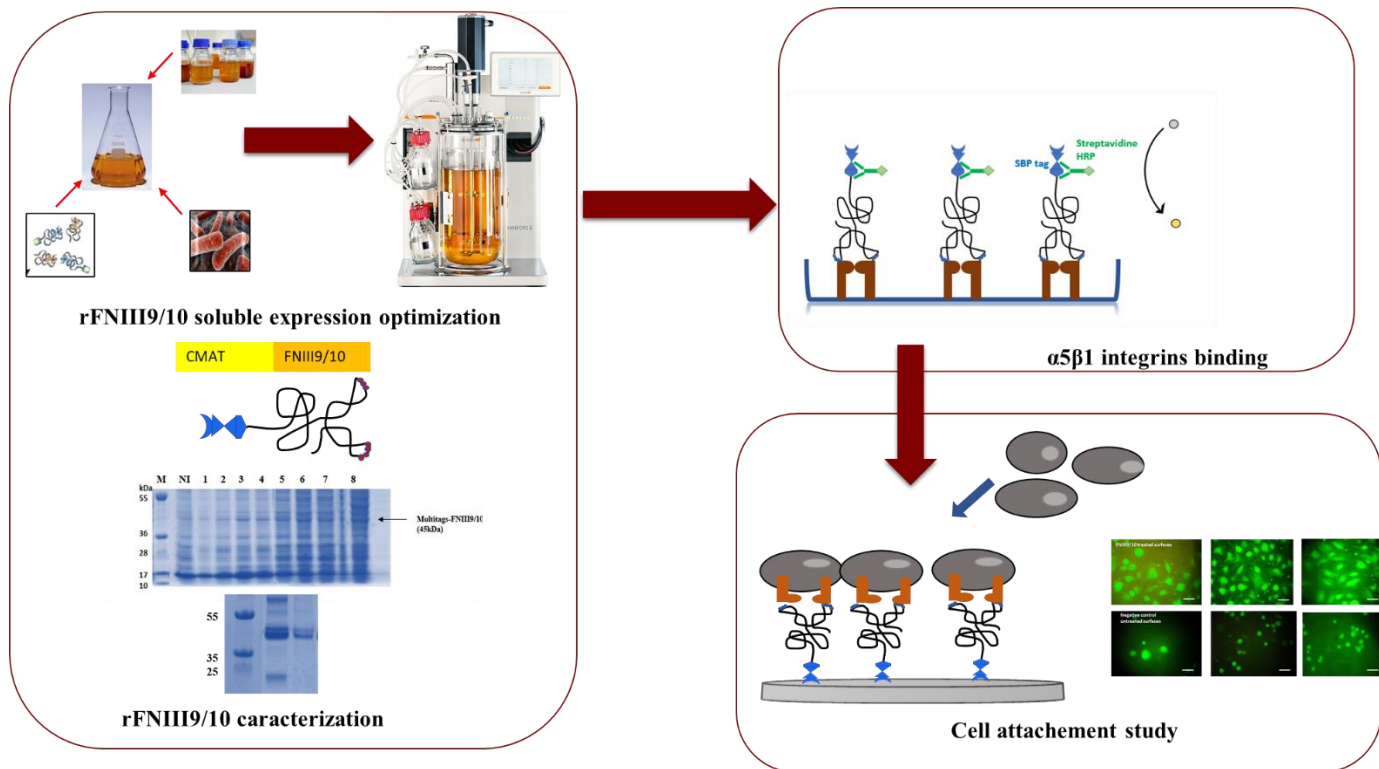
VI.4.4.2. Etude de l'absorption de la protéine chimérique sur de l'os xénogénique

Pour les chimères protéiques contenant le domaine de la fixation de collagène une étude de validation de l'interaction avec la protéine cible de la MEC a été réalisée par l'analyse de l'adsorption passive des protéines chimériques sur le Laddec une matrice osseuse decellularisée composé de 95% de collagène et comparé à l'adsorption sur le PCLU. Dans les deux cas, les biomatériaux ont été lavés avec le PBS puis des dilutions en série de protéines a été ajouté. L'adsorption est réalisée à une température ambiante sous faible agitation ou pendant 4h30 sous vide pour l'étude respectivement sur Laddec et le PLCU. Après l'élimination des protéines non adhérentes par lavage pendant 5 min dans 1 ml de PBS (X3), les protéines adsorbées sont décollées par l'ajout de 4M Guanidine HCL pendant 1h. Les protéines sont quantifiées par dosage BCA (Pierce TM BCA Protein Assay Kit by Thermo Fisher SCIENTIFIC).

Chapitre III

Production des domaines 9 et 10 de la
Fibronectine humaine : Optimisation de
l'expression du fragment recombinant
sous forme soluble chez *E. coli*

I. Résumé graphique :



II. Préambule

Ce chapitre traite les résultats de la production d'un ligand bio-adhésif issue de domaines de liaison aux cellules de la fibronectine humaine (FNIII9/10). Notre objectif était d'optimiser l'expression sous forme soluble du fragment recombinant FNIII9/10 chez *E. coli* pour ensuite extrapoler sa production à l'échelle fermenteur. La propriété bio-adhésive du fragment produit a été également étudié.

III. Introduction :

L'ingénierie des motifs biomimétiques délivrant des signaux spécifiques qui dirigent la fonction cellulaire, en particulier l'adhérence cellulaire médiée par l'intégrine, est apparue comme des approches prometteuses pour améliorer les propriétés d'ostéo-intégration des biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative (Casanova et al., 2020a). La fibronectine humaine (FN) est une protéine majeure de la matrice extracellulaire qui interagit avec une variété de récepteurs de surface cellulaire (intégrines) et des protéines ECM via des domaines de liaison spécifiques (Parisi et al., 2020a). Le domaine de liaison aux cellules de la fibronectine

(FN), localisé dans les domaines 9 et 10 du type III FN (FNIII9 / 10), contenant la séquence RGD et site synergique PHSRN, est l'un des ligands bio-adhésifs les plus étudiés et est considéré comme un substrat prometteur pour plusieurs applications biomédicales et biotechnologiques, en particulier la bio-activation des biomatériaux (Parisi et al., 2020a). Ces applications nécessitent souvent une quantité élevée de protéines tout en exigeant des degrés de puretés importantes. La technologie des protéines recombinantes est largement utilisée pour la production de ces domaines fonctionnels et présente plusieurs avantages notamment des systèmes de production simple et moins coûteux comme *E. coli* (Cutler & García, 2003a). Néanmoins, l'expression soluble de ces fragments bioactifs est moins étudiée et un faible rendement de production a été observé dans presque toutes les études (Cutler & García, 2003). Malgré cet intérêt, les conditions optimales d'expression sous forme soluble des fragments recombinants dérivés de la fibronectine n'ont pas été investiguées. Ces limitations restent critiques pour leurs applications futures de revêtement des biomatériaux. De plus, les domaines de la fibronectine ont été largement exprimés avec des partenaires de fusion pour une purification facile à l'aide de l'étiquette His (Peisley & Gooley, 2007) et de l'étiquette GST (Hocking et al., 1994; Roy et al., 2011) (Mardon et Grant, 1994; Roy, 2010) ou pour améliorer la bio-fonctionnalité en fusion avec la cadhérine (Zhang et al., 2010) et le facteur de croissance des kératinocytes, cependant des contaminants résiduels étaient encore observés après purification.

Ainsi, notre objectif était de produire le domaine bio-adhésive de la fibronectine humaine par la technologie des protéines et d'optimiser les conditions d'expression afin d'atteindre des rendements de production élevés. rFNIII9/10 a été exprimées en fusion avec une étiquette multi tags "CMAT" pour développer un processus de production et de caractérisation productif et simplifié. Une étude d'optimisation combinée a été réalisée en étudiant l'effet des paramètres de production ; souches d'*E. coli*, condition d'induction (température et concentration d'inducteur) et milieux de culture sur son expression soluble. La production a ensuite été transposée à l'échelle fermenteur. Enfin, l'activité biologique du fragment produit a été étudiée afin de valider son potentiel bio adhésive.

Dans cette partie, nous allons d'abord analyser les résultats obtenus pour les études d'expression, d'optimisation de la production et de purification du fragment FNIII9/10. Nous présenterons ensuite les résultats de la transposition d'échelle pour la production à l'échelle fermenteur. Nous présenterons ensuite l'évaluation de la capacité du système CMAT dans le traçage en temps réel des étapes de production, de purification et d'adsorption. Enfin, nous

étudierons l'activité biologique du fragment recombinant afin d'évaluer son comportement adhésif *in vitro*.

IV. Optimisation des conditions de production

Le gène rFNIII9 / 10 a été cloné dans le vecteur pEBI précédemment décrit (Miladi et al., 2013). L'expression de la protéine de fusion a été réalisée en utilisant une technologie de protéine recombinante standard (décrite dans le chapitre II). Le but des expériences conçues (tableau 1) est d'identifier les conditions optimales de production de rFNIII9 / 10 dans *E. coli*. À cette fin, différents facteurs ont été évalués à plusieurs niveaux (Tableau 17).

Tableau 17: Résumé des paramètres évalués dans l'étude d'optimisation de l'expression soluble de FNIII9/10

Paramètres	Niveaux			
Température	18 °C	25°C	37°C	
Concentration de l'IPTG	0,5 mM	1 mM	0,1mM	
Souches de <i>E. coli</i>	BL21 (DE3) pLysS	BL21 (DE3) STAR pRARE	BL21 (DE3) DsbC	KRX
Milieux	LB		ZYM autoinduction medium	

Quatre souches recombinantes d'*E. coli* ont été utilisées dans cette étude afin d'identifier la hôte favorable pour l'expression soluble de rFNIII9 / 10 dans diverses conditions (Tableau 17). Les souches ont été transformées avec pET15b + CMAT-FNIII9 / 10 recombinants et ont été cultivées séparément pour une étude comparative dans plusieurs conditions. Les niveaux présentés dans le tableau 17 résumant les facteurs testés dans cette étude. À une DO600 nm d'environ 0,4-0,6, l'induction a été réalisée dans différentes conditions testées. Pour une étude d'optimisation de la température, les cellules ont été incubées après induction à 37 ° C, 25 ° C et 18 ° C. Diverses concentrations d'IPTG ont ensuite été testées (0,1 mM / 0,5 mM et 1 mM) à une température d'induction optimale. Enfin, le milieu d'auto-induction ZYM a été utilisé pour évaluer son influence sur l'expression de rFNIII9 / 10.

IV.1. Effet de la température d'induction

La température d'induction a un effet important sur l'expression des protéines chez *E. coli*. Le repliement des protéines recombinantes, l'expression soluble et en particulier la formation des

corps d'inclusion se sont révélés fortement affectés par la température post-induction (de Groot & Ventura, 2006b). Par conséquent, afin d'évaluer la température d'induction optimale pour l'expression soluble de rFNIII9/10, l'induction a été réalisée à différents niveaux de température (37 ° C, 25 ° C et 18 ° C). Quatre souches transformées d'*E. coli* [BL21 (DE3) pLysS, BL21 (DE3) DsbC, BL21 (DE3) star RARE et KRX] ont été cultivées en milieu LB et induites avec 1 mM de [IPTG] à 37 ° C, 25 ° C ou 18 ° C. Les résultats de la Figure 40 ont montré que l'expression soluble la plus élevée de rFNIII9 / 10 a été obtenue à 25 ° C pour presque toutes les souches d'*E. coli*.

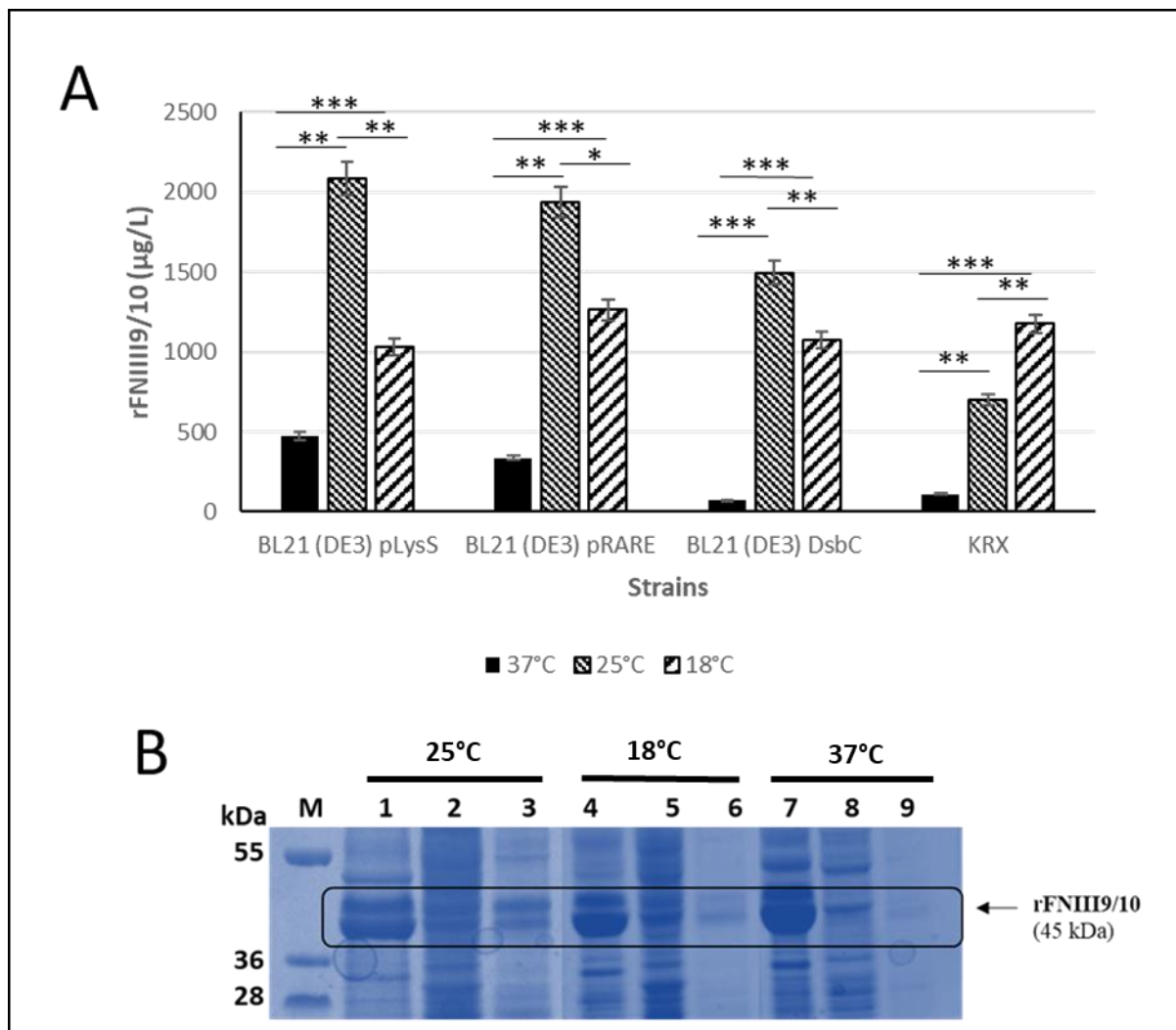


Figure 40: Effet de la température d'induction sur l'expression soluble de rFNIII9/10 :
 (A) Quantité de rFNIII9 / 10 soluble exprimée dans différentes souches d'*E. coli* ; (B) Analyse SDS PAGE de l'expression de rFNIII9 / 10 dans BL21 (DE3) pLysS, les protéines ont été séparées sur des gels de Bis-Tris à 12% (Invitrogen, USA). M: marqueur de poids moléculaire protéique; 1,2,3: fraction insoluble, soluble et purifiée respectivement à 25 ° C; 4,5,6: fraction insoluble, soluble et purifiée respectivement à 18 ° C; 7,8,9: fraction insoluble, soluble et purifiée respectivement à 37 ° C. * différence significative $p < 0,05$, ** différence significative élevée $p < 0,02$, *** différence significative très élevée $p < 0,01$ (ANOVA)

Les températures élevées et basses ont généré une faible expression soluble du fragment recombinant par rapport à 25°C. À 37 ° C, l'expression de rFNIII9/10 soluble était plutôt insoluble. De très faibles quantités solubles produites ont été observé à cette température par rapport à celle obtenus à 25 ° C et 18 ° C. De plus, l'analyse sur gel SDS PAGE de la fraction insoluble, soluble et purifiée sur bille de nickel des différentes expériences pour la souche BL 21 pLysS (Figure 40.B) montrent que la bande relative à la protéine de fusion est plus intense au niveau des fractions insolubles à 37°C. Nous suggérons qu'à 37 ° C la production de protéines et l'activité métabolique des cellules sont accélérées, ce qui conduit à une croissance cellulaire optimale mais également à une augmentation de l'accumulation de protéines dans des corps d'inclusion. La basse température (18 ° C) a montré une augmentation de l'expression soluble de rFNIII9 / 10 comparée à 37 ° C mais elle est restée inférieure au rendement obtenu à 25 ° C. Bien qu'une température basse entraîne la réduction de la formation de corps d'inclusion insolubles, la diminution de la croissance cellulaire à cette température pourrait diminuer directement le rendement de la protéine produite. La température moyenne après induction s'est avérée optimale pour l'expression de plusieurs protéines recombinantes solubles dans *E. coli*, comme la nitrilase acylase (E. Su et al., 2016) .

Nos résultats ont montré que la température optimale de l'expression rFNIII9/10 sous forme soluble est de 25°C , avec un meilleur taux d'expression de 2.3 mg par culture d'un litre obtenue par la souche BL 21 (DE3) pLysS.

IV.2. Effet de la concentration d'inducteur sur la production de rFNIII9 / 10

Bien que l'IPTG soit l'inducteur couramment utilisé pour l'expression de protéines recombinantes sous le contrôle du promoteur t7 et de l'opérateur lac, il a été montré que la concentration d'IPTG pouvait réprimer la croissance cellulaire ainsi que l'expression des protéines (Hp & Kk, 2005b). Afin de trouver la concentration d'IPTG appropriée pour l'expression soluble de rFNIII9/10, l'induction a été réalisée avec différentes concentrations d'IPTG [0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM].

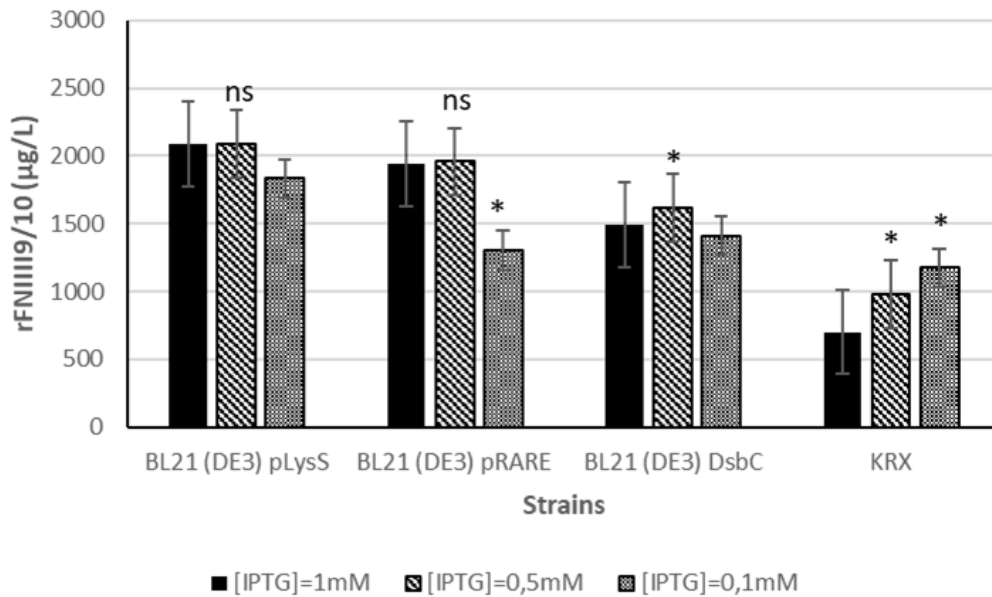


Figure 41 : Effet de la concentration d'inducteur sur la production de rFNIII9/10
*ns : différence non significative $p > 0,05$, * différence significative p ANOVA $< 0,05$*

L'effet de la concentration d'IPTG a été étudié dans les quatre souches transformées d'*E. coli* et les résultats représentés dans la figure 41 illustrent la quantité de rFNIII9/10 soluble produite en fonction de la concentration d'IPTG testée. Le niveau le plus élevé de rFNIII9/10 soluble produite a été observé lors de l'induction avec 0,5 mM d'IPTG pour la plupart des souches testées à l'exception de KRX. Les résultats indiquent que l'expression soluble optimale de rFNIII9/10 a été obtenue lorsque l'induction a été réalisée à 0,5 mM d'IPTG. D'autre part, nous avons observé que l'effet de la concentration d'IPTG dépend fortement de la souche de production. En effet et contrairement à ce qui était prévu, la diminution de la concentration d'IPTG n'a pas affecté de manière significative l'expression soluble de rFNIII9/10 pour BL21 (DE3) pLysS et pRARE pour 1 mM et 0,5 mM d'IPTG ($p > 0,05$ ANOVA) et une diminution de rFNIII9/10 soluble a été observée lors de la diminution d'IPTG concentration comme le montre la figure 41. Inversement, pour la souche KRX, la concentration d'IPTG a significativement affecté l'expression soluble de rFNIII9/10 et 0,1 mM d'IPTG s'est avéré être la concentration d'induction optimale. Ainsi, cela peut être probablement dû à une expression principalement insoluble du fragment recombinant chez KRX induite à 1 mM d'IPTG (Figure 41). Par conséquent, l'amélioration de l'expression soluble de rFNIII9/10 à une faible concentration d'IPTG peut être attribuée à la diminution de la formation de corps d'inclusion. En résumé, pour les concentrations d'IPTG testées, une concentration moyenne d'IPTG (0,5 mM) a permis l'expression soluble optimale de rFNIII9/10 atteignant 2,32 mg par L de culture pour la souche BL21 pLysS suggérant qu'une concentration d'inducteur faible et élevée peut résulter une

induction inefficace et une expression insoluble, respectivement. Les mêmes résultats ont été observés par Garcia-Fraga et al., 2015 ont démontré que 0,5 mM d'IPTG était la concentration optimale conduisant à l'activité enzymatique la plus élevée pour HsChiA1p, alors que des concentrations d'inducteur très faibles et plus élevées n'étaient pas efficaces (García-Fraga et al., 2015).

Clairement, l'amélioration de la production de rFNIII9/10 sous forme soluble a été obtenue avec 0,5 mM d'IPTG, ce qui a été retenu pour des expériences ultérieures.

IV.3. Effet du milieu de culture

Le LB est le milieu conventionnel utilisé pour la culture d'*E. coli*. Pour la production des protéines recombinantes la stratégie largement utilisé est la croissance dans le milieu LB des souches recombinantes avec une induction par l'IPTG. Récemment, il a été montré que des milieux de culture spécifiques, contenant des pourcentages de sucres métabolisée à base de glucose et des sucres inducteurs sont plus efficaces pour l'expression des protéine recombinantes (Kaur et al., 2018b). Le principe étant une auto-induction par assimilation préférentielle de sucres par les souches recombinantes cultivées dans le milieu de telles sortes à induire l'expression de la protéine d'intérêt automatiquement. Ces milieux ont généré des densités cellulaires élevées et avec des taux de synthèse de protéines recombinantes importantes . Dans ce contexte, le milieu auto-inductible ZYM (0.05% glucose, 0.2% α -lactose) a été utilisé dans cette pour évaluer son influence sur la production de rFNIII9 / 10. Les souches ont été cultivées dans des milieux LB et ZYM. L'induction de rFNIII9 / 10 a été réalisée dans les conditions optimales précédemment décrites pour le milieu LB [0,5 mM IPTG, 25 ° C]. Pour le milieu ZYM, l'induction a été réalisée spontanément sans étapes supplémentaires par la présence de 0,2% de lactose comme inducteur. Comme le montre la figure 42, une surexpression de rFNIII9 / 10 a été observée pour les cultures d'auto-induction. La concentration finale de la biomasse a été étudiée en mesurant la DO à 600 nm (OD600nm) et les résultats ont montré une augmentation importante de taux de biomasse obtenu par le milieu LB par rapport à celui atteint avec le milieu de culture LB (Tableau 18) .

Tableau 18: DO 600 nm finale de croissance dans le milieu LB et auto-induit ZYM

Souches	BL21 (DE3) pLysS	BL21 (DE3) pRARE	BL21 (DE3) DsbC	KRX
DO finale (ZYM)	7,23	9,52	7,09	8,66
DO finale (LB)	3,32	3,16	3,12	3,05

La DO 600nm finale était significativement plus élevée pour toutes les souches testées, illustrant un taux de croissance cellulaire important pour le milieu auto-induit ZYM. L'évaluation de taux de biomasse finale obtenu sur ce dernier était au moyenne 2,5 fois plus élevée par rapport au milieu LB et le rendement en rFNIII9/10 soluble obtenu était environ 13 fois plus élevé que celui obtenu avec le milieu LB en utilisant l'IPTG comme inducteur (figure 42).

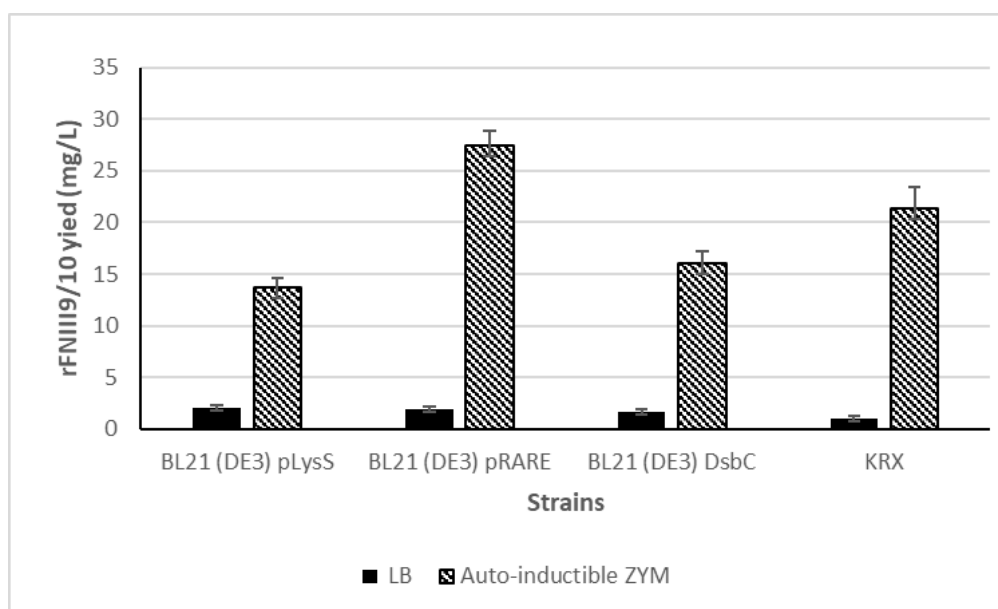


Figure 42: Effet de milieu auto-induit sur le rendement de production de rFNIII9/10

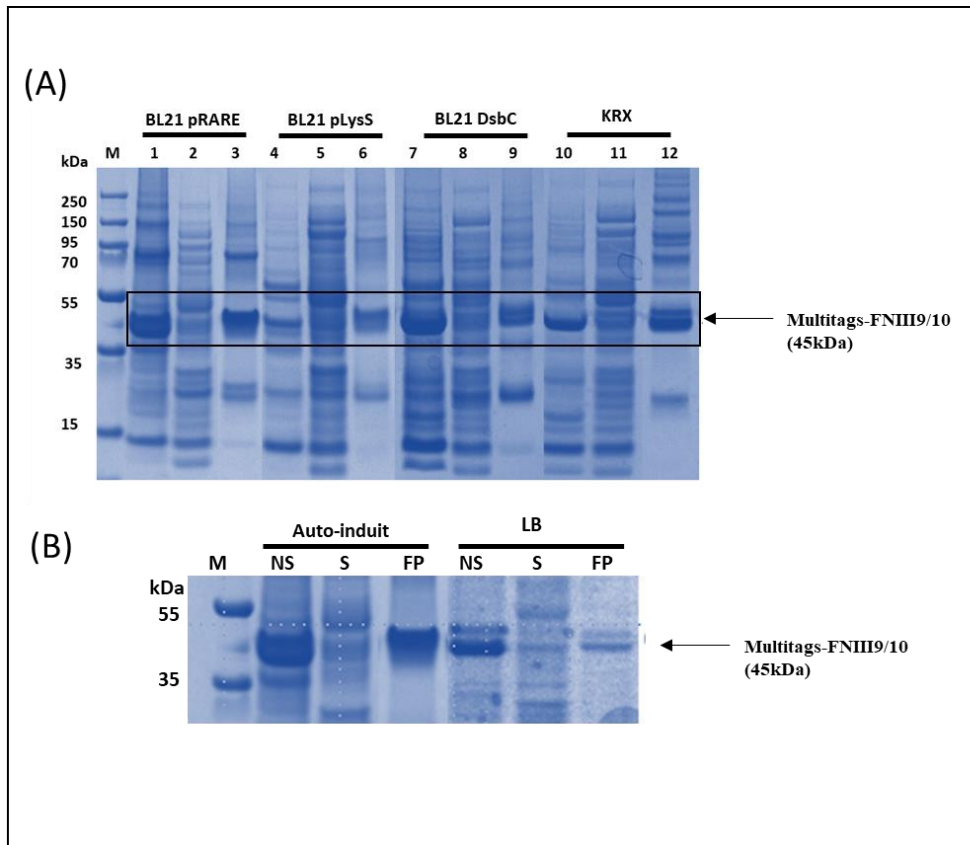


Figure 43: Analyse par SDS-PAGE sur gel de 12 % de l'expression de la protéine de fusion Multitags-rFNIII9/10 dans l'étude de l'effet de milieu auto induit ZYM.

(A) Analyse de l'expression pour chez les différentes souches d'*E. coli* cultivées en milieu auto-induit : M : marqueur de poids moléculaire ,1,2,3; présentent les fraction insoluble, soluble et NI purifiée respectivement pour la souche BL21 pRARE , de même pour 4,5,6 pour la souche BL21 pLysS, 7,8,9 pour la souche DsbC et 10, 11, 12 pour la souche KRX; (B) Comparaison de l'expression de rFNIII9/10 dans le milieu auto induit et le milieu LB ; NS, S, FP: présentent les fraction insoluble, soluble et NI purifiée de l'expression dans les conditions optimales dans le milieu LB et auto-induit respectivement

La quantité la plus élevée de rFNIII9/10 a été obtenue avec BL21 (DE3) pRARE cultivée dans un milieu ZYM atteignant environ 25.6 mg par culture de 1 L. Ces résultats sont également confirmés par l'analyse SDS-PAGE des différentes fractions insolubles, solubles et purifiées sur billes de nickel. Comme le montre la figure 43, une intensité de la bande relative au fragment recombinant rFNIII9/10 très marquée est observée au niveau des fractions purifiées pour toutes les souches testées. De plus en comparant à celle observée en milieu LB, une augmentation de taux d'expression de la rFNIII9/10 est constatée (Figure 43.B). Par ailleurs, une expression insoluble est aussi observée avec le milieu auto-induit pour la plupart des souches recombinantes mais les taux récupérés de protéine soluble restent très importants. Ces résultats ont indiqué que l'utilisation de milieu d'auto-induction permet d'améliorer à la fois la croissance cellulaire et la quantité de rFNIII9/10 produite, ce qui a été observé pareillement par E. Salas Sarduy et al. lors de l'étude de l'amélioration de la production de Falcipain-2 recombinante dans *E. coli* en utilisant le milieu d'auto-induction ZYM (Sarduy et al., 2012) . A

partir des résultats ci-dessus, on a pu conclure que l'utilisation du lactose comme inducteur pourrait grandement améliorer la production et la solubilité de rFNIII9/10 en plus d'être plus favorable pour la croissance des souches d'*E. coli* (Studier, 2005).. Plusieurs rapports ont souligné l'efficacité des milieux d'auto-induction dans une large gamme de production de protéines recombinantes chez *E. coli* (Studier, 2005, Nadkarni et al., 2007, Gutiérrez-González et al., 2019). Il a été montré que des densités cellulaires très élevées ont été atteintes en raison de composants complexes présentés dans de tels milieux accompagnés d'une grande amélioration du système d'expression recombinant car l'induction de l'expression de protéines recombinantes est médiée par le changement d'état métabolique qui est apporté par la croissance de la culture.

Ainsi le meilleur taux d'expression soluble de rFNIII9/10 a été obtenus par la souche BL21 pRARE induite à 25 °C.

IV.4. Effet d'un agent solubilisant

Une stratégie d'amélioration de la solubilité des protéines recombinantes exprimées chez *E. coli* est l'utilisation des agents solubilisant in bactério pour favoriser le repliement correct des protéines hétérologues au moment de l'expression de la protéine (Khow & Suntrarachun, 2012). Afin d'éviter la formation des corps d'inclusion, un agent solubilisant codé AE1EBI a été développé dans notre laboratoire. La méthode élaborée consiste à ajouter cet agent lors de la phase d'induction dans le but d'augmenter la solubilité des protéines recombinantes produites en minimisant la formation des corps d'inclusion.

AE1EBI a été testé afin d'évaluer son impact sur la solubilisation de rFNIII9/10. Deux molarités de AE1EBI ont été évalué 2mM et 6 mM. La production a été réalisée dans les mêmes conditions décrites précédemment et l'ajout de l'agent solubilisant s'effectue lors de l'induction.

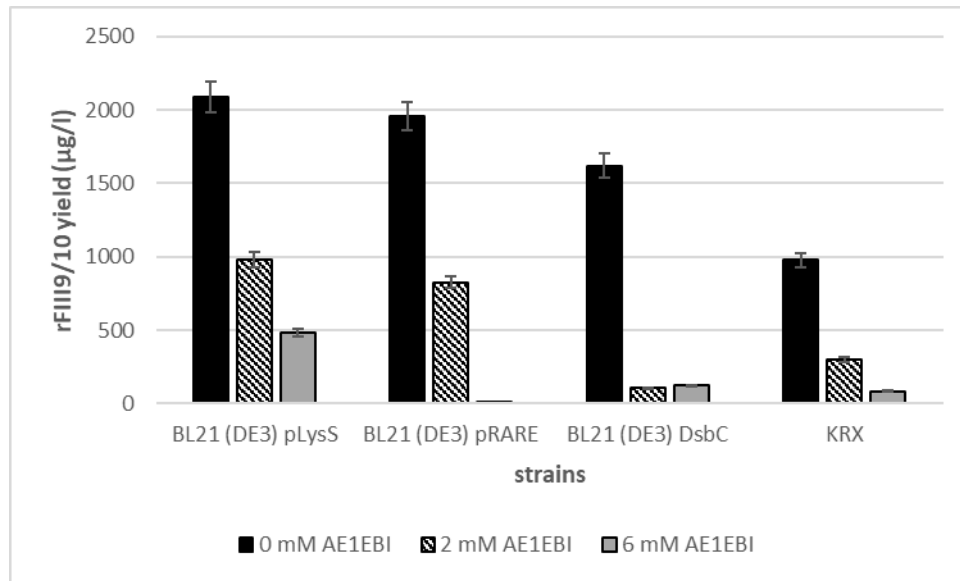


Figure 44 : Effet de l'ajout d'un agent solubilisant AE1EBI sur l'expression soluble de rFNIII9/10

Contrairement à ce qui a été prévu, l'agent solubilisant a significativement diminué l'expression soluble de rFNIII9/10 pour les quatre souches de *E. coli*. Comme le montre la figure 44, une diminution de taux de rFNIII9/10 soluble a été observée. Une diminution de la croissance bactérienne a été également notée qui a chuté de 1.2 fois pour les différentes souches testées. Cette diminution de taux de rFNIII9/10 soluble peut être expliquée par inhibition et un ralentissement dans la machinerie cellulaire d'expression des protéines. Ainsi l'ajout de l'agent solubilisant n'a pas amélioré l'expression soluble de rFNIII9/10.

IV.5. Effet des souches d'*E. coli*

Dans le but de cribler la souche optimale d'*E. coli* pour l'expression et la production solubles de rFNIII9/10, quatre souches ont été investiguées dans plusieurs conditions de production comme décrit précédemment. Quatre souches de *E. coli*, portant des modifications génétiques différentes optimisant le système d'expression des protéines recombinantes, ont été utilisées dans cette étude. L'objectif était de réaliser un test empirique pour cribler l'hôte d'expression optimale en étudiant l'effet des souches sur l'expression de rFNIII9/10 dans plusieurs conditions. Les résultats ont montré que la souche optimale pour la production de fragment recombinant rFNIII9/10 était fortement influencée par les conditions de production. Des souches optimales différentes, BL21 (DE3) pLysS et BL21 STAR RARE, sont obtenus pour

l'induction IPTG conventionnelle en milieu LB et pour l'étude en milieu auto-induit respectivement. D'autre part, pour l'ensemble des études réalisées, des comportements différents des souches en variant les paramètres sont observables. Par exemple, pour l'induction IPTG conventionnelle, la souche KRX a montré une expression soluble optimale de rFNIII9/10 à faible température et concentration d'IPTG, contrairement aux autres souches testées. La faible température d'induction (18°C) et la faible concentration d'inducteur (0.1mM IPTG) ont significativement amélioré le taux de rFNIII9/10 soluble pour cette souche (Figure 40-41). En conclusion, il est important de souligner qu'il était intéressant de tester les souches dans les diverses études d'optimisation menés et qu'il n'y avait donc pas de souche optimale universelle pour la production de rFNIII9/10. Pour les paramètres évalués, la souche BL21 (DE3) STAR RARE a montré l'expression et la solubilité de rFNIII9/10 la plus élevées dans les conditions optimales de cultures et d'inductions.

Finally, this strategy allowed us to obtain high yields of rFNIII9/10 soluble form in *E. coli*. The best yield was obtained with the BL21 STAR RARE strain cultured in the auto-inducing ZYM medium at 25°C. Although the domain of the FN interacting with the transmembrane receptors of cells has been largely investigated, researchers have not been interested in the yield and production rate. A study of recombinant bioadhesive fragments from the cellular interaction domain of the FN produced the domain 7-10 of the FN type III with a yield of 2 mg per 1 L culture of recombinant fragment [produced in the JM 109 strain of *E. coli* and induced with 0.1 mM IPTG] (Martino et al., 2009a). We have obtained during this thesis yields of production ten times higher.

In summary, the optimization of the expression conditions of rFNIII9/10 led to the identification of the BL 21 (DE3) pLysS strain induced with 0.5 mM IPTG at 25°C as optimal conditions for the expression of the rFNIII9/10 fragment in LB medium, generating yields of 2.3 mg of protein of interest per liter of culture medium. The BL21 STAR RARE strain cultured in the auto-inducing ZYM medium at 25°C allows a 10.2-fold improvement in yield compared to LB medium, with 26 mg per liter of culture medium. These conditions were used for a large-scale production study.

V. Production de rFNIII9 / 10 en bioréacteur

Bien que la production à grande échelle soit un élément clé pour explorer l'efficacité du processus de production dans des conditions bien contrôlées, jusqu'à présent, la production de domaines recombinants de FN n'a été réalisée qu'à l'échelle Erlen. Dans ce travail, nous avons étudié la production de rFNIII9/10 recombinant dans un système de bioréacteur à l'échelle pilote 5 Litres. La fermentation a été extrapolée dans un fermenteur BioSxt 5L avec 2 litres de volume utile. La production de rFNIII9/10 a été réalisée dans les conditions optimales identifiés dans l'étude à l'échelle Erlen. L'expression soluble de rFNIII9/10 et la biomasse ont été évaluées en temps réel grâce au partenaire de fusion CMAT et ont été analysées par SDS-PAGE. L'apparition d'une couleur rouge (Figure 45) était directement observable à l'œil nu lors des étapes d'expression, d'extraction de la purification de la protéine de fusion. Cette coloration provient du tag cytochrome b5 contenue dans le partenaire de fusion CMAT. La stabilité de l'expression du cytochrome b5 a été rapportée (Zhao et al., 2009) ainsi, cette propriété de couleur rouge du cytochrome b5 fournit une méthode simple mais fonctionnelle pour le suivi de l'expression tout au long de la production à l'échelle fermenteur dans les conditions d'expression optimales. Le culot de culture induite présente une coloration rouge comparée à celle non induite (Figure 45).

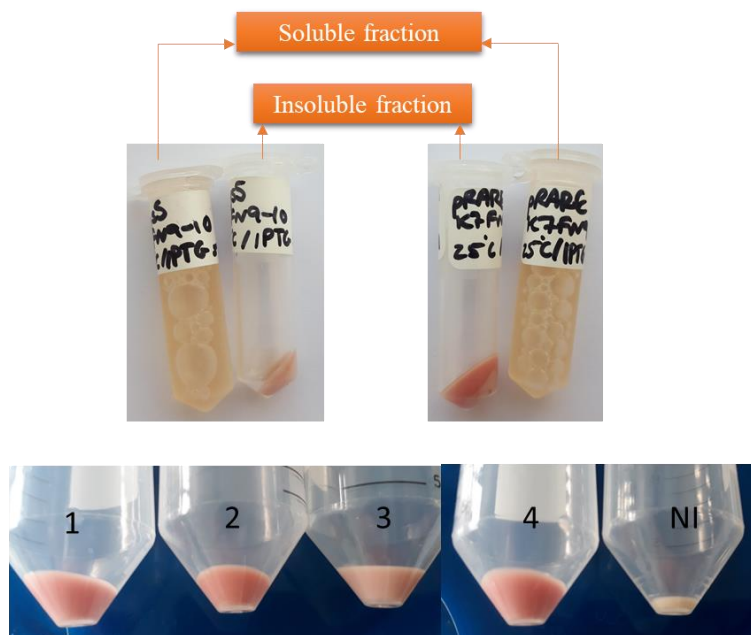


Figure 45 : Suivi de l'expression grâce au partenaire de fusion CMAT : la couleur rouge (tag cyto b5) permet de suivre l'expression de fragment rFNIII9/10 ;

NI : culot bactérien de souche non induite , 1,2,3,5 : fractions culot bactérien de souche induite

En outre, les informations sur l'expression de rFNIII9/10 sont identifiables en suivant la coloration de la fraction soluble et du culot cellulaire récolté sans recourir aux étapes de purifications et d'analyses. Nous avons démontré précédemment une corrélation directe entre l'intensité de coloration rouge des fractions et la protéine produite par la mesure de la DO à 400 nm de chaque échantillon (Miladi et al., 2013). Ce système permet une méthode rapide et efficace pour surveiller l'expression des protéines à différents moments de la production. Ainsi la transposition de la production à l'échelle fermenteur a été validé par suivie de l'expression de la protéine d'intérêt ainsi que l'évolution de la biomasse dans les conditions à l'échelle pilote.

Comme le montre la figure 46, le taux de culture bactérienne ainsi que l'expression de rFNIII9/10 ont augmenté tout au long de la fermentation pour les deux conditions validant ainsi la transposition à l'échelle pilote. Pour la production dans le milieu LB avec l'induction par IPTG, nos résultats indiquent que l'expression soluble de rFNIII9/10 a augmenté avec la croissance bactérienne. Le taux de production de rFNIII9/10 final obtenue est de 2 mg/L avec une DO 600nm finale 3,6.

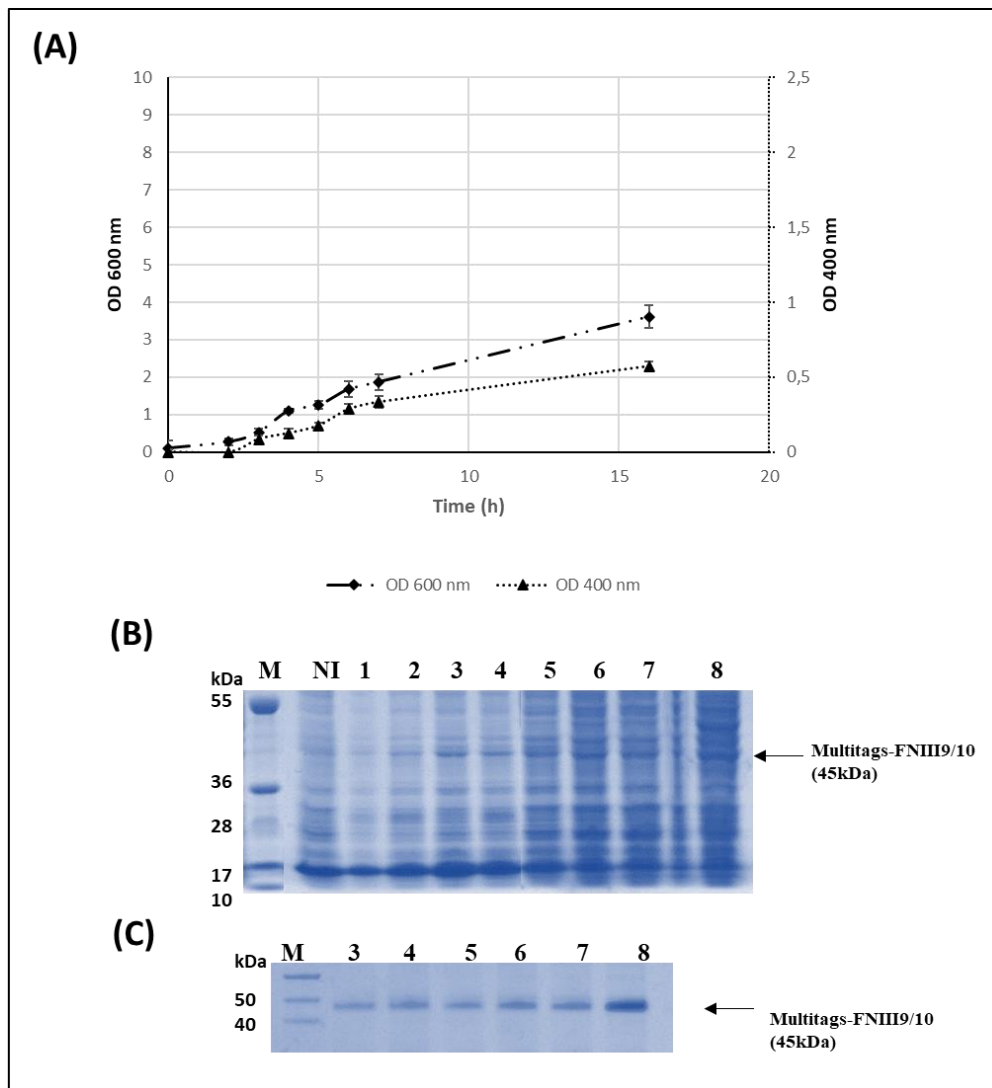


Figure 46 : Suivi de l'expression de rFNIII9/10 produite à l'échelle fermenteur en milieu LB ; (A) Suivi de la biomasse (DO 600 nm) et de la production de du fragment rFNIII9/10 (DO 400 nm) (B,C) Analyse SDS-PAGE de l'expression de rFNIII9/10 au cours du temps (B)Analyse des fractions de protéines totales solubles, (C) Analyse des rFNIII9/10 purifiée ; M : marqueurs de poids moléculaire, 1-8 : Fractions collectées à 1h, 2h, 3h ,4h, 5h, 6h, 7h et 16h de production respectivement

Les résultats de suivi de l'expression ont été également confirmés par analyse SDS-PAGE des fractions solubles ainsi que purifiées. Comme le montre la figure 46, l'intensité de la bande relative de la protéine d'intérêt (Mutitags-FNIII9/10 à 45KDa) s'intensifie au cours temps confirmant l'expression sous forme soluble du fragment d'intérêt.

Comme prévu, une grande quantité de rFNIII9/10 soluble a été obtenue en utilisant un milieu d'auto-induction à l'échelle fermenteur (figure 46). La densité cellulaire dans le milieu d'auto-induction atteint 9,3 de DO finale à 600nm , une densité cellulaire trois fois supérieure à celle obtenue avec un milieu LB. De plus, une augmentation de la DO 400 nm a été observé durant

la production montrant une expression soluble croissante au cours du temps. Le taux de production du fragment d'intérêt obtenus avec le milieu auto-induit est de 20,48 mg/ L.

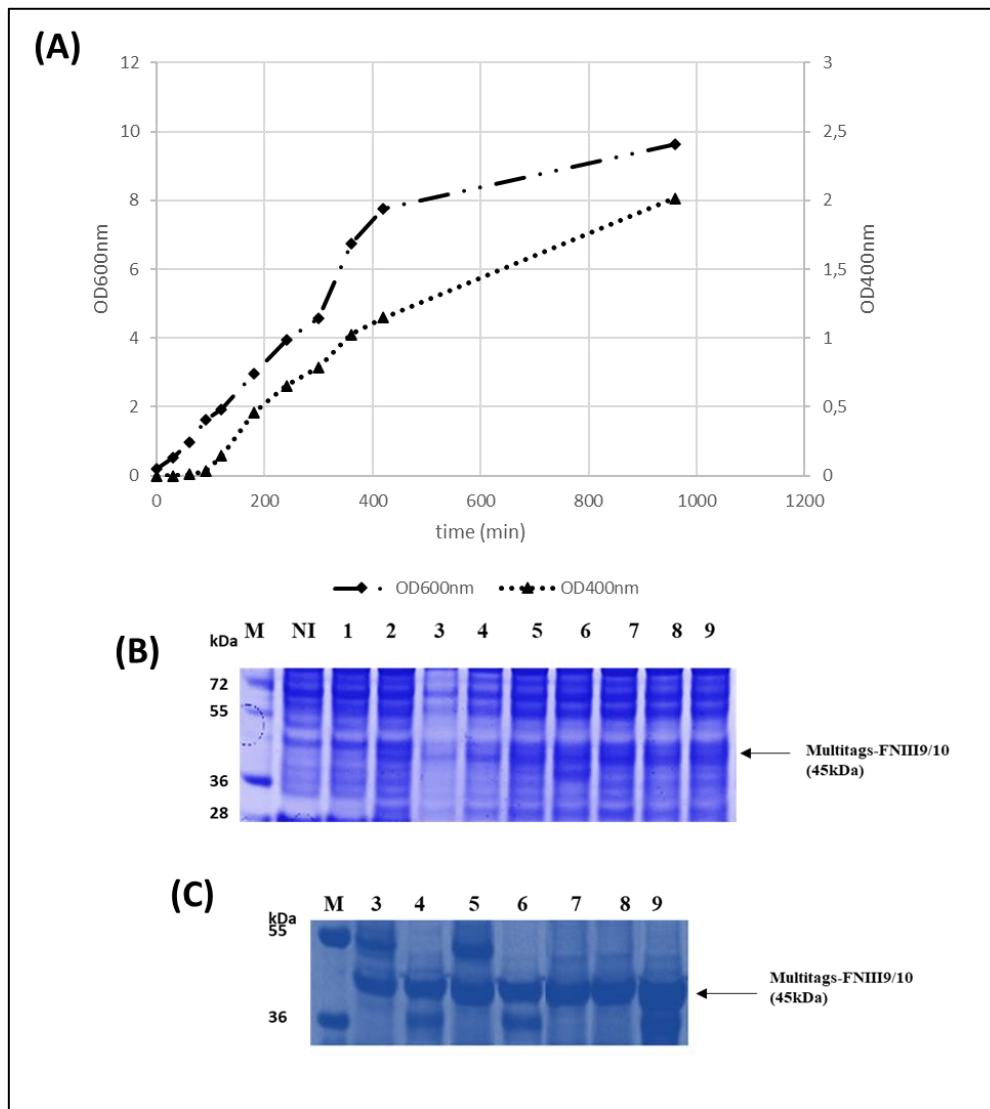
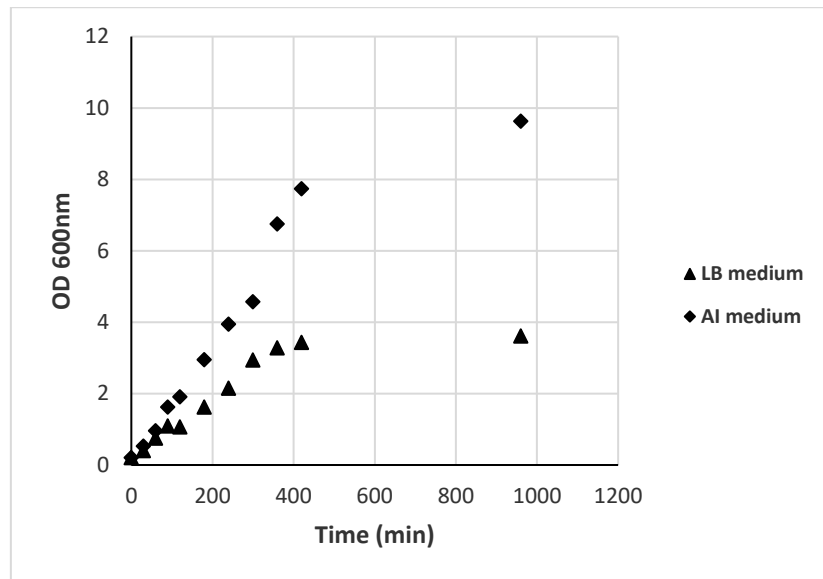


Figure 47 : Suivre de l'expression de rFNIII9/10 produite à l'échelle fermenteur en milieu auto-induit ZYM ;

(A) Suivre de la biomasse (DO 600 nm) et de la production de du fragment rFNIII9/10 (DO 400 nm) (B,C) Analyse SDS-PAGE de l'expression de rFNIII9/10 au cours du temps (B)Analyse des fractions de protéines totales solubles, (C) Analyse des rFNIII9/10 purifiée ; M : marqueurs de poids moléculaire, 1-8 : Fractions collectées à 1h, 2h, 3h ,4h, 5h, 6h, 7h et 16h de production respectivement

Les résultats de la production à grande échelle en batch sont en corrélation avec les expériences d'optimisation réalisées à l'échelle Erlen. Comme observé à l'échelle Erlen, le milieu auto induit a permis une productivité plus élevée : une biomasse 3 fois plus élevée et un taux de production de rFNIII9/10 10 fois plus élevé que celui obtenu en milieu LB.

(A)



(B)

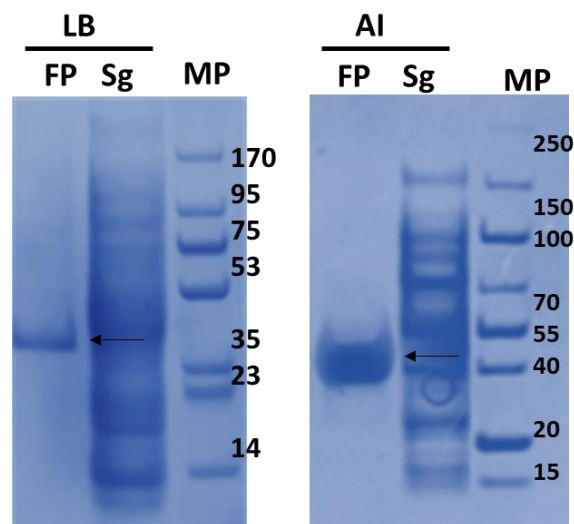


Figure 48 : Analyse comparative de la production de rFNIII9/10 dans les milieux LB et auto-induit à grande échelle ;

(A) l'évolution de la biomasse en fonction du temps en milieu LB et auto-induit, (B) Analyse SDS-PAGE de rFNIII9/10 produit : AI, LB: production en milieu auto-induit ZYM et milieu LB respectivement, MP : marqueurs de poids moléculaire, Sg : protéines totales solubles , FP : fractions purifiées

Ainsi la transposition à grande échelle de la production de rFNIII9/10 a été validée et le multi-tag CMAT a permis efficacement de suivre en temps réel l'expression de la protéine d'intérêt. De plus, le milieu auto-induit ZYM , contenant du glucose, du glycérol et du lactose s'est montré capable de soutenir la croissance bactérienne à des densités cellulaires très élevées à l'échelle bioréacteur de même qu'à l'échelle Erlenmeyer. Le suivi de la production de rFNIII9/10 en milieu auto-induit montre que l'expression du fragment recombinant reste très

faible pendant les premières heures de production contrairement à la biomasse qui augmente au cours du temps. L'expression de la protéine débute ainsi à une densité cellulaire importante ($DO_{600\text{ nm}} \approx 3,7$) (Figure 47). Ces résultats suggèrent que la protéine d'intérêt, dont l'expression est sous la régulation de promoteur inductible par le lactose, reste non induite dans ce milieu jusqu'à l'épuisement du glucose et du glycérol, car la répression catabolique empêche l'assimilation et l'utilisation du lactose (Studier, 2005). Par conséquent, la souche de production se développe dans le milieu auto-inducteur sans exprimer la protéine cible jusqu'à une densité assez élevée ; l'épuisement des facteurs inhibiteurs permet au lactose d'induire l'expression, générant des concentrations élevées de la protéine cible (Studier, 2005). De plus, La densité optique à 600 nm dans le milieu auto-induit a été considérablement plus élevée que dans le milieu LB (Figure 48), apportant une augmentation importante de nombres de cellules dans le milieu et donc de taux de rFNIII9/10 produit plus important. Des travaux de production d'une protéine recombinante proFP2, à grande échelle ont montré des résultats pareils en comparant la production dans le milieu LB et le milieu auto-induit ZYM. La production a été largement amélioré (Sarduy et al., 2012)

En conclusion, dans cette étude, la production de rFNIII9/10 a été transposée à grande échelle avec un taux de production de 20,48 mg/ L atteint en culture en batch de la souche BL21 STAR RARE dans le milieu auto-induit ZYM à 25°C (débit d'air 1 VVM, pH 7). Selon le rendement obtenu dans cette étude, la procédure décrite pourrait fournir une méthode efficace pour atteindre un rendement élevé de FNIII9 /10 recombinant.

VI. Purification et détection des protéines

La double purification par chromatographie d'affinité a été effectuée grâce au partenaire de fusion CMAT contenant l'étiquette 10HIS et le tag SBP. L'analyse sur gel SDS-PAGE des purifications réalisées sur billes de nickel ensuite sur colonne StrepTactII, a révélé la présence de la bande d'intérêt (45 kDa) dans les fractions purifiées. Les résultats présentés sur la figure 49 montrent des contaminants résiduels après purification sur bille de nickel à l'aide de l'étiquette 10 His uniquement. Le fragment a été récupéré avec un degré de pureté supérieur à 95% en utilisant la double purification (figure 49) et aucune autre bande contaminante n'était visible sur le gel SDS-PAGE.

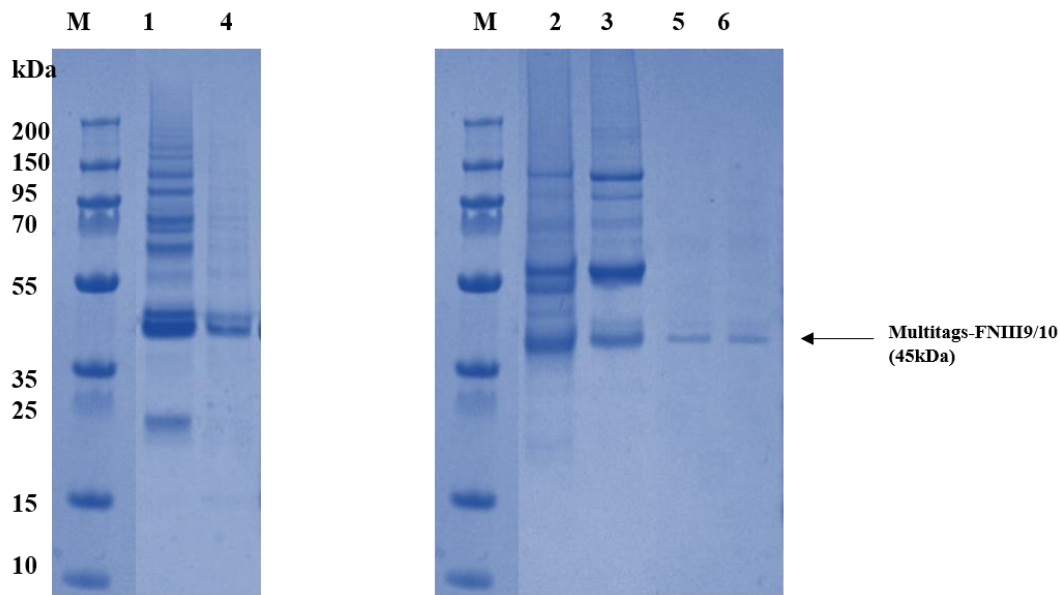


Figure 49 ; Analyse de purification de rFNIII9 / 10

Analyse SDS_PAGE du fragment rFNIII9 / 10 purifié. Les protéines ont été séparées sur des gels de Bis-Tris à 12% (Invitrogen, USA): M: marqueurs de poids moléculaire des protéines. s 1, 2 et 3: protéines purifiées à l'aide de l'étiquette His, ligne 4-6: protéines purifiées avec la double purification à l'aide de l'étiquette His et de l'étiquette SBP comme décrit dans la section «méthodes».

Cette observation indique que la double chromatographie d'affinité effectuée élimine complètement les contaminants. Cependant, plusieurs études ont rapporté la production et la purification des domaines issus de la FN et des contaminants résiduels étaient encore observables après purification des fragments FN marqués His et marqués GST (Petrie et al., 2006; Roy et al., 2011) . Les tags d'affinité sont des outils très efficaces pour purifier les protéines recombinantes à partir des extraits protéiques. Il a été reporté que le tag His, bien qu'il soit très rentable, génère beaucoup contaminants. Des études ont découvert des protéines riches en histidine chez *E. coli* qui interfèrent parfois avec la méthode de purification sur colonne d'affinité en se « co-purifiant » avec les protéines recombinantes marquées His (Bornhorst & Falke, 2000a). La stratégie de purification adoptée dans notre étude a permis d'optimiser la purification de la protéine d'intérêt et de la récupérer avec un degré de pureté élevé, exigé et important pour les applications souhaitées de ce fragment.

VII. Validation de la protéine de fusion par western blot modifiée

Afin de détecter et d'identifier la protéine de fusion rFNIII9/10, une western blot simplifiée a été réalisée en se basant sur l'interaction avec le tag SBP présent sur le partenaire de fusion CMA. Les résultats obtenus de l'analyse de la fraction purifiée ainsi que l'extrait protéique total sont visualisés ci-dessous (Figure 50)

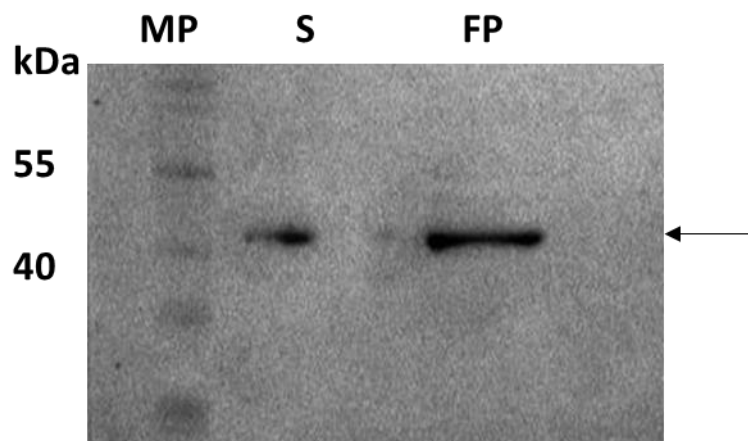


Figure 50 : Analyse par western blot simplifiée de la protéine de fusion CMAT-FNIII9/10
MP : marqueurs de poids moléculaire, S, FP : résultat de l'analyse de la fraction soluble et purifiée respectivement

Le gel ci-dessus montre des bandes localisées au niveau de 45 kDa taille attendue de la protéine de fusion. Cette révélation traduit, en effet, la fixation spécifique du substrat (TMB: tetramethyl benzidine) qu'on a ajouté à la peroxydase couplée à la streptavidine. La streptavidine ayant de l'affinité pour le SBP va s'y fixer. Aucune autre bande supplémentaire n'est détectée sur toute la partie restante du gel, ce qui démontre que la bande visualisée correspond bien à la protéine de fusion.

VIII. Etude de l'activité biologique de FNIII9/10

Afin d'évaluer la bio-activité du fragment produit, son interaction avec les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ a été investiguée. De plus, une surface bio-adhésive a été conçue dans cette étude par coating d'un support non adhésif avec le fragment rFNIII9 / 10. La capacité de la surface à favoriser l'adhésion cellulaire a été étudiée.

VIII.1. Interaction de FNIII9/10 avec les récepteurs intégrines $\alpha 5\beta 1$

Des études ont reporté que la FN se lie aux intégrines via le site RGD localisé dans le domaine III10 alors qu'un site PHSRN synergique (localisé au domaine III9) est essentiel pour la liaison aux intégrines $\alpha 5\beta 1$, en particulier (García et al., 2002; Petrie et al., 2008). Dans le but de valider l'activité biologique du fragment produit, son interaction avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ a été investigué par un test de liaison par affinité entre les deux protéines.

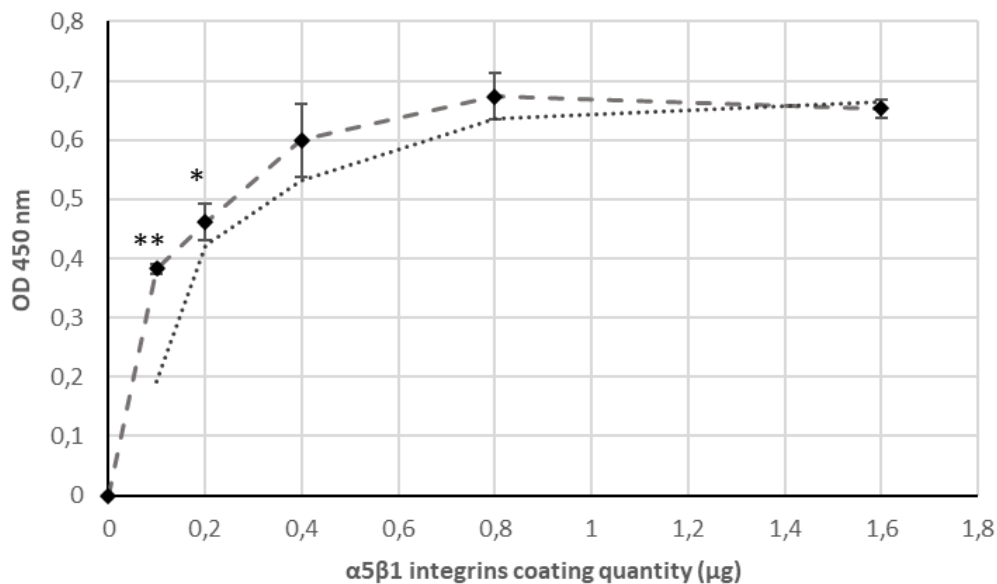


Figure 51 : Evaluation de l'interaction rFNIII9/10 avec les intégrines $\alpha 5\beta 1$

Les résultats obtenus montrent que la liaison du fragment produit aux intégrines $\alpha 5\beta 1$ est directe et dose-dépendante. La figure 51 montre que le taux de FNIII9/10 augmente avec la quantité des intégrines coatées jusqu'à atteindre la saturation. Ces résultats laissent suggérer que le potentiel des intégrines $\alpha 5\beta 1$ à recruter le fragment rFNIII9/10 est sensible car les ligands induisent un profil de recrutement dépendant de la concentration de rFNIII9/10 avec un plateau de saturation (figure 51). Ce résultat confirme que FNIII9/10 se lie spécifiquement et directement aux intégrines $\alpha 5\beta 1$. En résumé, ces résultats indiquent que le rFNIII9/10 produit est un ligand efficace pour les intégrines $\alpha 5\beta 1$.

Par la suite, et afin d'évaluer davantage l'activité biologique du fragment produit, nous nous sommes proposés d'étudier sa capacité à favoriser l'adhésion cellulaire sur des surfaces non traitées.

VIII.2. Adsorption passive de rFNIII9 / 10 sur la surface de des puits de plaque

Afin d'évaluer la densité du ligand adsorbé sur les puits de plaque de polystyrène, une technique simple et performante basée le tag SBP et son affinité à la Streptavidine a été réalisée. Une concentration croissante de la solution de rFNIII9/10 a été ajoutée dans des puits de plaque et la densité de la protéine adsorbée a été déterminée par un test d'immobilisation lié à une enzyme en utilisant la streptavidine HRP.

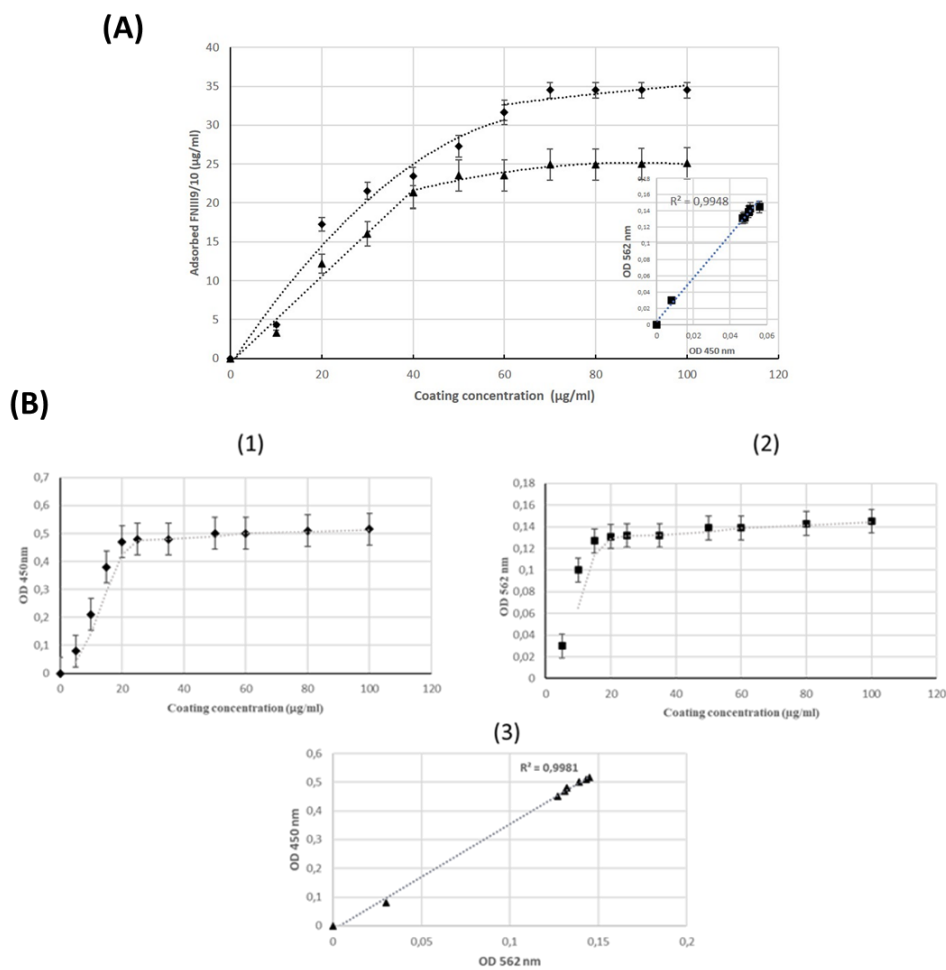


Figure 52 : Etude de l'adsorption de rFNIII9/10 sur les puits de plaques

(A) Protéines passivement adsorbées en fonction de la concentration de coating pendant 1h (▲) et une nuit (●) d'incubation ; (B) Corrélation entre le dosage BCA et la méthode d'immobilisation liée à l'enzyme utilisée pour la quantification des protéines adsorbées $R^2 = 0.9948$: En bref, (1) les protéines adsorbées ont été quantifiées par la méthode basée sur le test d'immobilisation liée à l'enzyme (Miladi et al., 2013) grâce au tag SBP, et (2) le kit de dosage BCA a été utilisé pour quantifier les protéines adsorbées (3) la corrélation entre le test d'immobilisation liée à l'enzyme et le BCA ; OD450nm en fonction de OD562nm.

Les résultats obtenus montrent qu'à faible concentration déposée de rFNIII9/10, des différences dans les quantités de protéine adsorbée ont été détectées. L'adsorption a augmenté avec la concentration initiale déposée de fragment lorsqu'elle était moins de 60 µg/mL ($R^2 = 0,75$, valeur $p(H_0 ; \text{pente} = 0) < 0,05$) et 40 µg/mL ($R^2 = 0,844$, valeur $p(H_0 ; \text{pente} = 0) < 0,05$) pendant 1 h et une nuit de traitement, respectivement. La densité de surface du fragment a atteint la saturation à une concentration de revêtement proche de 60 µg/mL pour 1 h de traitement ($R^2 = 0,6$, valeur $p(H_0 ; \text{pente} = 0) > 0,05$) et 40 µg/mL ($R^2 = 0,75$, valeur $p(H_0 ; \text{pente} = 0) > 0,05$) pour un traitement de nuit (Figure 51.A). Grâce aux partenaires de fusion CMAT, la détection rapide et sensible du rFNIII9/10 adsorbée a été permise grâce à l'interaction directe entre une streptavidine HRP et des étiquettes SBP présentées dans CMAT. La corrélation entre cette méthode et la quantification BCA a été confirmée comme le montre la figure 52. Ainsi, la technologie de fusion CMAT offre une méthode de suivi rapide pour l'adsorption des protéines sur des supports.

VIII.3. Etude de l'adhésion cellulaire sur les surfaces développées

Dans un premier temps, l'adhésion cellulaire a été étudiée, sur des surfaces avec ou sans revêtement initial de rFNIII9/10 après 2 h d'incubation dans un milieu sans sérum. Cette approche a permis d'évaluer le potentiel du fragment recombinant rFNIII9/10 à favoriser l'adhésion des cellules. Les résultats obtenus montrent que l'adhésion cellulaire a été significativement améliorée sur les surfaces traitées avec rFNIII9/10 par rapport au témoin. D'autre part, une augmentation de manière dose-dépendante de l'adhésion cellulaire sur les surfaces coatées avec le rFNIII9/10 (Figure 53) a été observée. Les observations des cellules confirment bien ces résultats ; le nombre de cellules adhérentes à la surface non coatée est significativement plus faible par rapport aux surfaces traitées par le fragment FNIII9/10. D'ailleurs, en comparant la morphologie cellulaire des cellules adhérentes, les cellules sur les surfaces traitées par rFNIII9/10 sont mieux étalées (Figure 53). Ces résultats valident le potentiel bio adhésif du fragment produit et montrent aussi que l'adhésion des cellules aux surfaces traitées par FNIII9/10 est dose dépendante. L'augmentation du nombre de cellules adhérentes résultaient probablement d'une sensibilité plus élevée des intégrines avec la quantité de rFNIII9/10.

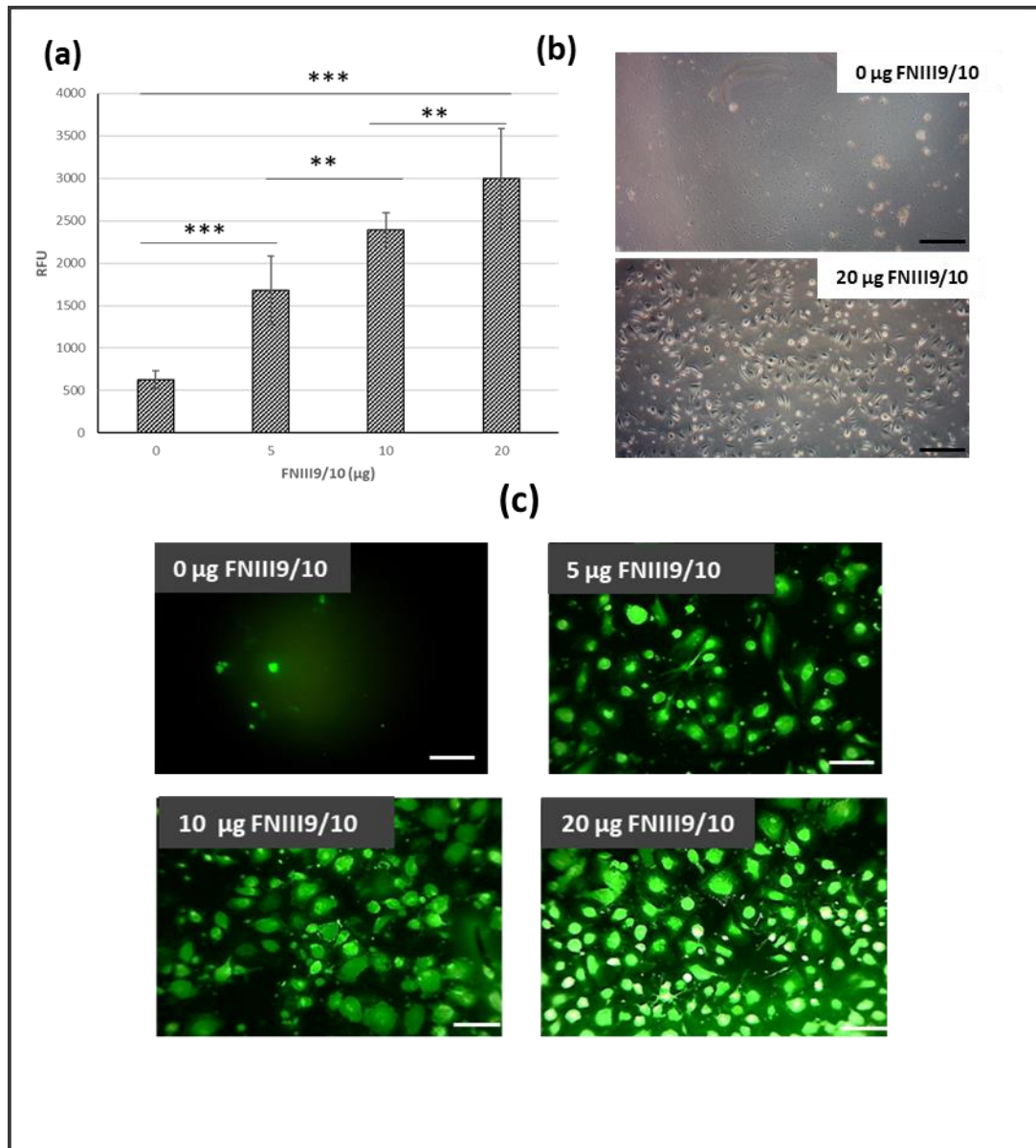


Figure 53 : Etude de l'adhésion cellulaire sur les surfaces coatées par le fragment FNIII9/10 ; Effet de la densité de surface du rFNIII9/10 sur l'adhérence des hGF ; L'adhésion a été étudiée en milieu sans sérum sur différentes surfaces coatées de rFNIII9/10 : [0 µg, 5 µg, 10 µg et 20 µg de rFNIII9/10 adsorbé] pendant 2 h d'adhésion ; les cellules ont été marquées avec un marqueur de fluorescence Calcein AM ; (a) Évaluation des cellules adhérentes ; (b) Image de cellules adhérentes sans marquage pour les surfaces non revêtues et revêtues de rFNIII9/10 (échelle de grossissement 10X). (c) Image de cellules hGF calcinées adhérant aux surfaces traitées/non traitées pendant 2 h (échelle de grossissement 20X). Les données sont exprimées en unités de fluorescence relative (RFU) moyennes de puits en triple \pm SEM. * Significativement différent $p < 0,05$ (ANOVA), ** élevé significativement différent $p < 0,02$ (ANOVA), *** très élevé Signif-icativement différent $p < 0,01$ (ANOVA)

Nous avons, en outre, étudié l'adhésion précoce des cellules sur les surfaces développées dans l'intention de suivre la réponse cellulaire précoce et l'adhésion accélérée. L'adhésion des cellules a été observée pendant 1, 2 et 3 heures d'ensemencement sur les surfaces de puits

revêtues de rFNIII9/10 à saturation. Les résultats ont montré une différence d'adhérence à partir de 1 h après l'ensemencement des cellules par rapport aux puits non coatés.

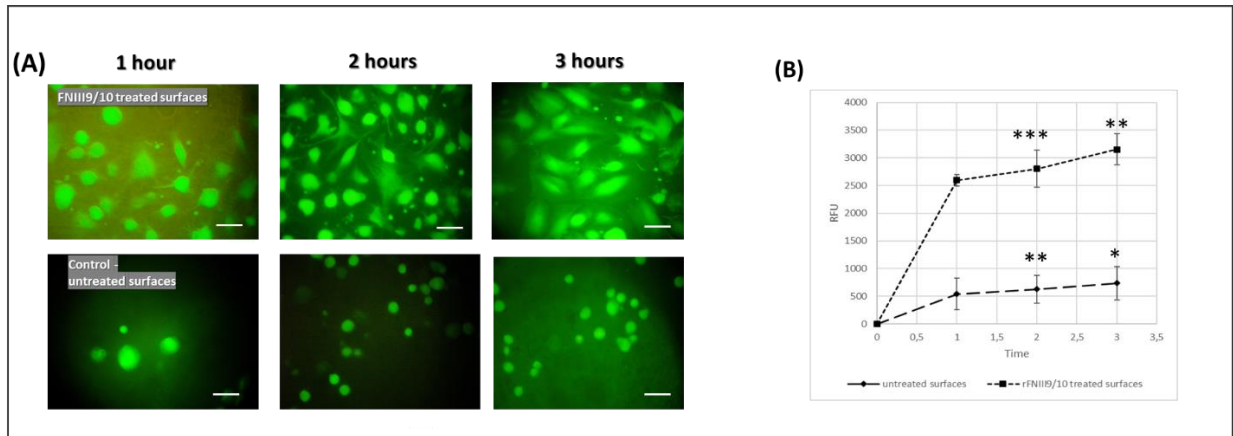


Figure 54 : Adhésion cellulaire précoce pendant 3 h d'incubation;

L'adhésion cellulaire a été étudiée pendant 1, 2 et 3 h, les cellules ont été marquées avec le marqueur de fluorescence Calcein AM. (A) Micrographies de cellules adhérentes marquées par fluorescence à différents temps d'incubation étudiés (1, 2 et 3 h) pour le contrôle négatif et les surfaces traitées par rFNIII9/10 (échelle de grossissement 40X). (b) Évaluation des cellules adhérentes : Unités de fluorescence relative (RFU) en fonction du temps.

Comme le montre la figure 54, l'adhérence était significativement supérieure à celle observée sur les surfaces non traitées pendant la durée étudiée ($p < 0,02$ ANOVA) et les cellules adhérentes aux surfaces rFNIII9/10 présentent une morphologie fibroblastoïde et sont déjà bien réparties et étalées après une heure d'adhérence (Figure 54). La réponse cellulaire a été ainsi accélérée en présence du fragment bio-adhésif FNIII9/10 laissant supposer que ce dernier provoque une activation des intégrines induisant une signalisation cellulaire pour une adhésion médiée par les intégrines. En conclusion, ces résultats indiquent que le fragment rFNIII9/10 améliore l'adhésion cellulaire médiée par l'intégrine. De plus, les surfaces bioadhésives avec FNIII9/10 immobilisé présentent des niveaux d'adhésion cellulaire avec une réponse dose-dépendante et permettent une fixation cellulaire précoce

Un effort important est fait pour mieux comprendre et contrôler les interactions ECM-intégrine car il est essentiel pour de nombreuses applications, y compris le développement de matériaux biomimétiques. Dans cette étude, un fragment bioactif dérivé de domaines de liaison aux cellules de la fibronectine a été produit et validé. Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

- La production du fragment rFNIII9/10 a été optimisée et transposée à grande échelle. Le rendement de production du fragment recombinant a atteint ~20 mg/ L dans les conditions optimales d'expression identifiées à l'échelle fermenteur.
- L'évaluation de l'activité biologique du fragment produit valide son interaction avec les intégrines et montre qu'il supporte l'adhésion cellulaire sur les surfaces revêtues
- Le partenaire de fusion utilisé (multitag CMAT) a fourni une technologie simple et efficace pour la caractérisation du fragment comme décrit précédemment (Miladi et al.2011).

Cette étude visait à produire les sites fonctionnels des domaines de liaison aux cellules de la fibronectine et à développer une approche simple et efficace pour ses études de caractérisation et d'adsorption. Le domaine de liaison aux cellules FN a été identifié et plusieurs rapports ont démontré l'implication du motif RGD localisé dans le 10^{ème} domaine FN de type III (FNIII10) dans l'activation des intégrines (Krammer et al., 2002) (Altroff et al., 2001). De plus, l'interaction spécifique de l'intégrine alpha 5 bêta 1 nécessite un site synergique PHSRN contenu dans le 9^{ème} domaine FN de type III (FNIII9) qui a démontré une amélioration de l'adhésion (Bentmann et al., 2010). Par conséquent, les 9^{ème} et 10^{ème} domaines de FN de type III (FNIII9/10) offrent des caractéristiques intéressantes pour l'ingénierie de ligands bioadhésifs. Bien que les fragments bioadhésifs recombinants dérivés du domaine de liaison à l'intégrine de la fibronectine ont montré un potentiel élevé dans le contrôle des réponses cellulaires et ont reçu beaucoup d'attention au cours de la dernière décennie, l'accent a toujours été mis sur leurs utilisations potentielles et leur bioactivité (Martino et al., 2009b; Petrie et al., 2006; Roy et al., 2011). Peu de chercheurs ont abordé la thématique de la stratégie de l'expression sous forme soluble et efficace pour la production de fragments recombinants avec des rendements élevés. L'expression soluble de ces fragments bioactifs est moins étudiée et un faible rendement de production a été observé dans presque toutes les études (Cutler & García, 2003). Les travaux de S. G. Kim et al. ont investigué l'optimisation de la production d'une protéine de fusion combinant le domaine 9 et 10 de la FNIII et l'ostéocalcine chez *E. coli* (M. S. Kim et al., 2020). La température d'induction, la concentration d'inducteur et le temps d'induction ont été évalués chez la souche Nico21 de *E. coli*. Les résultats obtenus ont montré que l'expression relative optimale avec la souche induite à 20 °C avec 0.1% d'arabinose sans précision de rendement de production en quantité ni en concentration. Une étude de Petrie et

al. (2006) a cité une quantité de 2 mg/ L pour la production des domaines 7 à 10 de FNIII (FNIII7-10). Ainsi des faibles rendements de production de ces domaines fonctionnels sont observés dans les études dans ce domaine. Ces limitations restent critiques pour leur future application comme le revêtement de biomatériaux qui nécessitent une grande quantité de protéines purifiées. A l'issue de cette observation et dans l'objectif de mettre au point un procédé de production de rFNIII9/10 efficace générant des rendements élevés chez *E. coli* nous avons étudié les différents paramètres influençant sur l'expression soluble des protéines recombinant chez ce système. L'étude d'optimisation nous a permis d'identifier les conditions optimales d'expression de rFNIII9/10 : souche BL21 STAR RARE cultivée dans le milieu auto-induit ZYM à une température d'induction de 25°C générant un rendement de production de 20 mg/L à l'échelle bioréacteur. La stratégie de production rFNIII9 / 10 avec un rendement élevé, décrite dans ce travail, est très importante pour les applications biotechnologiques et biomédicales ultérieures de ce fragment, en particulier la fonctionnalisation des biomatériaux. D'autre part , les domaines de la fibronectine ont été largement exprimés avec des partenaires de fusion à la fois pour la purification en utilisant le tag His (Kimizuka et al., 1991; Peisley and Gooley, 2007) et le GST-tag (Mardon and Grant, 1994; Roy, 2010) ou pour améliorer la biofonctionnalité en utilisant la cadhérine (Y. Zhang et al., 2010) et le facteur de croissance kératinocytes (Kang & Jang, 2009a). Dans ce travail, nous décrivons pour la première fois la production du domaine de liaison cellulaire de la fibronectine humaine de type III (FNIII9/10) contenant le motif RGD et la séquence synergique PHSRN en fusion avec le multitag (CMAT), précédemment reportée dans nos travaux (Miladi et al., 2013), chez *E. coli*. Il a été initialement confirmé que le fragment était récupéré avec une pureté élevée (95%) en utilisant la double purification par chromatographie d'affinité grâce au partenaire de fusion CMAT. Bien que le degré de pureté soit d'un intérêt particulier pour l'application souhaitée de ces molécules bioactives. Les études antérieures s'intéressent moins à ce paramètre. Les contaminants résiduels étaient observables après marquage His (Elloumi et al., 2009) et marquage GST (Roy, 2010) pour la purification des fragments issus de FN. Cela a également été observé dans Keefe et al., Résultats qui ont montré un degré de purification plus faible avec la chromatographie utilisant l'étiquette His (Keefe et al., 2001a) . Dans cette étude, l'utilisation de partenaires de fusion multitag a permis une double chromatographie d'affinité en se basant sur les deux tags de purification His et SBP, qui élimine complètement les contaminants comme le montre nos résultats dans la figure 48. Ce résultat souligne l'importance des stratégies d'ingénierie bimoléculaire et fournirait une approche robuste pour la purification des fragments recombinants de FN. Le domaine de liaison des cellules centrales FN a été bien étudié et il a été démontré que le motif RGD contenant

FNIII10 se lie à plusieurs intégrines tandis que le site PHSRN de compression FIII9 est requis pour se lier spécifiquement à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Altroff et al., 2001; García et al., 2002). Ici, nous avons confirmé cette interaction en réalisant un essai de binding par affinité entre l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et le fragment FNIII9/10 recombinant comme ligand. Les résultats ont montré que rFNIII9/10 se lie avec succès aux intégrines $\alpha 5\beta 1$. Par conséquent, on peut supposer que rFNIII9/10 interagit directement avec les intégrines $\alpha 5\beta 1$. Ce résultat est en accord général avec les études précédentes explorant l'action synergique du motif RGD et du site PHSRN pour l'interaction $\alpha 5\beta 1$ intégrines-FN (Y. Feng & Mrksich, 2004; García et al., 2002). L'activité bio-adhésive du fragment recombinant a ensuite été explorée en coatant une surface non adhésive avec le fragment FNIII9/10 pour générer des interfaces bio adhésives. Plusieurs chercheurs ont fonctionnalisé des surfaces avec des peptides mimétiques de la fibronectine soutenant l'adhésion cellulaire et démontrent la sensibilité exquise des intégrines $\alpha 5\beta 1$ se liant aux perturbations dans l'orientation de RGD-PHSRN comme dans le FN natif (Altroff et al., 2001; Y. Feng & Mrksich, 2004; Mezzenga & Mitsi, 2018). De plus, des rapports ont montré que la chimie de surface modulait la quantité et la conformation des fragments de FN adsorbés, ce qui affectait significativement son activité bio-adhésive (Liamas et al., 2018). Dans cette étude, un test simplifié pour évaluer le rFNIII9/10 adsorbé passivement sur la surface des puits a été développé. Les résultats ont montré une corrélation linéaire de la méthode utilisée avec les dosages et de quantification des protéines basique (dosage BCA). Une augmentation linéaire du rFNIII9/10 adsorbé avec l'augmentation de la concentration du revêtement a été observée pour des concentrations allant jusqu'à 40 $\mu\text{g} / \text{ml}$ et 60 $\mu\text{g} / \text{ml}$ pendant 60 min et une nuit respectivement et un plateau de saturation a été identifié pour les concentrations les plus élevées suggérant que ces concentrations étaient suffisantes pour saturer les surfaces de la plaque (valeur p (H_0 ; pente = 0) > 0,05). Enfin, la capacité à promouvoir l'attachement cellulaire du fragment conçu a été évaluée. Le revêtement de surfaces non adhésives avec rFNIII9/10 s'est avéré, comme prévu, être efficace pour favoriser l'adhésion cellulaire. De plus, une faible densité de rFNIII9/10 était suffisante pour augmenter l'adhésion cellulaire par rapport au contrôle négatif (absence de revêtement rFNIII9/10). L'adhérence cellulaire améliorée sur les surfaces fonctionnalisées par le fragment rFNIII9/10 peut être attribuée à une liaison aux intégrines $\alpha 5\beta 1$. Il est hypothétique que le motif RGD et PHSRN soient présentés dans la même conformation que le FN natif conduisant à une affinité de liaison aux récepteurs plus élevée. Par ailleurs, Petrie TA et al. (2006) ont montré que des domaines recombinants de FN (FNIII7-10) en fusion avec une séquence de marquage de biotine à l'extrémité N terminale étaient toujours capables d'activer la phosphorylation de FAK (Focal Adhesion Kinase) (Petrie et al.,

2006). La FAK active diverses cascades de signalisation régulant la survie, la prolifération et la différenciation cellulaires (Wozniak et al., 2004). Petrie TA et al. obtenu des niveaux d'adhésion similaires à ceux rapportés dans notre étude avec une activation FAK validée. Nous pouvons clairement voir que les propriétés bioadhésives des surfaces modifiées par rFNIII9/10 peuvent être attribuées aux liaisons intégrine-ligand qui ont la capacité de promouvoir la signalisation intracellulaire du fragment recombinant. En résumé, cette étude fournit un accord général avec les rapports précédents dans le domaine des interactions de l'intégrine de la fibronectine $\alpha 5\beta 1$ et une stratégie expérimentale alternative pour concevoir et étudier les domaines de la fibronectine recombinante à l'aide de la technologie de fusion.

Enfin, il a été démontré que le rFNIII9 / 10 conçu interagissait directement avec les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et était efficace dans la promotion de l'adhésion cellulaire sur les surfaces d'attache. Cela en fait un fragment bioactif intéressant qui pourrait potentiellement être utilisé pour améliorer la bio-intégration des échafaudages d'ingénierie tissulaire et dans les dispositifs biomédicaux.

IX. Conclusion :

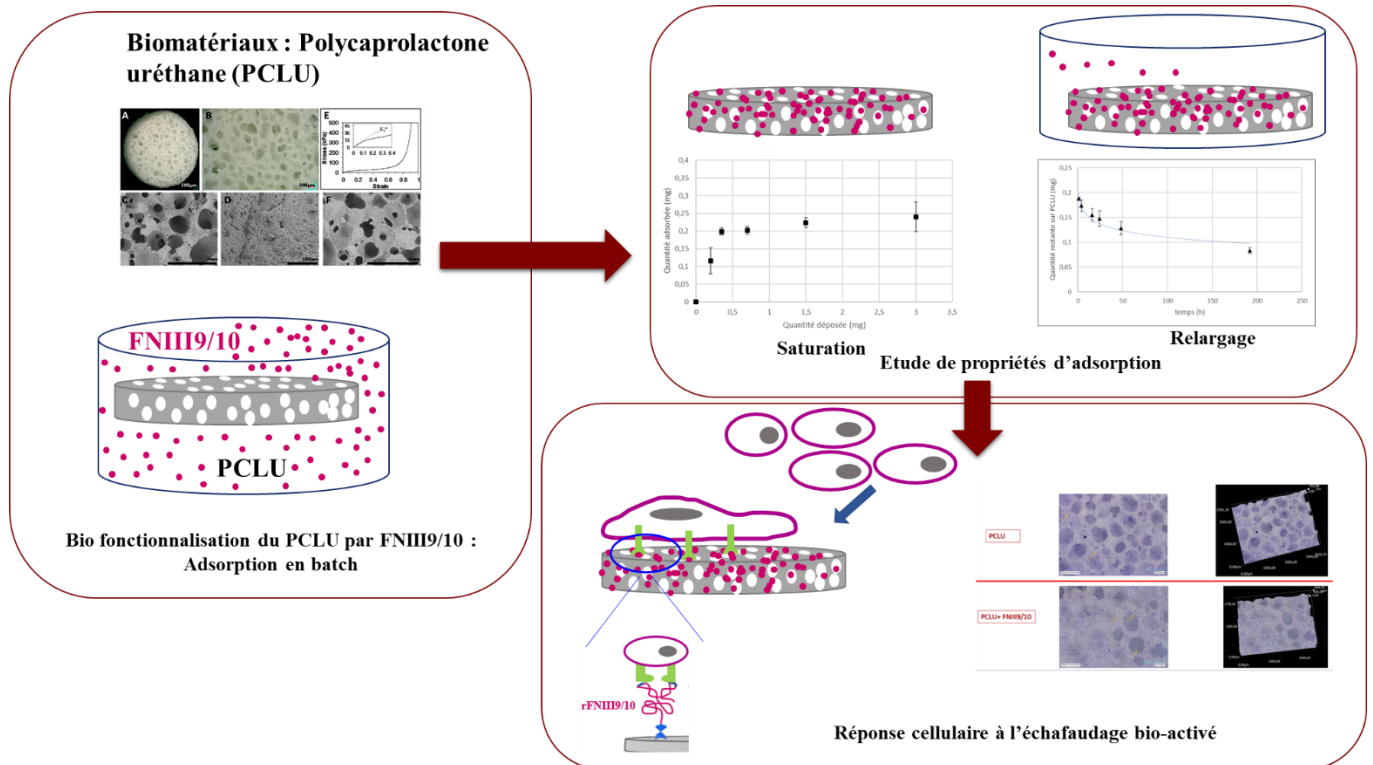
Dans cette étude, un ligand bio-adhésif comprend des domaines de liaison cellulaire de la fibronectine humaine a été conçue à l'aide de la technologie des protéines recombinantes. Les 10^{ème} et 9^{ème} domaines de fibronectine de type III contenant le site synergique RGD et PHSRN (FNIII9-10) ont été exprimées en fusion avec une étiquette multi-affinité colorée "CMAT" pour développer un processus de production et de caractérisation productif et simplifié. Le fragment recombinant a été produit dans le système bactérien *E. coli*. Un processus de production optimisé à grande échelle résultant d'une quantité 5 fois plus élevée de rFNIII9/10 est décrit dans ce travail. L'optimisation combinée de l'expression soluble de rFNIII9/10 a été réalisée en étudiant les conditions d'induction, les souches d'*E. coli* et l'effet du milieu de croissance sur la production de protéines. Une transposition à l'échelle bioréacteur de 3 L dans des conditions optimales a été réalisée et l'expression des protéines solubles a atteint 20 mg / L de milieu de culture. Le fragment a été purifié par une double chromatographie d'affinité pour atteindre un rendement de pureté élevé. Les surfaces bio-adhésives ont été développées par revêtement passif du fragment produit sur un modèle de surfaces non adhésives. Enfin, l'activité biologique

du FNIII9/10 recombinant a été validée par une étude d'adhésion cellulaire et l'interaction avec les intégrines $\alpha5\beta1$ a été validée avec succès par un essai de binding en utilisant le fragment produit comme ligand. Ces résultats sont des supports solides pour le développement de stratégies de bio activation pour des applications biomédicales et biotechnologiques.

Chapitre IV

Elaboration d'un échafaudage bio adhésif

X. Résumé graphique :



XI. Préambule :

Dans le chapitre précédent, un ligand bio-adhésif issu de domaines de liaison aux cellules de la fibronectine humaine (FNIII9/10) a été produit et validé. La propriété bio-adhésive du fragment produit a été confirmée et il s'est avéré soutenir l'adhésion cellulaire sur des surfaces traitées. Nous nous sommes intéressés ensuite à l'application envisagée du fragment produit à savoir la bio-fonctionnalisation des biomatériaux. Notre objectif était ainsi le développement d'un biomatériau bio-actif par le fragment FNIII9/10.

XII. Introduction

Ce chapitre porte sur le développement d'un échafaudage bio-adhésif par exploitation des propriétés biologiques du fragment mis au point dans la première partie de cette étude. La stratégie d'élaboration de ce biomatériau de nouvelle génération est l'adsorption de fragment bio-adhésif FNIII9/10 à leur surface dans le but d'accélérer la reconnaissance spécifique des matériaux par les récepteurs cellulaires et permettre leur adhésion. Lors d'une étude précédente, il a été démontré que des échafaudages synthétiques à base de poly (ϵ -caprolactone uréthane) (PCLU) sont des supports relativement adéquats pour les applications de régénération de tissu osseux. En effet, les biomatériaux poreux sont de plus en plus utilisés en chirurgie réparatrice

pour plusieurs raisons notamment leur potentiel à permettre une colonisation cellulaire plus importante, un dépôt de la matière organique et la mise en place d'une vascularisation. La présence d'une porosité ouverte et interconnectée est une propriété très recherchée et importante car elle favorise également la circulation de liquides physiologiques qui sont important pour l'établissement des échanges ioniques entre le tissu et le biomatériau et indispensables pour la croissance et la différenciation cellulaire à long terme. Des échafaudages élastomères en poly (ϵ -caprolactone uréthane) (PCLU) ont été conçus en utilisant un processus d'émulsion à phase interne élevée. Les PCLUs élaborés ont une taille de pores allant de moins de 150 μm à 1800 μm et une porosité de 86%, ce qui les rend adaptés aux applications d'ingénierie tissulaire osseuse. De plus, les pores interconnectés, favorisant la cellularisation et la future croissance osseuse. Les propriétés physicochimiques des échafaudage PCLU répondent aux critères structurels appropriées, toutefois, il reste à surmonter des problèmes de bio-intégrations car l'inconvénient majeur des biomatériaux synthétique est leur faible interaction biologique avec le système vivant. Ainsi l'échafaudage PCLU doit posséder des propriétés bio-adhésives améliorés afin de faciliter et accélérer la reconnaissance cellulaire. Comme reporté dans le chapitre précédent nous avons produit le ligand bio adhésive FNIII9/10 issue de domaine d'interaction de la fibronectine humaine avec les intégrines. Ce chapitre s'intéresse alors à la bio-activation des échafaudages PCLU synthétique par le fragment recombinant FNIII9/10 mis au point dans le cadre de cette thèse. Nous avons fonctionnalisés leur surface par adsorption passive du FNIII9/10 ainsi d'obtenir un biomatériau adhérent avec des propriétés biologiques amélioré. Le résultat ciblé est une réponse cellulaire locale plus rapide des cellulesensemencées à cette surface.

La première partie de l'étude consiste à déterminer les propriétés d'adsorption du FNIII9/10 sur le PCLU en évaluant les concentrations de saturation puis le relargage du fragment FNIII9/10. Cette étude a été suivie pendant 10 jours afin d'examiner la stabilité de l'association PCLU-FNIII9/10. La deuxième partie consiste à étudier l'adhésion et la prolifération cellulaire sur l'échafaudage (PCLU-FNIII9/10).

XIII. Construction de l'échafaudage adhésif PCLU-FNIII9/10

Plusieurs approches sont proposées dans la littérature pour incorporer des groupes fonctionnels ou immobiliser des biomolécules sur des biomatériaux. Ces approches sont principalement l'adsorption physique, le couplage covalent chimique et encapsulation. L'adsorption physique est la méthode la plus pratique et la plus courante pour le revêtement des échafaudages avec des biomolécules (Casanova et al., 2020a). Basée sur les interactions de van der Waals, les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes, la stratégie d'adsorption physique remplit la fonctionnalisation biologique des échafaudages tout en évitant d'altérer le potentiel et les caractéristiques originaux des biomolécules et des échafaudages (Casanova et al., 2020a). Afin de fonctionnaliser la surface des échafaudages PCLU, notre approche implique l'adsorption de FNIII9/10 à sa surface.

XIII.1. Etude de l'adsorption du FNIII9/10 sur le PCLU

Des disques de PCLU (5mm de diamètre/ 2 mm d'épaisseur) ont été préparés comme décrit dans la partie « matériels et méthodes ». La bio-activation de l'échafaudage PCLU a été réalisée par imprégnation dans la solution de FNIII9/10 tamponnées à pH 7,4. Les conditions d'équilibres ont été déterminées par des tests d'optimisation préalable et nous avons identifié 4h 30 le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre de l'adsorption sous vide. Différentes concentrations de la solution FNIII9/10 ont été étudiées : 200 µg/ml ; 350 µg/ml , 700 µg /ml, 1500 µg /ml et 3000 µg/ml. La quantité de protéine adsorbée a été mesurée pour chaque expérience. L'isotherme d'adsorption (figure 55) représente la quantité de FNIII9/10 adsorbée en fonction de la quantité initiale déposée (C0).

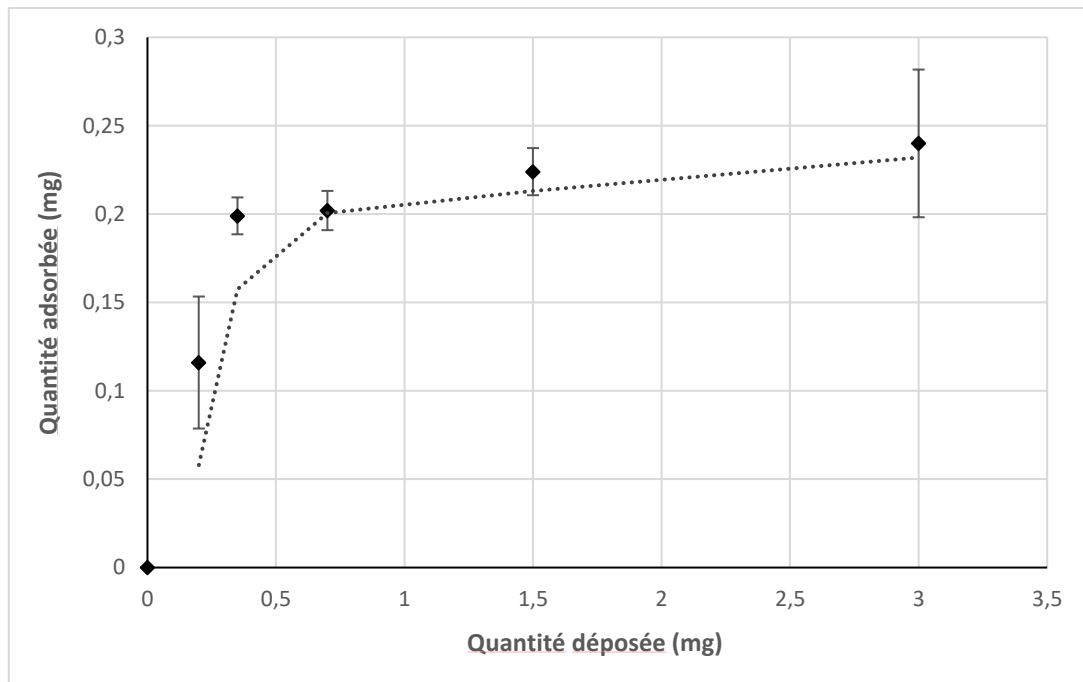


Figure 55 : Isotherme d'adsorption de la FNIII9/10 sur les disques PCLU en tampon PBS p7,4

La figure 55 correspond à l'isotherme d'adsorption obtenu, pour lequel la quantité de protéines adsorbées est représentée en fonction de la quantité de protéine initiale déposée. Les résultats montrent que la rFNIII9/10 s'adsorbe sur le PCLU et que la quantité de protéine absorbée augmente en fonction de la quantité initialement déposée, ensuite se stabilise avant saturation. Les échafaudages PCLU ont une porosité très élevée avec des pores interconnectés ce qui rend le calcul de la surface de contact impossible. Afin de déterminer les niveaux de saturation de la FNIII9/10 sur la PCLU dans ces conditions, les quantités de FNIII9/10 adsorbée sont ensuite ajusté à la masse de biomatériau et les résultats sont exprimé en mg de FNIII9/10 adsorbée par g de PCLU.

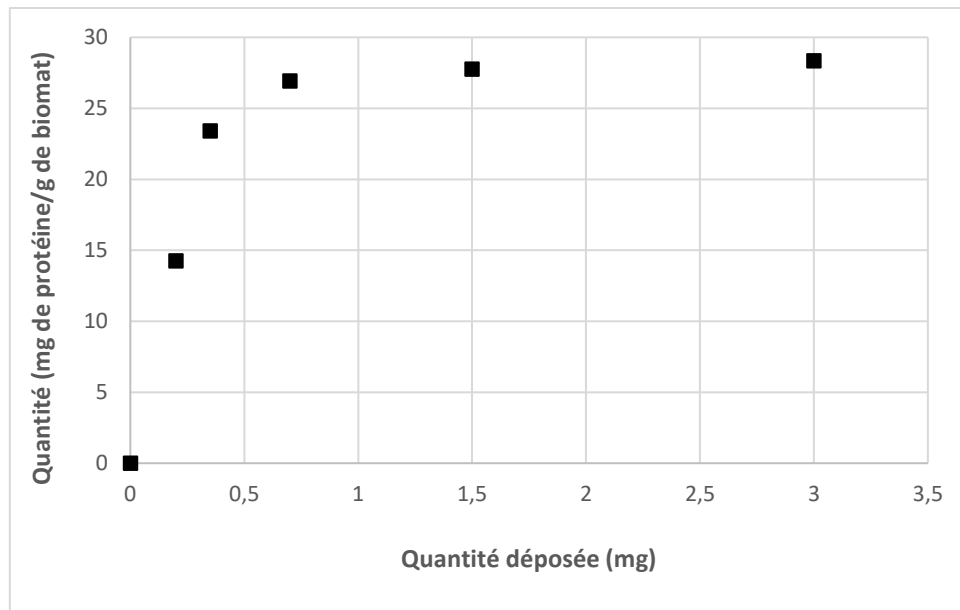


Figure 56 : Isotherme d'adsorption de FNIII9/10 à pH 7 ajusté par masse de PCLU

Le niveau de saturation est directement observé sur l'isotherme d'adsorption. Les résultats montrent que la quantité de protéine adsorbée augmente avec de la quantité déposée jusqu'à atteindre un plateau à une quantité 0,7 mg de FNIII9/10 déposée. Aucune différence significative de la quantité de protéine adsorbée n'est observée après cette valeur. La saturation de la FNIII9/10 sur l'échafaudage PCLU est obtenu à une quantité 26mg de FNIII9/10 / g de PCLU (figure 56). Les caractéristiques de l'adsorption de FNIII9/10 sur le PCLU à savoir la quantité de protéine adsorbée et la constante d'adsorption ont été déterminé à partir de l'isotherme d'adsorption obtenue typique de l'adsorption des protéines sur des supports hydrophobes. L'adsorption des protéines sur des surfaces a été largement étudié dans la littérature et plusieurs modèles ont été proposé pour expliquer l'interaction de la protéine et le support ainsi pour décrire l'adsorption. Pour aller plus loin dans la description et étudier les mécanismes d'adsorption, nous avons appliqué les résultats de l'adsorption obtenus sur les modèles le plus répondu pour l'adsorption des protéines retrouvés dans la littérature : le modèle le Langmuir et le modèle de Freundlich. Le concept général de modèle de Langmuir repose sur l'uniformité des sites d'adsorption de surface, avec la formation de monocouches d'adsorption. Ce modèle prend également en compte les interactions indépendantes des sites voisins et les possibilités d'équilibre dynamique d'adsorption et de désorption.

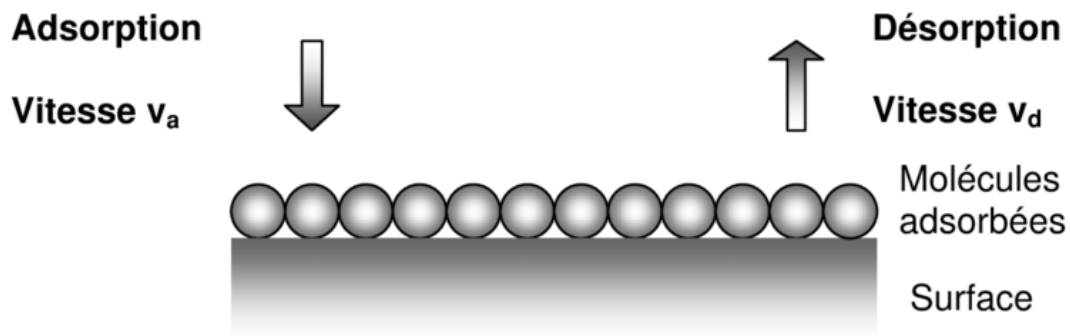


Figure 57 : Hypothèse du modèle langmirth

Ainsi, il faut considérer que :

- * L'adsorption tend vers la formation d'une monocouche en surface de l'adsorbant,
- * Les sites d'adsorption sont énergétiquement équivalents,
- * Une seule molécule est adsorbée par site,
- * Il n'y a aucune interaction entre les molécules adsorbées.

Ce modèle est décrit par l'équation suivante (Xu et al., 2010a) :

$$q_e = \frac{K_L q_{max} C_e}{1 + K_L C_e}$$

Avec :

C_e : Concentration de la solution à l'équilibre (g L^{-1}),

q_{max} : Capacité maximale d'adsorption monocouche (mg g^{-1}),

K_L : Constante de Langmuir ($\text{dm}^3 \text{g}^{-3}$).

Le modèle Freundlich prend en compte en plus du précédent l'existence de différences énergétiques entre les sites d'adsorption : il définit ainsi des familles de sites d'adsorption, caractérisées par une énergie d'adsorption donnée (dépendante du taux de recouvrement). Les sites d'adsorption ne sont pas équivalents et la surface est donc considérée comme hétérogène du point de vue de l'adsorption. Le modèle de Freundlich correspond souvent à des processus d'adsorption considérés comme plus faibles que ceux suivant un isotherme de Langmuir. Il est décrit par la formule suivante :

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}}$$

Avec :

K_F ($\text{mg}^{(1-1/n)} \text{L}^{-1/n} \text{g}^{-1}$) : constante de modèle de Freundlich,

n : exposant de model de Freundlich,

C_e (g L^{-1}) : concentration de la solution à l'équilibre.

Ainsi, les résultats de l'adsorption sont modélisés en s'appuyant sur les hypothèses de Langmuir les hypothèses et Freundlich (figure 58). Les équations qui servent aux modèles sont :

$C_e/q_e = 1/a + b/a C_e$ (modèle de Langmuir) , $\log q_e = n k \log C_e$ (modèle de Freundlich), dans lesquelles q_e représente la quantité de FNIII9/10 adsorbé par unité de masse de PCLU et C_e représente la concentration à l'équilibre du FNIII9/10 exprimée en mg/mL, a et b sont les constantes de Langmuir, k et n sont celles de Freundlich..

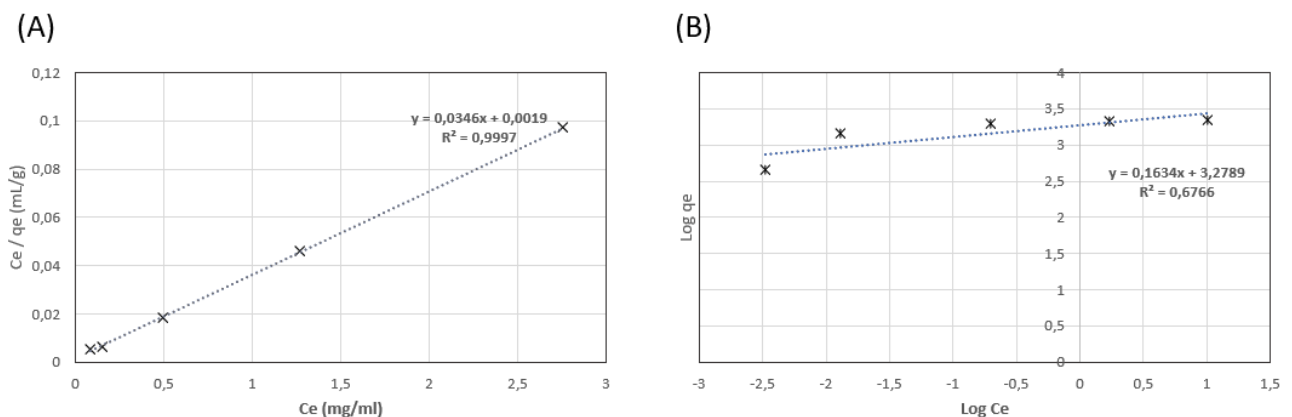


Figure 58 : Modélisation des résultats de l'adsorption (A) selon le modèle de langmuir (B) selon le modèle de Freundlich

La modélisation des résultats expérimentaux montre une corrélation avec le modèle de Langmuir. Le coefficient de corrélation trouvé avec le modèle de Langmuir est de 0,9 contrairement à celui de Freundlich avec une $R^2=0,6$.

En conclusion, les caractéristiques de l'adsorption de FNIII9/10 sur le PCLU ont été étudié et les résultats montre que la FNIII9/10 s'adsorbe avec des quantités importante sur le PCLU et avec une capacité d'adsorption à pH 7,4 par FNIII9/10 de 26mg de P/ g de biomatériau dans les

expériences réalisés. Pour décrire le mécanisme d'adsorption, le modèle de Langmuir donne des résultats plus cohérents que le modèle de Freundlich ce qui nous permet de proposer que le fragment FNIII9/10 s'adsorbe d'une façon homogène sur la surface de PCLU en monocouche.

XIII.2. Etude de la stabilité de l'association PCLU-FNIII9/10

Afin de vérifier la stabilité de l'échafaudage préparé par adsorption de FNIII9/10 sur le PCLU et si l'adsorption du fragment est réversible ou non, la désorption de FNIII9/10 a été mesurée dans différentes conditions. Tout d'abord, la cinétique de libération de FNIII9/10 a été étudiée dans des conditions déstabilisantes par incubation sous forte agitation à température ambiante dans le tampon PBS pendant 8 jours. Ensuite le relargage de ce fragment a été suivi dans les conditions de stockage des PCLU-FNIII9/10 à 4°C sans agitation jusqu'à 20 jours. L'étude de désorption de FNIII9/10 s'est réalisée en deux étapes. Les matériaux de PCLU sont immergés dans la solution de saturation de FNIII/10 (PBS, pH7,4) et incubés pendant 4h 30 sous vide ensuite les disques de PCLU-FNIII9/10 sont lavés 3 fois par le PBS sous vide pendant 5 min. Les matériaux sont par la suite placés dans 1ml de PBS afin de suivre la libération. La quantité de FNIII9/10 relarguée dans la solution est mesurée par dosage BCA et la quantité restante sur le matériau est solubilisée comme décrit dans le chapitre matériels et méthodes et quantifiée aussi. Les résultats sont exprimés en quantité de protéine (relarguée/adsorbée) en mg et en pourcentage par rapport à la quantité initialement adsorbée.

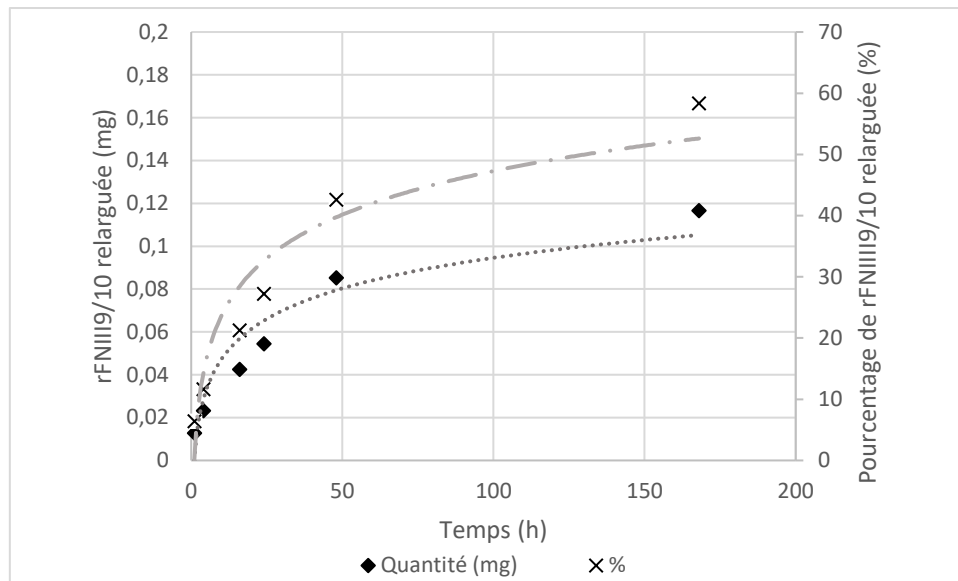


Figure 59 : Cinétique de relargage de FNIII9/10 à pH 7,4 sous agitation à température ambiante

Dans les premiers 24h le relargage de FNIII9/10 dans a solution de PBS sous agitation semble être actif et on observe, comme le montre la figure 59, une faible désorption de FNIII9/10 après 24h. Les résultats montrent que ces conditions ont provoqué la libération 49% de FNIII9/10 adsorbé au bout de 8 jours et que 41% de protéine reste fixée sur le PCLU. Le temps d'agitation dans les conditions de désorption est suffisamment long pour permettre au système d'atteindre un état d'équilibre.

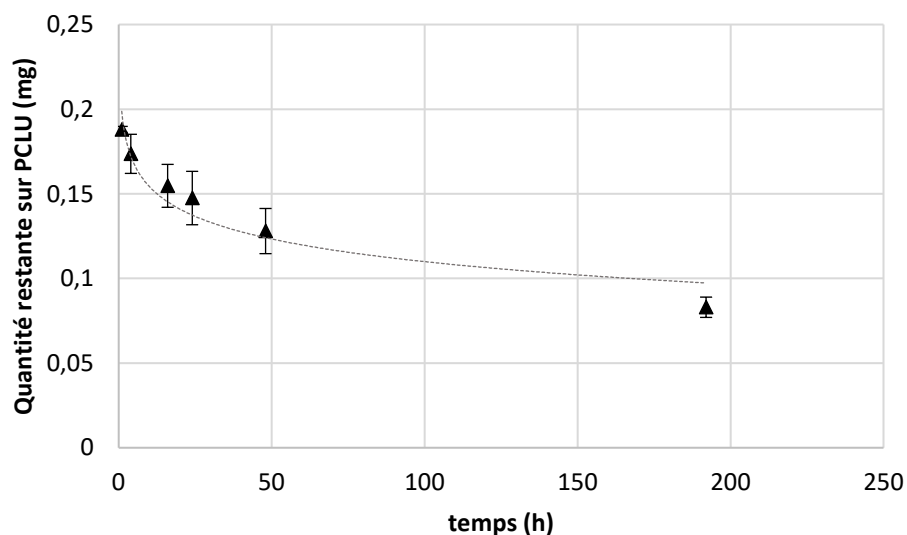


Figure 60 : Cinétique de libération de FNIII9/10 sous agitation à température ambiante

Le profil de la cinétique de stabilité de PCLU fonctionnalisé par FNIII9/10 présenté dans la figure 60 montre qu'une libération progressive et relativement faible dans le temps. La désorption par l'effet de l'agitation a montré que 63% de FNIII9/10 reste immobilisée sur le PCLU et que au bout de 7 jours le PCLU reste revêtue de 0,9 mg de FNIII9/10. Aucun relargage total n'est observé. Ces résultats laissent conclure que l'adsorption de FNIII9/10 est irréversible et que dans des conditions déstabilisantes de forte agitation l'échafaudage PCLU-FNIII9/10 reste relativement stable.

D'autre part, il est intéressant de vérifier le relargage de la FNIII9/10 dans les conditions de stockage de l'échafaudage préparés. La désorption du fragment protéique a été suivie pendant 20 jours pour les échantillons stockés à 4°C et les résultats obtenus sont représentés dans la figure 61.

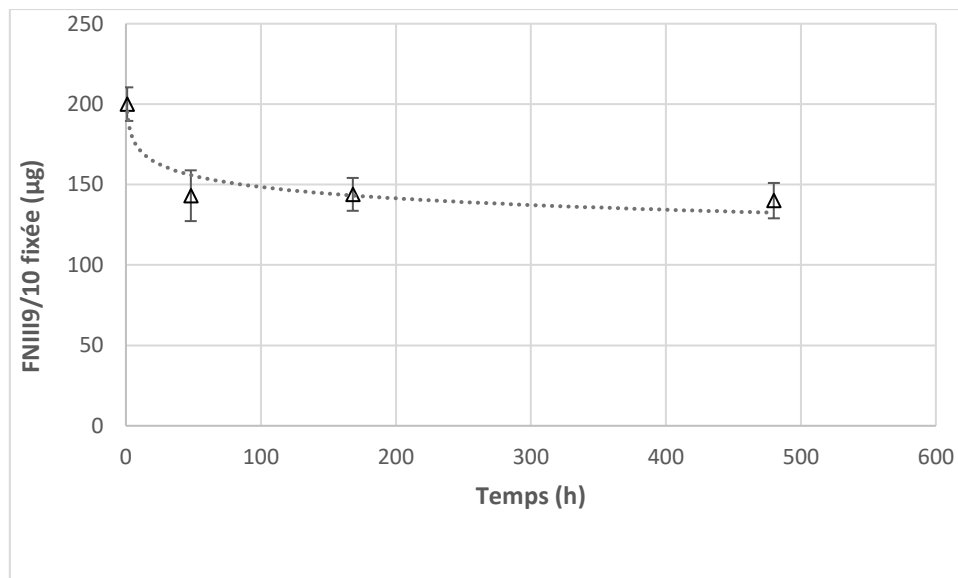


Figure 61 : Cinétique de désorption de FNIII9/10 à 4°C

Les résultats obtenus montrent que l'échafaudage PCLU-FNIII9/10 est stable à 4°C et qu'une libération faible de FNIII9/10 est observée. Le profil de relargage obtenu est quasi stable avec une perte de 15% de FNIII9/10 fixée sur le PCLU au bout de 20 jours. Plus le temps d'incubation est long plus la quantité de FNIII9/10 relarguée est faible. Durant les premières heures jusqu'à 24h heures d'immersion dans le PBS, un relargage rapide de rFNIII9/10 est observé passant de 0 à 48 µg/ml (figure 61). La stabilisation de la quantité de rFNIII9/10 relarguée est observée après 24 heures d'immersion, c'est donc le temps qu'il faut pour que les échafaudages, une fois immergés dans le PBS, retrouvent un nouvel équilibre.

Ces résultats indiquent que l'échafaudage préparé est stable et qu'un stockage à long terme n'affecte pas le revêtement initial de PCLU avec la FNIII9/10.

En conclusion, ces observations illustrent le dynamique de désorption de FNIII9/10 dans deux conditions différentes et permettent de noter que l'état de la protéine adsorbée évolue au cours du temps, ce qui diminue d'autant sa capacité se désorber de la surface de PCLU et que les interactions entre ces deux derniers sont stables et irréversibles même dans des conditions déstabilisantes.

Une fois que la conception de l'échafaudage PCLU-FNIII9/10 est validée nous avons ensuite étudié la réponse des cellules en contact avec biomatériau bifonctionnalisé.

XIV. Réponse cellulaire à l'échafaudage bio-actif

Un des objectifs de ce projet vise au développement d'un biomatériau bio-fonctionnalisé avec les domaines de fibronectine humaine, afin d'améliorer sa bio-intégration. Plus précisément, il s'agit de montrer des propriétés bio-adhésives améliorées et plus importantes. Dans la partie précédente, la surface de l'échafaudage à base de PCLU a été revêtue de fragment bio adhésif FNIII9/10 produit dans cette étude et nous avons validé l'association PCLU-FNIII9/10. Dans cette partie les propriétés bio adhésives de l'échafaudage PCLU-FNIII9/10 sont évaluées par des tests cellulaires. La capacité de l'échafaudage PCLU-FNIII9/10 à promouvoir et médier l'adhésion et la prolifération cellulaire a été investiguée et comparée à celle du PCLU.

XIV.1. Etude de l'adhésion cellulaire

La bio-adhésion est un processus qui se déroule dès les toutes premières heures après l'ensemencement des cellules (Ahmed & Ffrench-Constant, 2016b). Afin de s'affranchir des phénomènes de prolifération et de ne mesurer que la bio adhésion, la culture n'est maintenue que pendant 3 heures. Les échantillons de PCLU et PCLU-FNIII9/10 ont été préparés comme décrit précédemment et l'adhésion des cellules a été évaluée sur les deux matériaux pendant 1h et 3h. Pour ce faire, les disques (1cm \varnothing / 1mm hauteur) des biomatériaux ont été déposés au fond des puits des plaques non-traitées. Les cellules HGF sont déposées sur les biomatériaux (700 000 cellules par matériau). A la fin du temps d'incubation, les biomatériaux sont lavés 3 fois avec le PBS afin d'éliminer les cellules non fixées. Les cellules adhérentes sont décollées des disques par la trypsine collagénase et comptées au compteur automatique Vi'cell. Dans chaque expérience, des échantillons ont été réservés pour les observations microscopiques. Les cellules

ont été fixées sur les matériaux et colorée à l'hémalum. Les surfaces sont alors observées au microscope 3D numérique afin de voir l'état d'étalement des cellules et leur distribution.

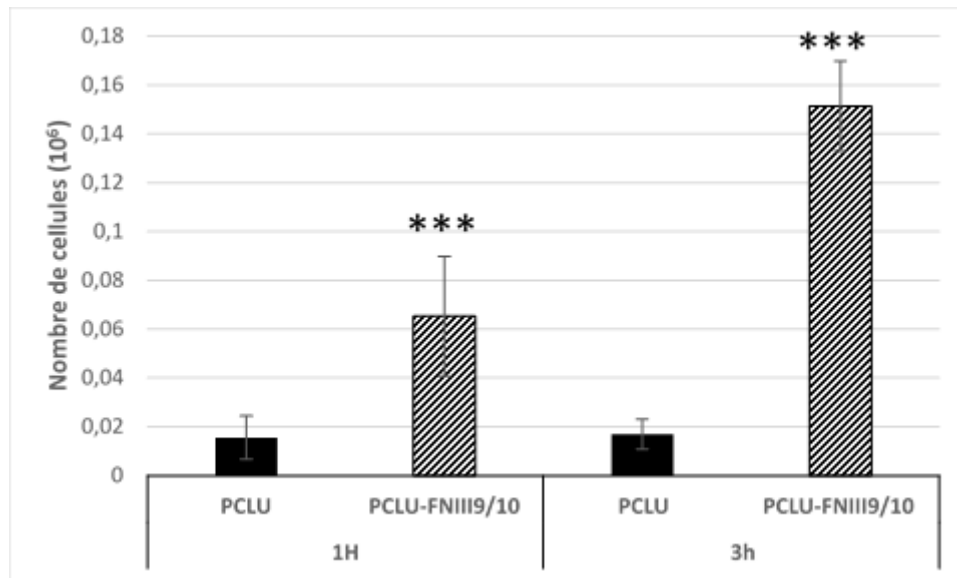


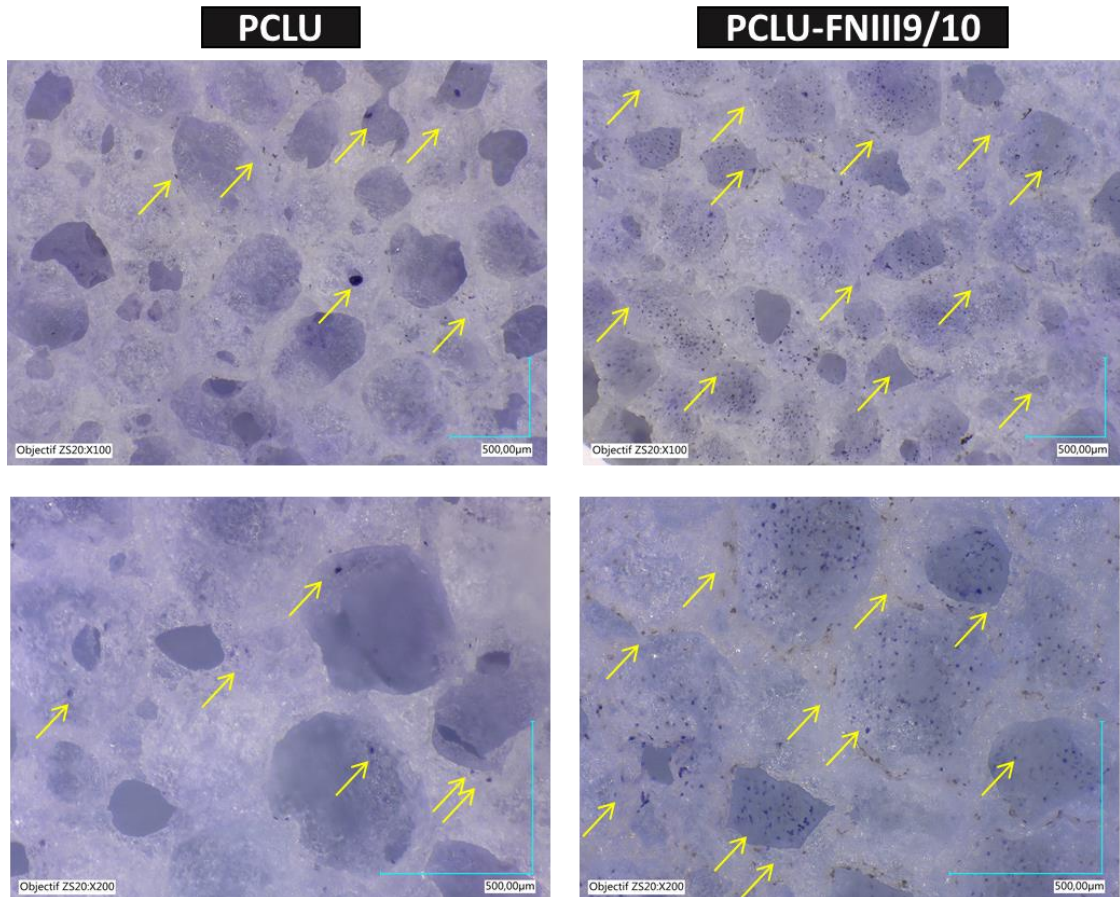
Figure 62: Adhésion cellulaire sur des échafaudages PCL, PCL-FNIII9/10 au bout de 3 heures. Quantification des cellules adhérentes sur les échafaudages après 1h et 3h d'ensemencement cellulaire. Les données représentent la moyenne \pm l'écart type de triplicata de chaque expérience. Une signification statistique a été définie comme $p < 0,05$ (*)

La figure 62 présente les résultats de la quantification des cellules adhérentes dans les différentes expériences réalisées. Le nombre de cellules adhérentes à la surface des matériaux est très différent pour les deux temps d'adhésion testés. Conformément aux résultats obtenus précédemment sur les surfaces en plastique, l'adhésion est largement améliorée pour PCLU traité avec le fragment FNIII9/10. Le nombre de cellules adhérentes au bout d'une heure sur l'échafaudage fonctionnalisé PCLU-FNIII9/10 était 3,6 fois plus élevé que celui obtenu sur le PCLU non traité. Une amélioration significative de l'adhésion cellulaire est également observée pour 3 heures d'adhésion avec le PCLU-FNIII9/10. Il est important de souligner que le PCLU a permis aussi une adhésion cellulaire au bout de 3h cependant elle reste inférieure à celle retrouvée avec PCLU-FNIII9/10.

Les résultats ont montré que l'échafaudage PCLU-FNIII9/10 a favorisé fortement l'adhésion cellulaire, environ de 7 fois par rapport à l'échafaudage PCL. L'échafaudage PCLU-FNIII9/10 était beaucoup plus efficace pour médier l'adhésion des cellules. Nous concluons qu'avec l'échafaudage PCLU fonctionnalisé avec le fragment recombinant produit dans cette étude

(FNIII9/10), nous sommes parvenus à obtenir une réponse d'adhésion cellulaire largement meilleure que celle observée sur la surface de PCLU non modifiée.

De plus, la disposition en 3D des cellules a été observées au microscope 3D numérique ;



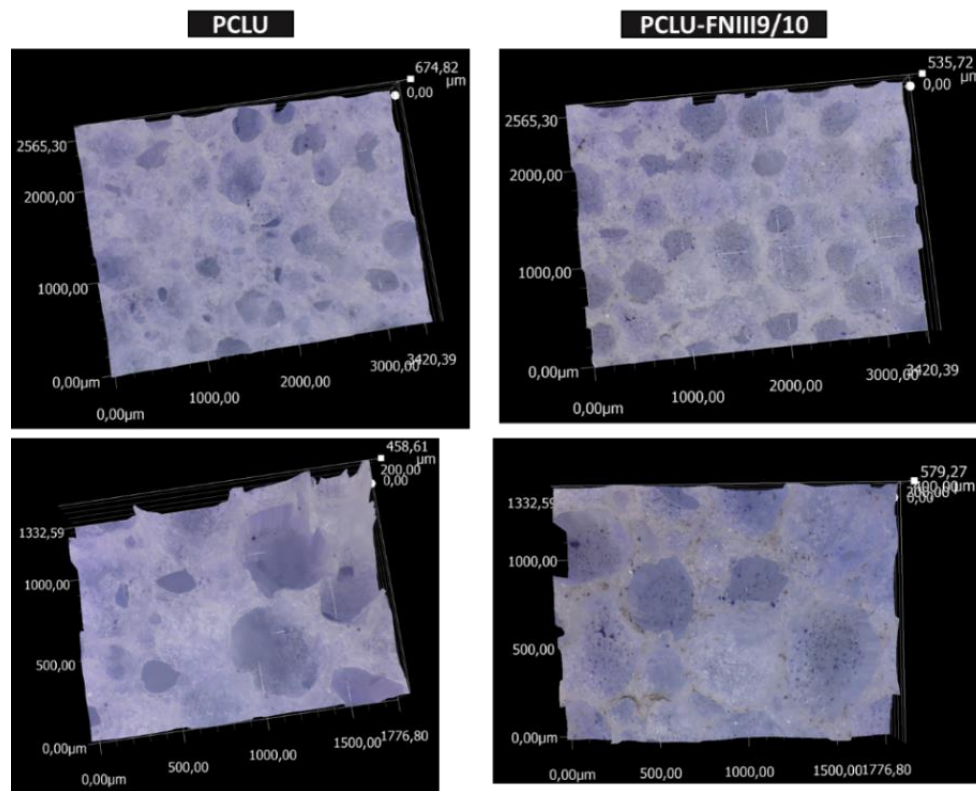


Figure 63 : Observation microscopique au microscope 3D numérique de l'adhésion cellulaire au bout 1h

Tout d'abord, les observations des cellules adhérentes à la surface des échafaudage PCLU et PCLU-FNIII9/10 confirment les résultats de comptage cellulaire. Ces observations ont montré que les surfaces de PCLU-FNIII9/10 sont plus bio-adhésives que celle de PCLU. La différence significative du potentiel bio-adhésif des deux matériaux PCLU et PCLU-FNIII9/10 est bien noté dans ces observations. Le nombre de cellules adhérentes à la surface de PCLU-FNIII9/10 était beaucoup plus élevé en lui comparant avec le nombre de cellules fixées sur le PCLU, en plus au bout d'une heure les cellules ont été capable de tapisser l'échafaudage PCLU-FNIII9/10 bio-fonctionnalisé.

D'autre part, nous avons remarqué qu'en plus du nombre de cellules plus faible obtenues pour l'échafaudage PCLU non traité, les cellules se sont principalement attachées à la surface des parois des pores et tendent à se regrouper sous forme de cluster, ce qui souligne le manque d'affinité de ces cellules envers le support.

Pour l'échafaudage PCLU-FNIII9/10, le nombre de cellules était plus élevé et les cellules étaient capables de s'adhérer dans la structure poreuse. Comme le montre la figure 63, les cellules ont été trouvés à l'intérieur de l'échafaudage PCLU-FNIII9/10 à partir d'une heure de

contact. De plus, les cellules étaient à la fois attachées et réparties sur et à l'intérieur la surface de la paroi des pores.

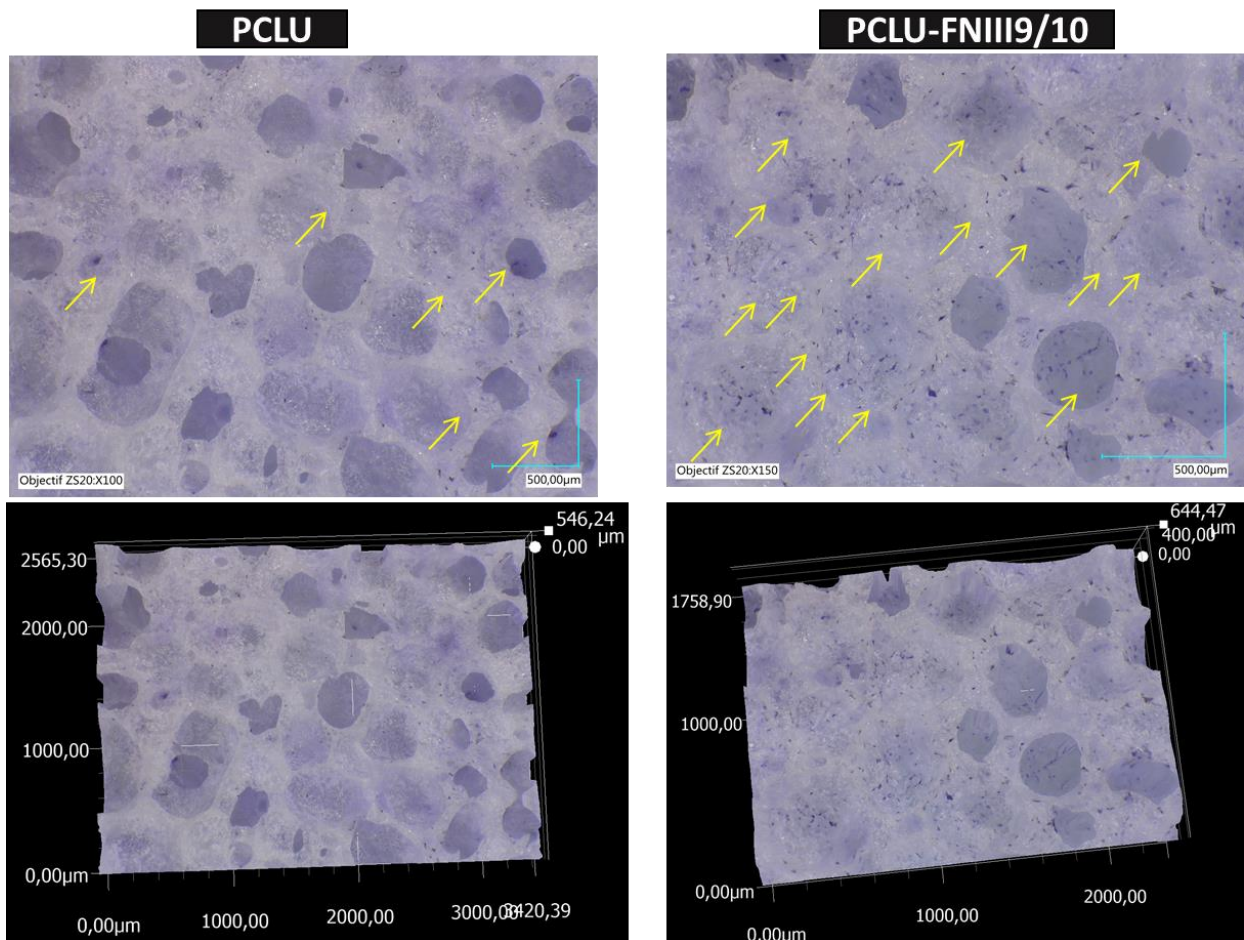


Figure 64 : Observation microscopique au microscope 3D numérique de l'adhésion cellulaire au bout 3h

Il est d'ailleurs à noter que l'observation morphologique des cellules montrent des structures plus rondes pour les cellules attachées à la surface de PCLU contrairement aux structures retrouvées pour le PCLU-FNIII9/10 avec un étalement cellulaire qui tend à soutenir la bonne affinité des cellules envers l'échafaudage. Au bout de 3 heures, les cellules tendaient à bien s'allonger et s'étaler sur la surface de PCLU-FNIII9/10 .

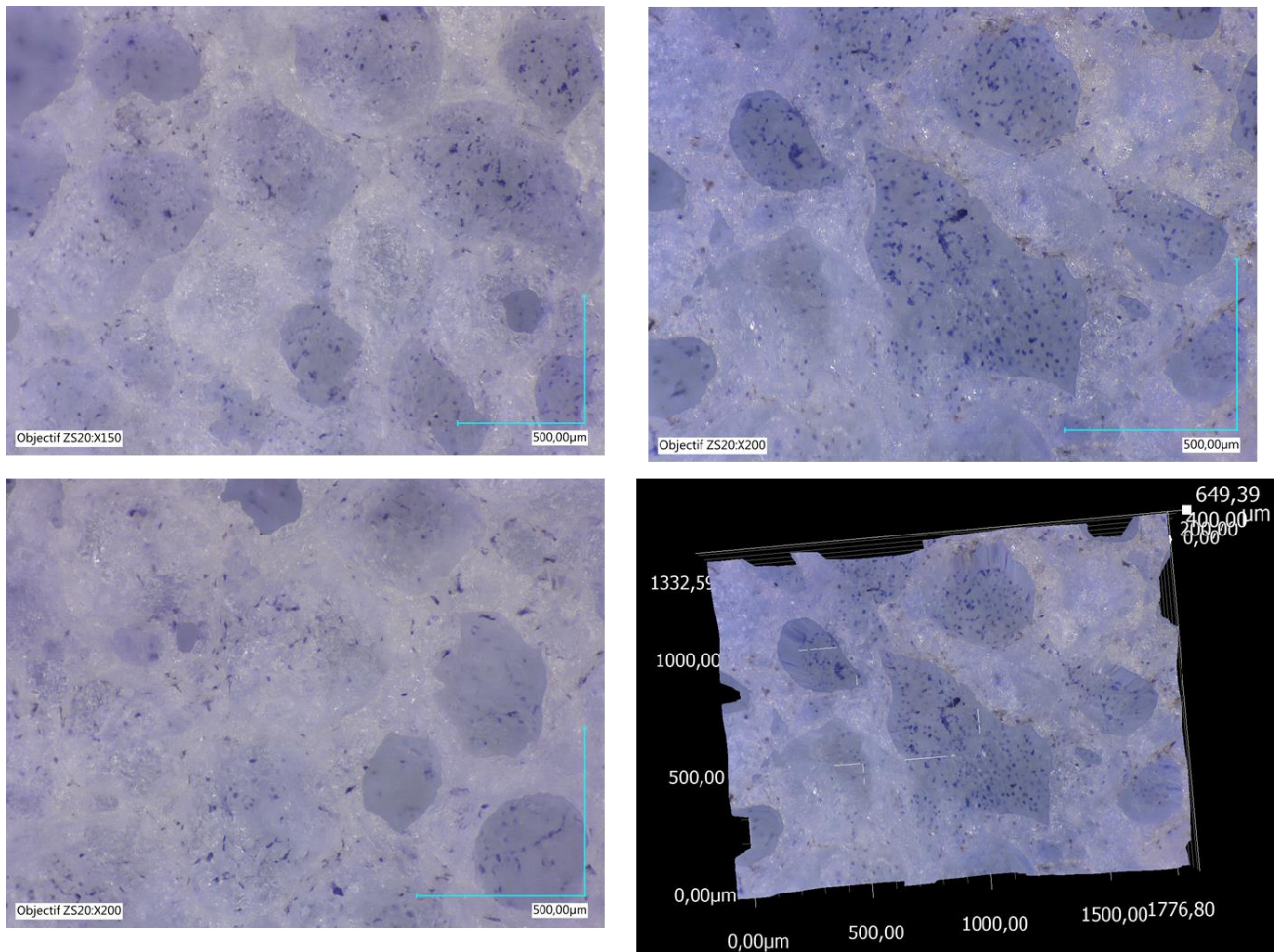


Figure 65 : Observation microscopique de l'étalement cellulaire sur les PCLU fonctionnalisés avec la FNIII9/10 au bout de 3h d'adhésion

En conclusion, les cellules se sont attachées sur les deux échafaudages PCLU et PCLU-FNIII9/10 cependant la densité de la distribution cellulaire n'est pas identique pour les différents supports testés. L'observation microscopique a montré une surface presque totalement tapissée de cellules pour l'échafaudage bio-fonctionnalisé PCLU-FNIII9/10 alors que des densités cellulaires moins importantes sont observées pour le PCLU seule. Ces résultats soulignent l'efficacité de la bio-fonctionnalisation de PCLU par le fragment bio-adhésif FNIII9/10 et suggèrent que la technique d'adsorption utilisée pour le coating de PCLU n'a pas altéré la fonction biologique du fragment adsorbé.

XIV.1. Etude de la prolifération cellulaire

La croissance cellulaire sur des support *in vitro* nécessite plus qu'une surface à laquelle les cellules peuvent s'attacher. Les cellules ont souvent besoin des signaux biologiques et d'interaction entre elles pour une prolifération appropriée. Nous avons montré dans le chapitre

précédent l'interaction du fragment FNIII9/10 produit avec les intégrines $\alpha 5\beta 1$ médiateurs de plusieurs comportements cellulaires en particulier l'adhésion et la prolifération cellulaire. La réponse cellulaire à l'échafaudage développé était ainsi davantage analysée pour examiner l'efficacité de la bio-fonctionnalisation du biomatériau par le fragment FNIII9/10. La prolifération cellulaire a été étudiée sur les échafaudages PCLU-FNIII9/10 et PCLU pendant 20 jours afin de vérifier si la surface de PCLU revêtues de FNIII9/10 était favorable pour la croissance et la prolifération cellulaire. Pour se faire, des échafaudages de PCLU et PCLU-FNIII9/10 ont été ensemencés avec 300 000 cellules par matériau et incubés à 37°C, 5% CO₂ pendant 6h dans le milieu de culture sans sérum. Puis le milieu est aspiré et les matériaux sont lavés afin d'éliminer les cellules non fixées. Enfin, le milieu est changé par le milieu complet (DMEM, 1% de pénicilline / streptomycine et 10% de SVF) et la prolifération cellulaire a été suivie pendant 3j, 7j, 14j et 21j comme décrit dans la section précédente.

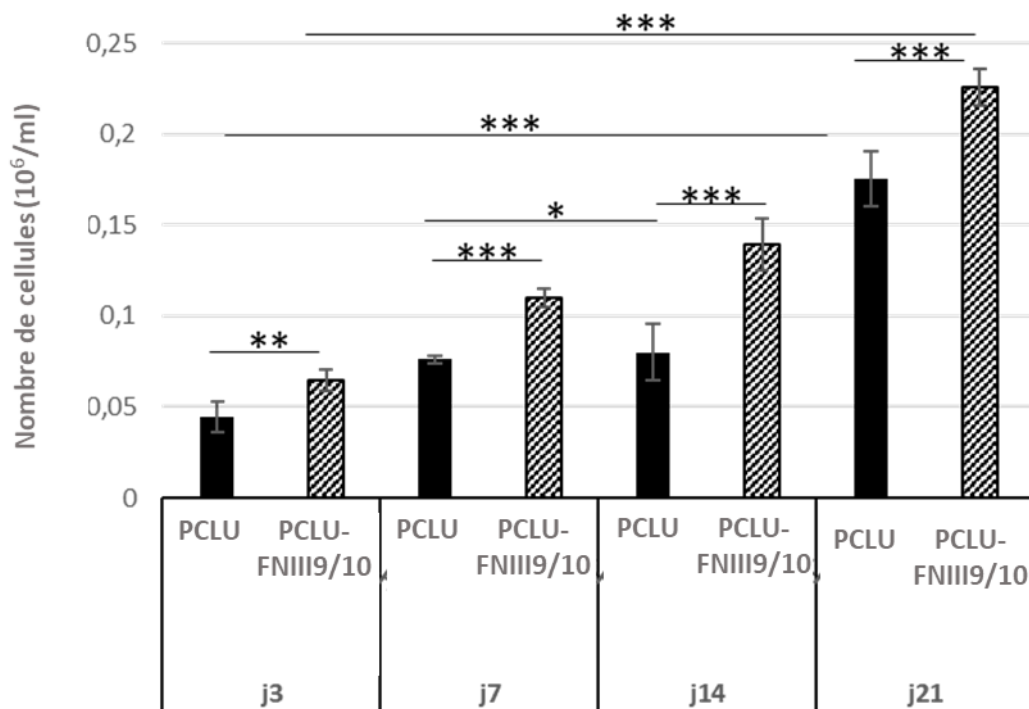


Figure 66: Prolifération cellulaire sur les échafaudages PCLU-FNIII9/10 et PCLU pendant 21 jours ;

Mesure de nombre de cellules proliférées pendant 3, 7, 14 et 21 jours. Les données représentent la moyenne \pm l'écart type de triplicata de chaque expérience. Une signification statistique a été définie comme $p < 0,05$ (*)

La figure 66 montre les résultats obtenus de taux de prolifération cellulaire obtenus après 21 jours de culture. Comme prévu, l'échafaudage PCLU-FNIII9/10 a favorisé la prolifération cellulaire, environ 1,8 fois par rapport à l'échafaudage PCLU. Au vu des résultats obtenus nous

pouvons constater que les deux échafaudages permettent la prolifération cellulaire. Bien que l'échafaudage PCLU non traité a soutenu la prolifération cellulaire, le nombre de cellules sur ces surfaces n'a pas atteint les valeurs obtenues avec le PCLU bio-fonctionnalisé avec FNIII9/10, qui a montré les valeurs les plus élevées de croissance cellulaire sur les différents temps évalués. Conformément aux résultats précédents, le nombre de cellules proliférées a augmenté significativement pour le PCLU traité avec FNIII9/10 en comparaison avec le PCLU non traité.

Il est d'ailleurs à noter que le profil d'évolution de la prolifération cellulaire en fonction du temps est différent pour les deux matériaux. La figure 66 montre que la prolifération cellulaire sur les échafaudages PCLU-FNIII9/10 est accélérée pendant 21 jours contrairement au PCLU non traité qui a montré une augmentation des taux de prolifération faible dans le temps au bout de 14 jours et qui semble s'accélérer au bout du 21^{ème} jour. Ces résultats peuvent être expliqués par les interactions non spécifiques entre le PCLU et les cellules induisant une prolifération limitée pour les premiers jours. Pour les PCLU traité avec FNIII9/10, les cellules adhèrent mieux et prolifèrent plus vite sur les surfaces grâce à l'interaction avec les récepteurs transmembranaires cellulaires engagés par le fragment FNIII9/10.

Afin de caractériser la prolifération cellulaire au sein de notre modèle 3D, nous avons cherché à visualiser la colonisation de la surface de l'échafaudage par les cellules. Ces observations permettent de se renseigner à la fois sur la densité, la distribution et la morphologie des cellules fixées sur les matériaux.

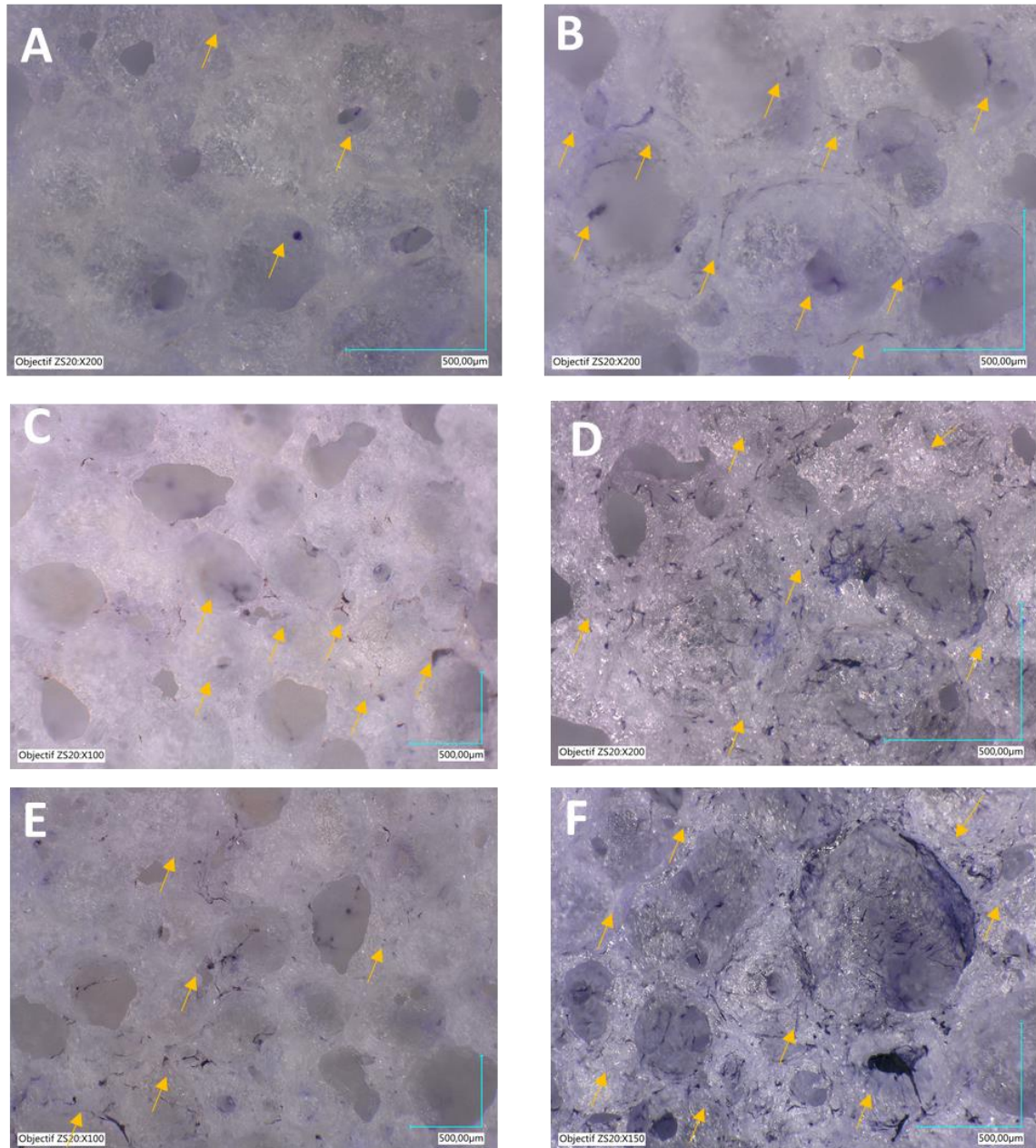


Figure 67 : Observation microscopique de la prolifération cellulaire sur les échafaudages PCLU et PCLU-FNIII9/10

(A,B) Prolifération cellulaire sur l'échafaudage PCLU et PCLU-FNIII9/10 respectivement à 3 jours, (C,D) Prolifération cellulaire sur l'échafaudage PCLU et PCLU-FNIII9/10 respectivement à 7 jours, (E,F) Prolifération cellulaire sur l'échafaudage PCLU et PCLU-FNIII9/10 respectivement à 14 jours

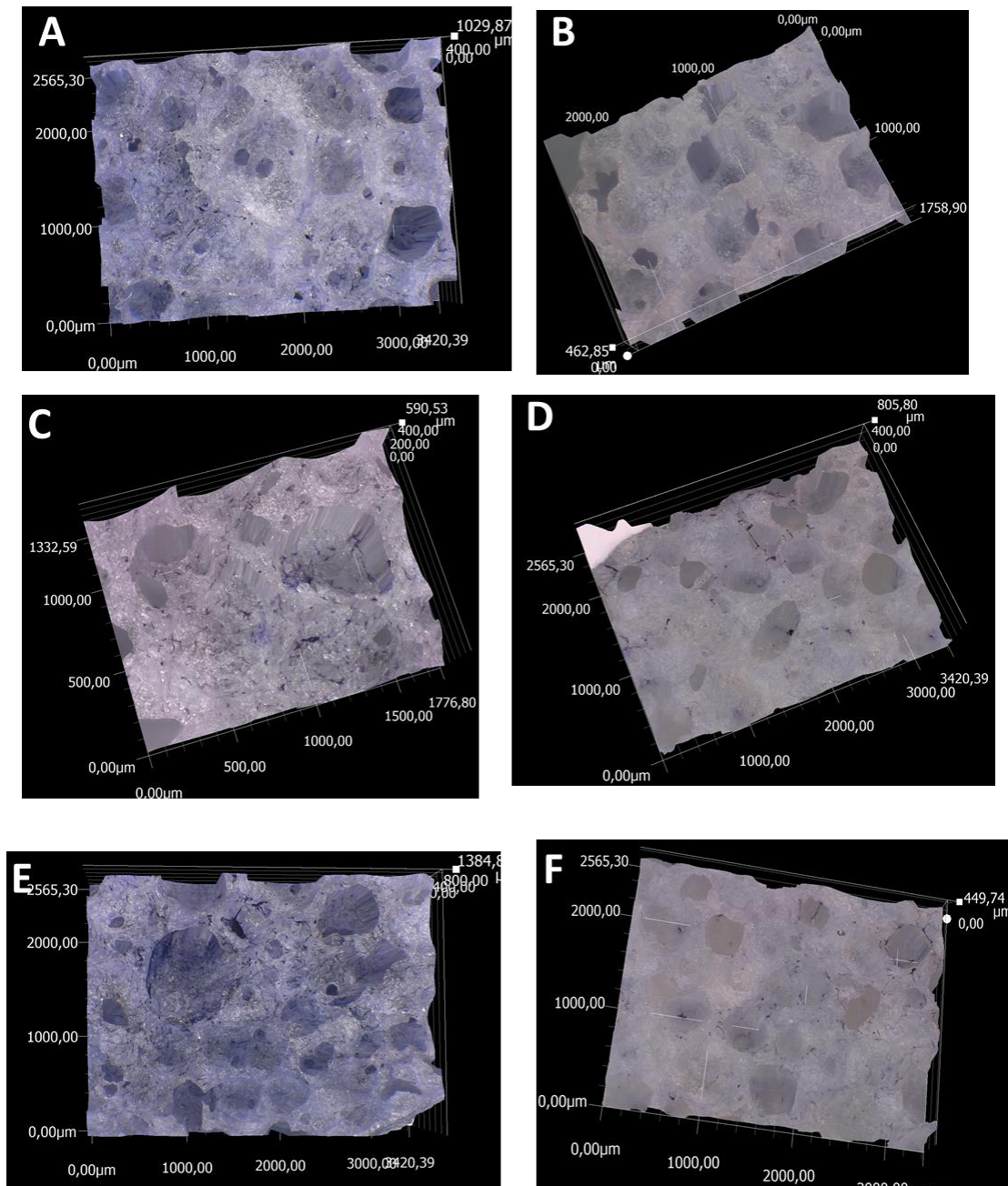


Figure 68 : Observation microscopique en coupe 3D de la prolifération cellulaire sur les échafaudages PCLU et PCLU-FNIII9/10

(A,B) Prolifération cellulaire sur l'échafaudage PCLU-FNIII9/10 et PCLU respectivement à 3 jours, (C,D) Prolifération cellulaire sur l'échafaudage PCLU-FNIII9/10 et PCLU respectivement à 7 jours, (E,F) Prolifération cellulaire sur l'échafaudage PCLU-FNIII9/10 et PCLU respectivement à 14 jours

Le taux de prolifération a été confirmé par les observations microscopiques réalisées. Comme présenté dans la figure 68 une colonisation plus importante de PCLU-FNIII9/10 par les cellules a été observé à chaque jour de prolifération par rapport au PCLU.

L'état de prolifération des cellules sur le PCLU seule a montré une colonisation cellulaire principalement à la surface des matériaux avec une distribution non homogène des cellules constaté par des zones riches en cellules et d'autre dépourvu de cellules. La disposition 3D de ces cellules à l'intérieur de la structure poreuse de l'échafaudage était faible mais il est important de souligner que les cellules ont pu pénétrer les pores de l'échafaudage PCLU.

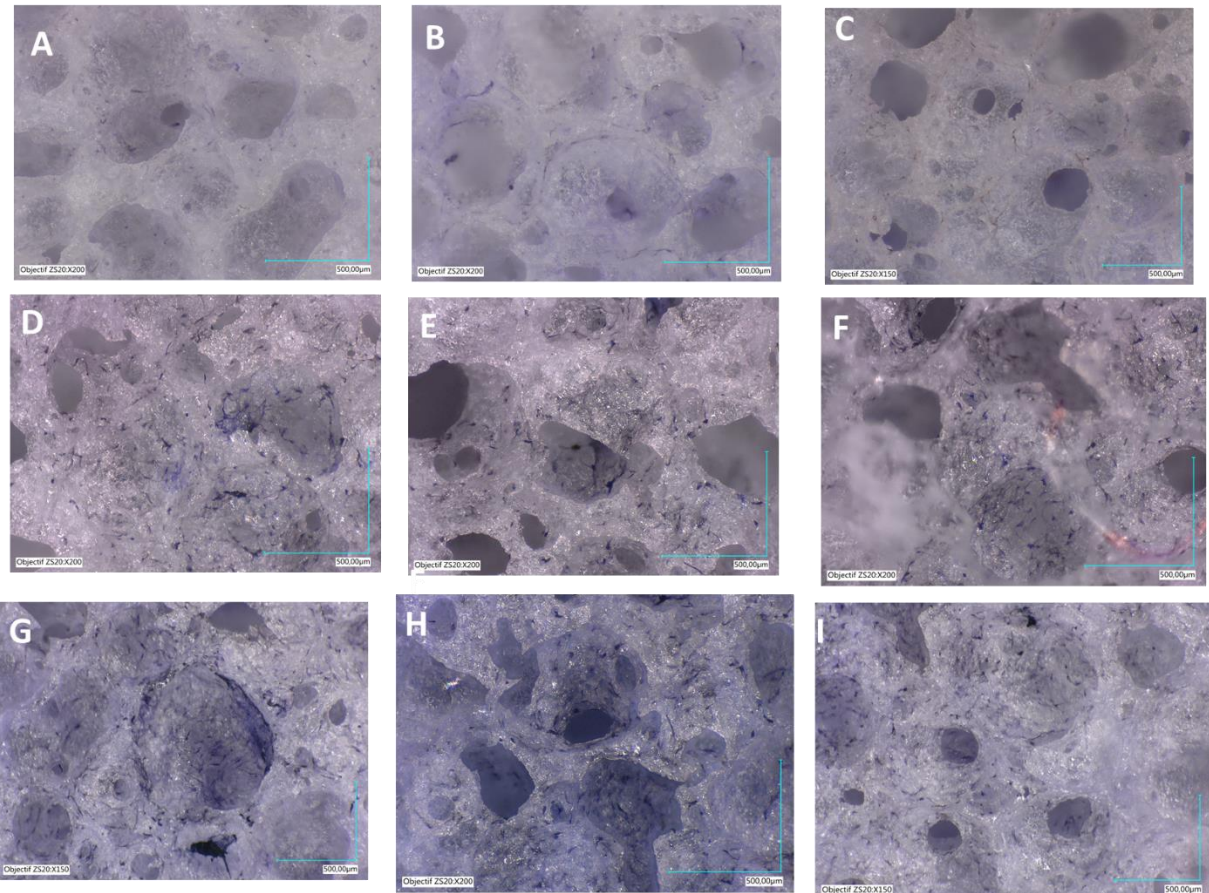


Figure 69 : Observation microscopique de la prolifération cellulaire sur l'échafaudage PCLU fonctionnalisé par FNIII9/10 pendant 14 jours :

(A,B,C) Prolifération cellulaire à J3, (D,E,F) Prolifération cellulaire à J7, (G,H,I) Prolifération cellulaire à J14

Une distribution homogène des cellules sur la surface interne des structures poreux a été obtenue sur l'échafaudage bio-fonctionnalisé PCLU-FNIII9/10. Les images à plus fort grossissement ont révélé des cellules diffusées tout au long des parois des pores des polymères (Figure 69). On peut remarquer que les cellules étaient capables de proliférer et tapisser à la fois dans la surface et la structure poreuse des de l'échafaudage PCLU -FNIII9/10. De plus, la différence statistiquement significative du nombre de cellules à chaque jour de prolifération est soutenue et confirmée par les observations cellulaires. Les cellules à la fois attachées et réparties sur la surface de la paroi des pores de PCLU-FNIII9/10 semblaient interagir avec tous les côtés

des pores. Les cellules proliféraient avec succès et les parois des pores sont largement recouvertes d'une couche de cellules allongées et bien étalées.

Ces résultats suggèrent que le peptide FNIII9/10 était efficace pour améliorer l'interaction entre les cellules et les échafaudages, en particulier pour favoriser l'adhésion et la prolifération des cellules. L'induction de la prolifération cellulaire de l'échafaudage PCLU- FNIII9/19 est probablement médiée par la liaison du fragment bio adhésif FNIII9/10 aux récepteurs transmembranaire cellulaire, en particulier aux intégrines $\alpha 5\beta 1$.

Une approche prometteuse pour améliorer la bio-intégration des biomatériaux est bio-fonctionnalisation de leur surface par de molécules bioactives (Casanova et al., 2020b). Plusieurs stratégies visant à améliorer le potentiel adhésif des surfaces de biomatériaux utilisent couramment la capacité de liaison cellulaire de la séquence RGD avec celle d'autres séquences bioactives (Bellis, 2011). L'intérêt pour la FN dans la bio-fonctionnalisation des biomatériaux découle de ces rôles cruciaux dans divers fonction cellulaires notamment l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines (Bachman et al., 2015a). Dans ce chapitre, un échafaudage bio-adhésif a été développé en associant un échafaudage synthétique PCLU au fragment bio-adhésif recombinant rFNIII9/10, issus de domaine de liaison aux intégrines de la FN et validé dans le chapitre précédent. Le PCLU a été bio fonctionnalisé par rFNIII9/10 par adsorption passive et cette stratégie s'est montrée efficace dans l'amélioration des propriétés biologique de l'échafaudage. Le rFNIII9/10 s'est adsorbé sur le PCLU avec rendement de saturation de 28mg de P/g de PCLU et l'étude du relargage montre que l'association est stable avec des propriétés d'adsorption en corrélation avec le modèle de Languimir. Plusieurs travaux ont investigué l'adsorption de la FN ainsi que ses domaines sur différents supports (Alves et al., 2010; Hao et al., 2021, 2021; Khang et al., 2007b; Molino et al., 2012). Ces travaux ont confirmé que les supports hydrophobes sont des supports favorables pour l'adsorption des domaines de la FN ce qui rejoint nos résultats. De plus, une étude récente de Limas et al. (2018) qui porte sur la modélisation de l'adsorption des domaines bio-adhésifs de la FN (FNIII7-10) (Liamas et al., 2018) a montré que les supports hydrophobes en plus d'être des supports favorables pour l'adsorption passive, la séquence RGD ainsi que le site synergique PHSRN sont estimées exposées à la surface du fait de caractère hydrophile de cette régions (Liamas et al., 2018). En se basant sur cette étude et les résultats obtenus de l'évaluation de la réponse cellulaire à l'échafaudage bio-activé par le rFNIII9/10, l'amélioration de l'adhésion cellulaire ainsi que la prolifération pour le PCLU-FNIII9/10 peut être attribué à une bonne orientation et une

accessibilité des régions fonctionnels de rFNIII9/10 une fois adsorbé sur le PCLU. En outre, cette amélioration de l'adhésion et la prolifération est en parfait accord avec des études similaires de bio-fonctionnalisation de différents biomatériaux par les domaines de la FN et la FN native. Une augmentation considérablement de la prolifération ainsi que la différenciation ostéoblastique des CSM à la surface du titane bio-fonctionnalisé par simple adsorption des domaines 7 à 10 FN a été reporté par Petrie et al. (Petrie et al., 2009). De plus, cette étude a montré une adsorption meilleure de ce ligand comparé à la FN native appuyant ainsi l'efficacité des ces stratégies d'utilisation des motifs bio-fonctionnels. Une autre étude qui visait à bio-fonctionnalisé un échafaudage synthétique le polycaprolactone (PCL) par un peptide issus des domaines bio-adhésifs de la FN en fusion avec celle du collagène noté rCF, a montré que Le peptide rCF immobilisé a considérablement augmenté l'hydrophilie de surface et a amélioré la prolifération cellulaire des fibroblastes à la surface de l'échafaudage PCL (Chaisri et al., 2015). Notre approche a montré également une amélioration de la prolifération et l'adhésion cellulaire du PCLU bio-activé par la rFNIII9/10 et confirment l'application potentielle du peptide rFNIII9/10 pour améliorer les fonctions biomimétiques des échafaudages synthétiques pour l'ingénierie tissulaire.

XV. Conclusion

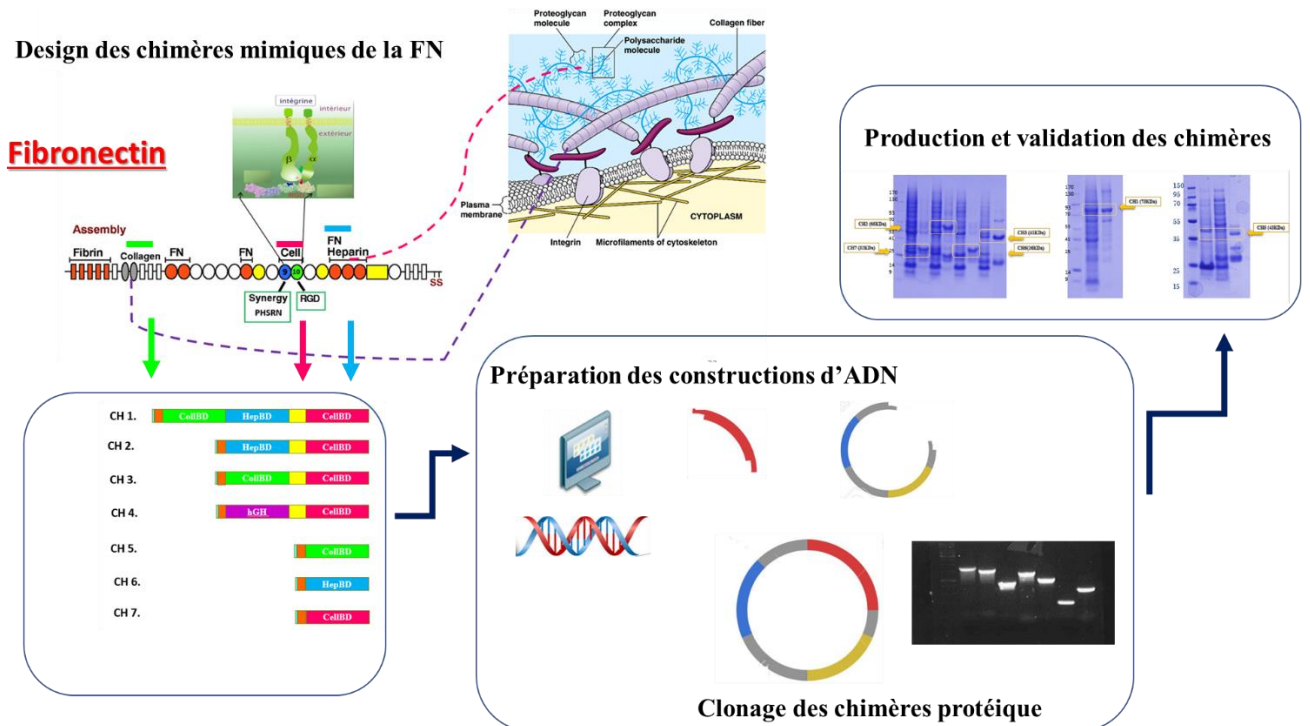
Au cours de ce chapitre, l'élaboration d'un échafaudage bio-fonctionnalisé par le fragment recombinant issue des domaine 9 et 10 de la fibronectine humaine FNIII9/10 , a été étudiée. Dans un premier temps, la caractérisation de l'adsorption de FNIII9/10 sur l'échafaudage PCLU a permis de valider la stabilité de l'association FNIII9/10 et PCLU par des analyses de saturation et de relargage. La fonctionnalisation du PCLU par adsorption de FNIII9/10 semble avoir été efficace avec une capacité de 28 mg de protéine/ g de PCLU. Le fragment FNIII9/10 s'est adsorbé avec des quantités importantes sur le PCLU et l'application des modèles d'adsorption des protéines à la surface, décrite dans la littérature, a montré une corrélation avec le model de Langmuir suggérant que l'adsorption de FNIII9/10 à la surface du PCLU est homogène. De plus, le relargage de la FNIII9/10 adsorbé à la surface de PCLU a été investigué et les résultats ont montré la stabilité de l'échafaudage PCLU-FNIII9/10 préparé avec un faible taux de protéine libérée à 4°C. Ce taux de relargage est augmenté sous l'effet de l'agitation cependant 64% de protéines restaient adsorbées au bout de 9 jours dans ces conditions. La réponse cellulaire à l'échafaudage développé a été ensuite évaluée et comparée au témoin PCLU seule. La bio-fonctionnalisation de PCLU par FNIII9/10 a considérablement améliorée l'adhésion et la prolifération cellulaire sur l'échafaudage. L'étude de l'adhésion et de la

prolifération de cellules HGF a montré que les biomatériaux coaté par le fragment bio-adhésif constituent des supports plus favorables pour l'adhésion et la croissance cellulaire et contribue à améliorer significativement le comportement cellulaire au contact de l'échafaudage. La bio-fonctionnalisation décrite dans cette étude pourrait constituer une alternative satisfaisante pour le développement des biomatériaux en chirurgie réparatrice.

Chapitre V

Développement des nouvelles chimères protéiques issus des domaines fonctionnels de la fibronectine humaine

XVI. Résumé graphique :



XVII. Préambule :

Dans les chapitres précédents, nous avons montré l'efficacité du fragment issue des domaines de liaison aux cellules de la fibronectine humaine dans la bio-fonctionnalisation de biomatériau. Ce fragment a démontré un potentiel bio-adhésif important et à contribuer significativement dans l'amélioration du comportement cellulaire au contact des supports traités à savoir l'adhésion et la prolifération cellulaire. Dans la présente étude, notre objectif était d'exploiter davantage les domaines bio-fonctionnels de la fibronectine humaine par le développement de nouvelles chimères protéiques mimétiques de la FN en combinant son affinité pour des protéines cibles de la matrice extracellulaire et des membranes cellulaires.

XVIII. Introduction

L'ingénierie des protéines thérapeutique combine des informations génétiques, biochimiques et fonctionnelles pour améliorer des protéines existantes ou inventer de nouvelles technologies protéiques. Dans ce cadre, nous avons développé dans ce chapitre différents chimères protéiques issues principalement de la fibronectine humaine et d'autre protéines thérapeutiques dans l'optique de bio-fonctionnaliser les biomatériaux. Des stratégies biomimétiques axées sur

la fonctionnalisation des surfaces des biomatériaux avec protéines adhésives qui favorisent l'adhésion et la survie des cellules, sont apparues comme approches prometteuses. Nous avons étudié dans un premier temps une stratégie de bio-fonctionnalisation avec le fragment bio-adhésif FNIII9/10 issue des domaines 9 et 10, portant la séquence RGD est son site synergique PHSRN, de la fibronectine humaine. Nos résultats ont confirmé l'efficacité de ces stratégies et ont montré une capacité à médier l'adhésion et la prolifération cellulaire améliorée des surfaces bio-fonctionnalisées. Motivée par ces résultats, nous nous sommes proposé d'exploiter davantage les propriétés bioactives de la fibronectine humaine afin de concevoir des ligands innovants pour la bio-fonctionnalisation des biomatériaux. Il existe plusieurs interactions moléculaires qui peuvent servir de médiateurs au comportement cellulaire notamment l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire. Ces comportements constituent l'enjeu majeur des stratégies de bio-fonctionnalisation. Une grande partie de la recherche dans ce domaine s'est concentrée sur l'utilisation de peptides adhésifs qui engagent et activent les intégrines principalement la séquence RGD. Dans le cadre de ce chapitre, nous avons développé des chimères protéique innovantes qui portent non seulement des domaines qui activent les intégrines mais aussi des facteurs qui engage les éléments de la matrice extracellulaire (MEC) qui participe activement dans la régénération osseuses et d'autre éléments qui favorisent la croissance cellulaire afin de générer des nouveaux peptides comportant tous les éléments nécessaire pour une bio-intégration rapide et efficace qui stimule l'adhérence, la migration et la prolifération cellulaire. Sept chimères imitant la fibronectine native ont été développé dans cette étude à partir des domaines fonctionnels de la FN plus précisément les domaines d'interaction de la fibronectine avec le collagène de la MEC, avec l'héparine ainsi que le domaine bio-adhésif d'interaction avec les récepteurs cellulaires. Le clonage ainsi que la production dans le système bactérien des chimères protéiques recombinantes ont été également concrétisé.

La première partie de ce chapitre présente les constructions conçus, les résultats détaillés des séquences codantes de chaque construction chimérique et la validation par des outils bio-informatiques de ces dernières. Ensuite, le clonage des différentes chimères dans le vecteur pET SUMO est mené. Enfin, l'expression des chimères créées dans le système bactérien *E. coli* a été étudié.

XIX. Construction des chimères protéiques

Nous avons conçu plusieurs constructions issues principalement des domaines de la fibronectine humaine (Figure 70). La capacité de la fibronectine à soutenir l'adhésion cellulaire, la prolifération, la migration et la réorganisation de la matrice collagène est médiée par plusieurs domaines fonctionnels. Notre objectif était de développer des fragments imitant la forme native de la fibronectine et impliqués efficacement dans l'orientation du comportement cellulaire ainsi que la réorganisation de MEC.

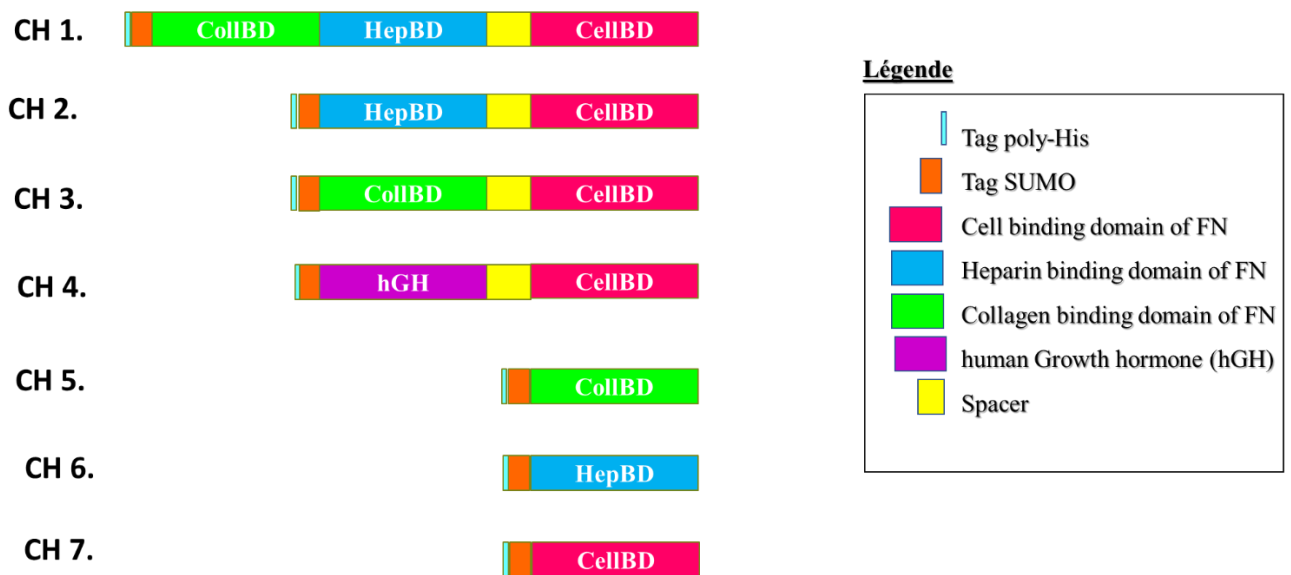


Figure 70: Schéma présentant la conception des différentes constructions des chimères protéiques

La préparation de ces constructions comme décrit dans la partie matériels et méthodes nous a permis de récupérer les séquences codantes des domaines investigués et de développer les séquences ADNc de nos constructions. Pour chaque construction combinée, des espaceurs de type 5' ggagtggtg gatcc ggagtggtg gatcc ggagtggtg gatcc 3' (seq AA : GGGGSGGGGSGGGGS) ont été ajoutés ainsi que des sites de restrictions et le codon stop 5' taa 3'. Les séquences nucléotidiques préparées sont validées par alignement avec la base de données de la banque EMBL des ADNc en utilisant l'outil NCBI. De plus, les séquences nucléotidiques préparées ont été traduites in silico par le logiciel Serial Cloner et les séquences en acide aminé issues sont ensuite alignées à la base des données de protéine Uniprot pour valider les domaines protéiques.

XIX.1. Séquences des chimères

Les séquences nucléotidiques codantes (sens) préparées ainsi que séquences traduites (séquences peptidiques en Acide Aminé (AA) dans cette étude sont les suivantes :

❖ Chimère 1

Cette chimère contient :

Chimère : Collagen binding-heparin binding-----Cell binding

CH 1.



- Le domaine 9 et 10 de la fibronectine humaine (FNIII9-10) qui présente le domaine de liaison aux récepteurs cellulaire
- Le domaine de fixation de collagène de la matrice extracellulaire localisé au niveau des domaines de 6 à 9 de FN type I (6-9FNI) et des modules 1 et 2 de FN type II (1-2FNII) ; L'interaction fibronectine-collagène est impliqué dans la régulation de la synthèse de la MEC et impacte les voies migratoires des cellules
- Le domaine de fixation de l'héparine de la fibronectine humaine localisé au niveau des domaines 1 et 2 de FN type III. Le domaine de liaison à l'héparine coopère avec le domaine de liaison cellulaire de la fibronectine et potentialisent l'adhésion cellulaire et la prolifération cellulaire. De plus, ce domaine est fortement impliqué dans la cicatrisation des plaies.

➤ Séquence nucléotidique : (1707 pb)

// :

```
cttgcacgtgcctgggcaacggagtcagctgccaagagacagctgtaaccagacttacggtggcaactaaatggagagccatg
tgtcttaccattcacctacaatggcaggacgttctactcctgcaccacggaagggcgacaggacggacatcttgggtgcagcacaact
tcgaattatgagcaggaccagaaatactcttctgcacagaccacactgttttggtcagactcaaggaggaaattccaatggtgccttg
tgccactccccttctatacaacaaccacaattacactgattgcacttctgagggcagaagagacaacatgaagtgggtggggacca
cacagaactatgatgccgaccagaagttgggttctgccccatgggtgccacgaggaaatctgcacaaccaatgaaggggtcatgt
accgcattggagatcagtgggataagcagcatgacatgggtcacatgatgaggtgcacgtgtgttgggaatggtcgtgggggaatgg
acatgcattgcctactcgaacttcgagatcagtcattgtgatgacatcactacaatgtgaacgacacattccacaagcgtcatgaa
gaggggacatgctgaactgtacatgcttcggtcagggtcggggcaggtggaagtgtgatcccgtcgaccaatgccaggattcaga
```

gactgggacgtttatcaaattggagattcatgggagaagtatgtgcatggtgtcagataaccagtgtactgctatggccgtggcattgg
 ggagtggcattgccaacctttacagacctatccaagctcaagtggctctgtcgaagtatttatcactgagactccgagtcagcccaact
 cccaccccatccagtggaatgcaccacagccatctcacattccaagtacattctcaggtggagacctaataaattctgtaggccgttg
 gaaggaagctaccataccaggccactaaactcctacaccatcaaaggcctgaagcctggtgtggtatacaggggccagctcatca
 gcatccagcagctacggccaccaagaagtgactcgtttgactcaccaccaccagcaccagcacaggaggtggtggatccggagg
 tggatggatccggaggtggtggatccggtcttgattcccaactggcattgacttttctgatattactgccaactctttactgtcactggat
 tgctcctcgagccaccatcactggctacaggatccgcatcatcccagcacttcagtgaggagacctcgagaagatcgggtgcccc
 actctcggaattccatcacctcaccacactcactccaggcacagagtatgtggtcagcatcgttcttaatggcagagaggaaag
 tccttattgattggccaacaatcaacagtttctgatgttccgaggacctggaagttgttctgcgacccccaccagcctactgatcag
 ctgggatgctcctgctgtcacagtggagatattacaggatcacttacggagagacaggaggaaatagccctgtccaggagttcactgtg
 cctgggagcaagtctacagctaccatcagcggcctaaacctggagttgattataccatcactgtgtatgctgtcactggccgtggaga
 cagccccgcaagcagcaagccaatttccatttaa

//

➤ Séquence en acides aminés : (PM ≈ 63KDa)

LCTCLGNGVSCQETA V T Q T Y G G N L N G E P C V L P F T Y N G R T F Y S C T T E G R Q D G H L W C S
 T T S N Y E Q D Q K Y S F C T D H T V L V Q T Q G G N S N G A L C H F P F L Y N N H N Y T D C T S E G R R D N M
 K W C G T T Q N Y D A D Q K F G F C P M A A H E E I C T T N E G V M Y R I G D Q W D K Q H D M G H M M R C T
 C V G N G R G E W T C I A Y S Q L R D Q C I V D D I T Y N V N D T F H K R H E E G H M L N C T C F G Q G R G R
 W K C D P V D Q C Q D S E T G T F Y Q I G D S W E K Y V H G V R Y Q C Y C Y G R G I G E W H C Q P L Q T Y P S
 S S G P V E V F I T E T P S Q P N S H P I Q W N A P Q P S H I S K Y I L R W R P K N S V G R W K E A T I P G H L N S Y
 T I K G L K P G V V Y E G Q L I S I Q Q Y G H Q E V T R F D F T T T S T S T G G G G S G G G G S G G G S G L D S P
 T G I D F S D I T A N S F T V H W I A P R A T I T G Y R I R H H P E H F S G R P R E D R V P H S R N S I T L T N L T P G
 T E Y V V S I V A L N G R E E S P L L I G Q Q S T V S D V P R D L E V V A A T P T S L L I S W D A P A V T V R Y Y R I
 T Y G E T G G N S P V Q E F T V P G S K S T A T I S G L K P G V D Y T I T V Y A V T G R G D S P A S S K P I S I *

Cette chimère était conçue pour mimer les signaux biologiques délivrés par la FN native fortement impliqué dans les phénomènes de bio-adhésion et de cicatrisation afin de créer un environnement naturel et adéquat pour la réparation osseuses. Les chimères suivantes développées sont toutes les combinaisons possibles de ces domaines. Dans l'intention d'éviter la répétition seule les séquences préparées sont présentés dans les parties suivantes.

❖ **Chimère 2**

Cette chimère contient le domaine 9 et 10 de la fibronectine humaine (FNIII9-10) qui présente le domaine de fixation des récepteurs cellulaire, séparé par un espaceur avec le domaine de fixation des héparines (sucres de la MEC) de la fibronectine humaine ;

Chimère : Heparin binding-----Cell binding

CH 2.



- Séquence nucléotidique : (819 pb)

// :

```
tccagtggaatgcaccacagccatctcacattccaagtacattctcaggtggagacctaataattctgtaggccgttgaaggaagc
taccataccaggccacttaactcctacacatcaaaggcctgaagcctgggtgtgtatagaggccagctcatcagcatccagca
gtacggccaccaagaagtgactcgtttgactcaccaccaccagcaccagcacaggaggtggatccggaggtggatcc
ggaggtggatccggtcttgattcccaactggcattgactttctgatattactgccaactctttactgtgactggattgctcctcga
gccaccatcactggctacaggatccgcatcatcccagcacttcagtgaggagacctcgagaagatcgggtgccccactctcggaa
ttccatcacctcaccacactcactccaggcacagagtatgtgtcagcatcgttcttaatggcagagaggaaagtcccttattga
ttggccaacaatcaacagtttctgatgtccgagggacctggaagtgtgtgctgcgacccccaccagcctactgatcagctgggatgct
cctgctgtcacagtgagatattacaggatcacttacggagagacaggaggaaatagccctgtccaggagttcactgtgctgggagc
aagctacagctaccatcagcggccttaaacctggagttgattataccatcactgtgtatgctgtcactggcctggagacagccccg
caagcagcaagccaattccatttaa
```

//

- Séquence en acides aminés : (PM ≈ 30 KDa)

```
IQWNAPQPSHISKYILRWRPKNSVGRWKEATIPGHLNSYTIKGLKPGVVYEGQLISIQ
QYGHQEVTRFDFTTTSTSTGGGGSGGGGSGGGGSLDSPTGIDFSDITANSFTVHWIA
PRATITGYRIRHHPEHFSGRPREDRVPHSRNSITLTNLTPGTEYVVSIVALNGREESPLL
```

IGQQSTVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPG
SKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISI*

❖ **Chimère 3**

Cette chimère contient le domaine 9 et 10 de la fibronectine humaine (FNIII9-10) séparé par un espaceur avec le domaine de fixation des collagène (protéine majeure de la MEC) de la fibronectine humaine ;

Chimère : Collagen binding-----Cell binding

CH 3.



- Séquence nucléotidique : (1500 pb)

// :

ctttgcacgtgcctgggcaacggagtcagctgccaagagacagctgtaaccagacttacggtggcaacttaaaggagagccatg
tgtcttaccattcacctacaatggcaggacgttctactcctgcaccacggaagggcgacaggacggacatcttgggtgcagcacaact
tcgaattatgagcaggaccagaaatactcttctgcacagaccacactgtttgggtcagactcaaggaggaaattccaatggtgccttg
tgccacttccccctctatacaacaaccacaattacactgattgcacttctgagggcagaagagacaacatgaagtggtggtgggacca
cacagaactatgatgccgaccagaagttgggttctgccccatggctgccacgaggaaatctgcacaaccaatgaaggggtcatgt
accgcattggagatcagtgggataagcagcatgacatgggtcacatgatgaggtgcacgtgtgtgggaatggtcgtggggaatgg
acatgcattgcctactcgcaactcgagatcagtcattgtgatgacatcactacaatgtgaacgacacattccacaagcgtcatgaa
gaggggcacatgctgaactgtacatgcttcggtcagggctggggcaggtggaagtgtgatcccgtcgaccaatgccaggattcaga
gactgggacgtttatcaaattggagattcatgggagaagtatgtgatggtgtcagataccagtgctactgctatggccgtggcattgg
ggagtggcattgccaaccttacagacctatccaagctcaagtgtcctgtcgaagtatttactgagactccgagtcagcccaact
cccacccatccagtggaatgcaccacagccaggaggtggtggatccggaggtggtggatccggaggtggtggatccgggtcttga
ttcccaactggcattgactttctgatattactgccaactctttactgtgcactggattgctcctcgagccaccatcactggctacagga
tccgcatcatcccagcacttcagtgaggagacctcgagaagatcgggtgccccactctcggaattccatcacctcaccaacctca
ctccaggcacagagtatgtggtcagcatcgttctttaatggcagagaggaaagtcccttattgattggccaacaatcaacagtttctg
atgtccgagggacctggaagtgtgtgctgcgacccccaccagcctactgatcagctgggatgctcctgctgtcacagtgagatattac

aggatcacttacggagagacaggaggaaatagccctgtccaggagttcactgtgcctgggagcaagtctacagctaccatcagcgg
 ccttaacctggagttgattataccatcactgtgtatgtgtcactggccgtggagacagccccgcaagcagcaagccaatttcattt
 aa

//

- Séquence en acides aminés : (PM ≈ 55KDa)

LCTCLGNGVSCQETA V T Q T Y G G N L N G E P C V L P F T Y N G R T F Y S C T T E G R Q D G H L W C S
 T T S N Y E Q D Q K Y S F C T D H T V L V Q T Q G G N S N G A L C H F P F L Y N N H N Y T D C T S E G R R D N M
 K W C G T T Q N Y D A D Q K F G F C P M A A H E E I C T T N E G V M Y R I G D Q W D K Q H D M G H M M R C T
 C V G N G R G E W T C I A Y S Q L R D Q C I V D D I T Y N V N D T F H K R H E E G H M L N C T C F G Q G R G R
 W K C D P V D Q C Q D S E T G T F Y Q I G D S W E K Y V H G V R Y Q C Y C Y G R G I G E W H C Q P L Q T Y P S
 S S G P V E V F I T E T P S Q P N S H P I Q W N A P Q P G G G G S G G G G S G G G G S G L D S P T G I D F S D I T A N
 S F T V H W I A P R A T I T G Y R I R H H P E H F S G R P R E D R V P H S R N S I T L T N L T P G T E Y V V S I V A L N
 G R E E S P L L I G Q Q S T V S D V P R D L E V V A A T P T S L L I S W D A P A V T V R Y Y R I T Y G E T G G N S P
 V Q E F T V P G S K S T A T I S G L K P G V D Y T I T V Y A V T G R G D S P A S S K P I S I *

❖ Chimère 4

Cette chimère contient le domaine 9 et 10 de la fibronectine humaine (FNIII9-10) séparé par un espaceur avec l’hormone de croissance humaine pour favoriser la croissance cellulaire.

Chimère: Cell binding-----human growth hormone(hGH)

CH 4.



- Séquence nucléotidique : (1239 pb)

// :

ggtcttgattccccactggcattgactttctgatattactgccaaactctttactgtgcactggattgctcctcgagccaccatcactggc
 tacaggatccgccatcatcccagacacttcagtgggagacctcgagaagatcgggtccccactctcggaattccatcacccctcacc
 aacctcactccaggcacagagtatgtggcagcatcgttgctcttaatggcagagaggaaagtcccttattgattggccaacaatcaa
 cagtttctgatgtccgagggacctggaagtgtgtgctgcgacccccaccagcctactgatcagctgggatgctcctgctgtcacagtg
 agatattacaggatcacttacggagagacaggaggaaatagccctgtccaggagttcactgtgcctgggagcaagtctacagctacc

atcagcggccttaaacctggagttgattataccatcactgtgtatgctgtcactggccgtggagacagccccgcaagcagcaagcca
 atttcattggaggtggtggatccggaggtggtggatccggaggtggtggatccatggctacaggctcccggacgtccctgctcctg
 gcttttggcctgctctgcctgccctggcttcaagagggcagtgccctccaaccattcccttatccaggctttttgacaacgctatgctcc
 gcgccccatgctctgcaccagctggcctttgacacctaccaggagttgaagaagcctatatcccaaaggaacagaagtattcattct
 gcagaacccccagacctccctctgtttctcagagtctattccgacaccctccaacagggaggaacacaacagaaatccaacctag
 agctgctccgcatctccctgctgctcatccagctcgtggctggagcccgtgcagttcctcaggagtgcttcgccaacagcctggtgac
 ggcgctctgacagcaacgtctatgacctcctaaaggacctagaggaaggcatccaaacgctgatggggaggctggaagatggca
 gccccggactgggcagatctcaagcagacctacagcaagttcgacacaaactcacacaacgatgacgcactactcaagaacta
 cgggctgctctactgcttcaggaaggacatggacaaggtcgagacattctcgcgcatcgtgcagtgccgctctgtggagggcagct
 gtggcttctaa
 //

- Séquence en acides aminés : (PM ≈ 45KDa)

GLDSPTGIDFSDITANSFTVHWIAPRATITGYRIRHHPEHFSGRPREDRVPHSRNSITLT
 NLTPGTEYVVSIVALNGREESPLLIGQQSTVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVT
 VRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGRGDSPASSK
 PISIGGGGSGGGGSGGGGSMATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNA
 MLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSN
 LELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLED
 GSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEG
 SCGF*

❖ Chimère 5

Cette chimère contient les domaines de liaison de collagène seulement :

CH 5.



- Séquence nucléotidique : (915 pb)

ctttgca cgtgctggtg caacggagtc agctgccaaag agacagctgt aaccagact tacggtggca acttaaatgg
 agagccatgt gtcttaccat tcacctacaa tggcaggacg ttctactcct gcaccacgga agggcgacag gacggacatc
 tttggtgcag cacaacttcg aattatgagc aggaccagaa atactcttc tgacagacc aactgtttt ggttcagact

caaggaggaa attccaatgg tgccttgtgc cacttcccct tctatacaa caaccacaat tacactgatt gcacttctga
 gggcagaaga gacaacatga agtgggtggtg gaccacacag aactatgatg cgcaccagaa gtttgggttc tgccccatgg
 ctgcccacga ggaaatctgc acaaccaatg aaggggtcat gtaccgcatt ggagatcagt gggataagca gcatgacatg
 ggtcacatga tgagggtcac gtgtgtggg aatggctgtg gggaatggac atgcattgcc tactcgaac ttcgagatca
 gtgcattgtt gatgacatca cttacaatgt gaacgacaca ttccacaagc gtcataaga ggggcacatg ctgaactgta
 catgcttcgg tcagggtcgg ggcaggtgga agtgtgatcc cgtcgaccaa tgccaggatt cagagactgg gacgtttat
 caaattggag attcatggga gaagtatgt catggtgtca gataccagt ctactgctat ggccgtggca ttggggagtg
 gcattgcaa ctttacaga cctaccaag ctcaagtgt cctgtcgaag tattatcac tgagactccg agtcagccca
 actcccacc catccagtgg aatgcaccac agcca taa

- Séquence en acides aminés

LCTCLGNGVSCQETA V T Q T Y G G N L N G E P C V L P F T Y N G R T F Y S C T T E G R Q D G H L W C S
 T T S N Y E Q D Q K Y S F C T D H T V L V Q T Q G G N S N G A L C H F P F L Y N N H N Y T D C T S E G R R D N M
 K W C G T T Q N Y D A D Q K F G F C P M A A H E E I C T T N E G V M Y R I G D Q W D K Q H D M G H M M R C T
 C V G N G R G E W T C I A Y S Q L R D Q C I V D D I T Y N V N D T F H K R H E E G H M L N C T C F G Q G R G R
 W K C D P V D Q C Q D S E T G T F Y Q I G D S W E K Y V H G V R Y Q C Y C Y G R G I G E W H C Q P L Q T Y P S
 S S G P V E V F I T E T P S Q P N S H P I Q W N A P Q P *

❖ Chimère 6

Cette chimère contient les domaines de liaison à l'héparine seulement.

CH 6.



- Séquence nucléotidique : (234 pb)

atccagtggaatgcaccacagccatctcacattccaagtacattctcaggtggagacctaaaaattctgtaggccgttgaaggaag
 ctaccataccagccactaaactcctacaccatcaaaggcctgaagcctggtgtgtgtatacgaggccagctcatcagcatccagc
 agtacggccaccaagaagtgactc gctttgactt caccaccacc agcaccagca ca taa

- Séquence en acides aminés

IQWNPQPSHISKYILRWRPKNSVGRWKEATIPGHLNSYTIKGLKPGVVYEGQLISIQ
 QYGHQEVTRFDFTTTSTST*

XIX.2. Alignement multiple des séquences

Afin de valider les séquences préparées, des alignements avec les séquences des banques d'ADNc (NCBI blast) et des protéines (Uniprot blast) est réalisé dans l'intention de vérifier la similarité de nos séquences avec les données de la Fibronectine. Les résultats des alignements des domaines principales constituants des chimères sont présenté brièvement ici et les détails de toutes les constructions est retrouvés dans les annexes.

XIX.2.1. Alignement des séquences nucléotidique :

Nous exposons dans cette partie un exemple pour une des constructions des chimérées préparé et l'ensemble des résultats de toutes les constructions est attaché en annexe.

Domaine de fixation de collagène :

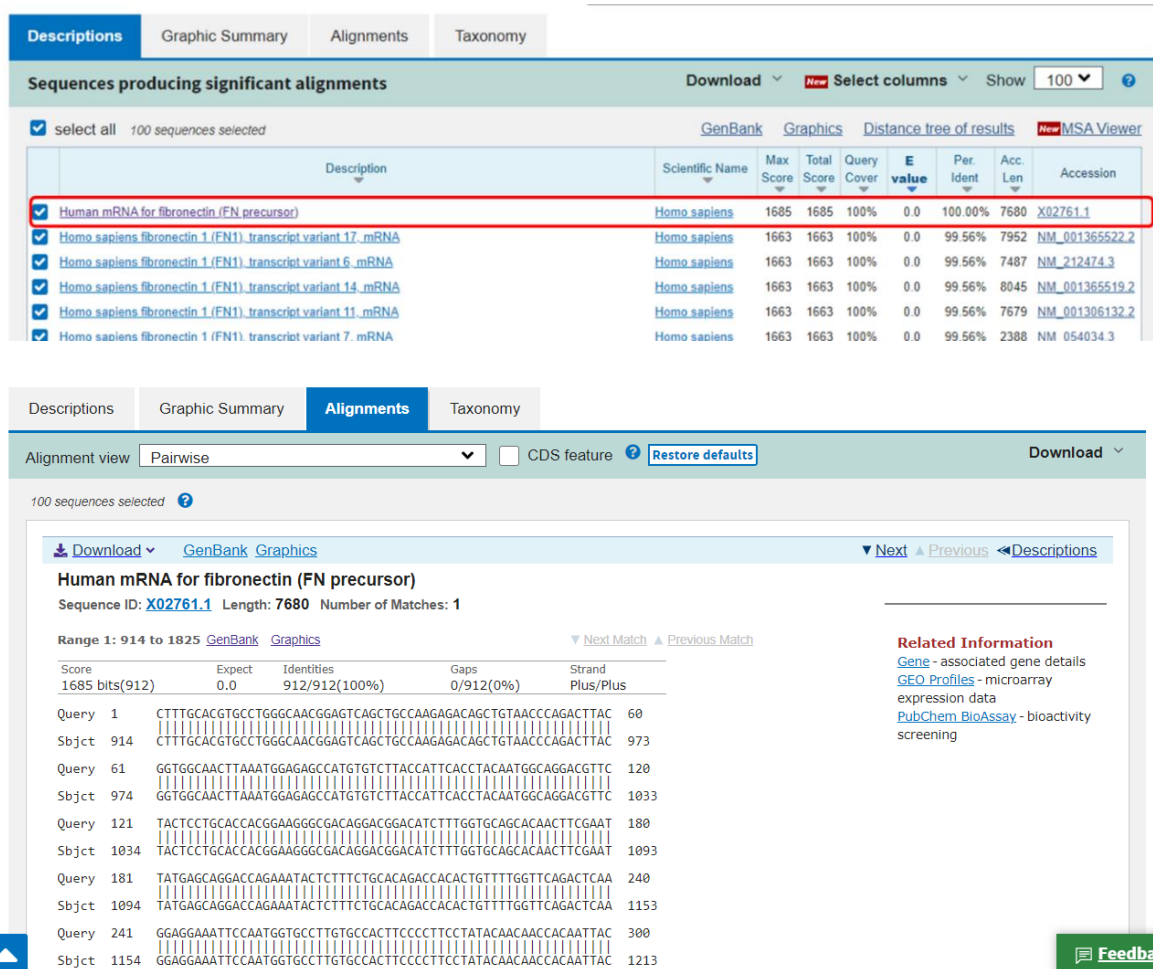


Figure 71: Résultats de l'alignement avec une multitude de séquences de la base de donnée du NCBI par l'outil « data base sequence blast »

Les résultats ont montré une similitude de l'ordre de 100 % avec la séquence de l'ARN messager de l'isoforme Homo sapiens fibronectin , avec un query cover de 100% (figure 71). L'alignement a montré que la similitude est retrouvée au niveau les séquences 914 en 5' jusqu'à 1825 en 3' de l'ARNm de la FN qui correspond bien au domaine Collagène Binding . Par conséquent, ces résultats confirment l'identité de notre séquence nucléotidique préparée. Les mêmes résultats ont été obtenus pour toutes les autres séquences.

XIX.2.2. Alignement des séquences peptidiques :

Les séquences nucléotidiques ont été traduite in silico par le logiciel SerialCloner et les fragments peptidiques issus ont été alignés à la base des données des séquences protéiques Uniprot.

The screenshot displays the UniProt BLAST interface. At the top, there is a search bar and navigation links for BLAST, Align, Retrieve/ID mapping, Peptide search, and SPARQL. The main content area shows the BLAST results for a query. A color scale for 'Identity %' ranges from 100 (red) to 0 (blue). The results are filtered by 'Score' and show an 'Overview' of 233 matches. A table lists the top matches:

Entry	Protein names	Match hit	Identity
P02751	Fibronectin (Homo sapiens)	100.0%	100.0%
A0A2I2YUM2	Fibronectin (Gorilla gorilla gorilla)	100.0%	100.0%
A0A2R9C8N0	Fibronectin (Pan paniscus)	100.0%	100.0%
A0A2I3SWM9	Fibronectin (Pan troglodytes)	100.0%	100.0%

Below the table, there are options to 'Align', 'Download', 'Add to basket', and 'Columns'. The page also shows 'Alignments' and 'Map to' sections. A red arrow points to the first result, 'Fibronectin (Homo sapiens)', which has a 100.0% identity.

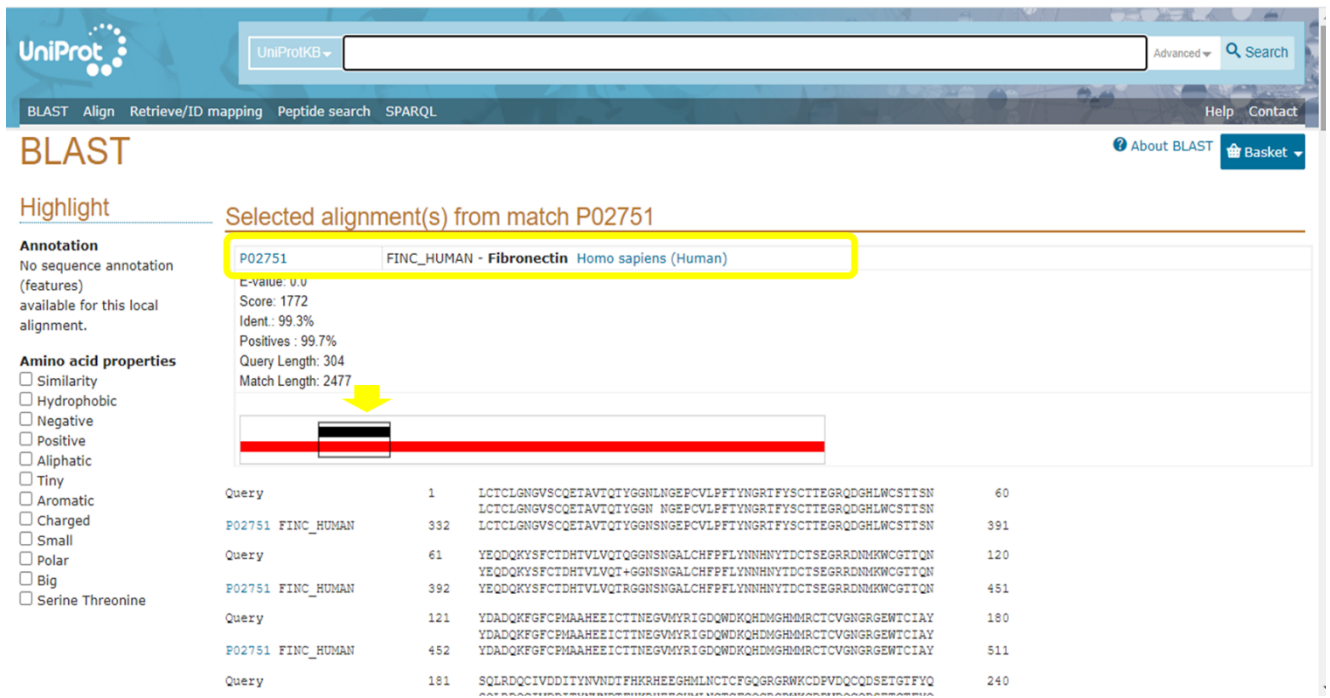
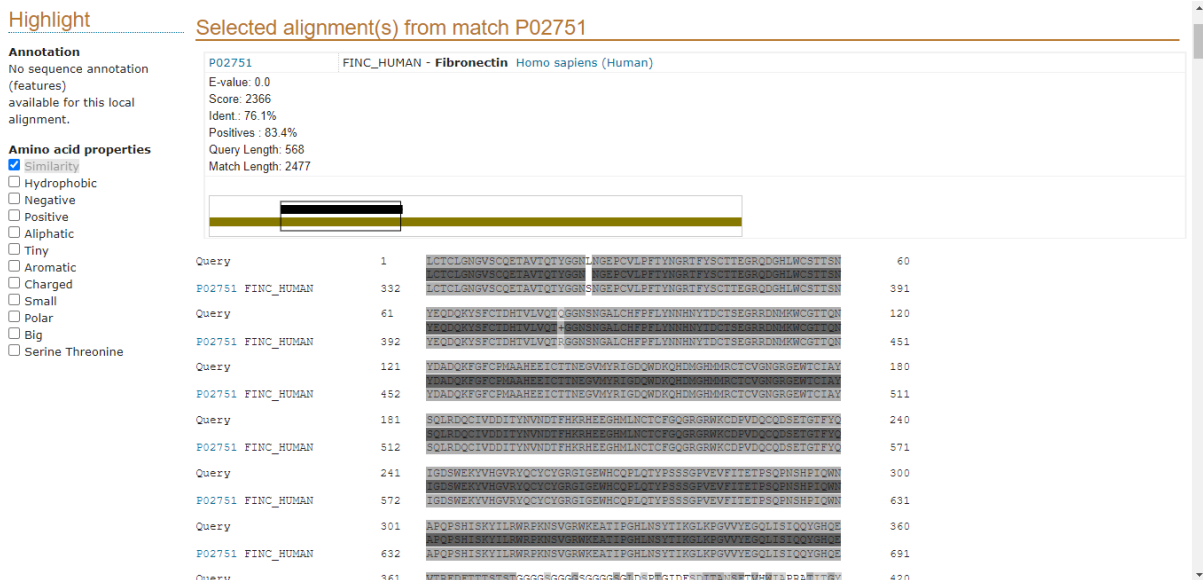


Figure 72: Résultats de l'alignement avec une multitude de protéines par l'outil Uniprot
Comme montré dans la figure 72, une similitude de 100% est retrouvée avec la Fibronectine humaine (homo sapiens) au niveau de la région de collagène binding ce qui valide la séquence préparée. De plus les séquences construites par combinaisons des domaines ont montré également les similitudes souhaitées avec la vérification à chaque fois des domaines en amont et en aval des espaceurs. La figure ci-dessous illustre l'exemple d'alignement pour la CH1.



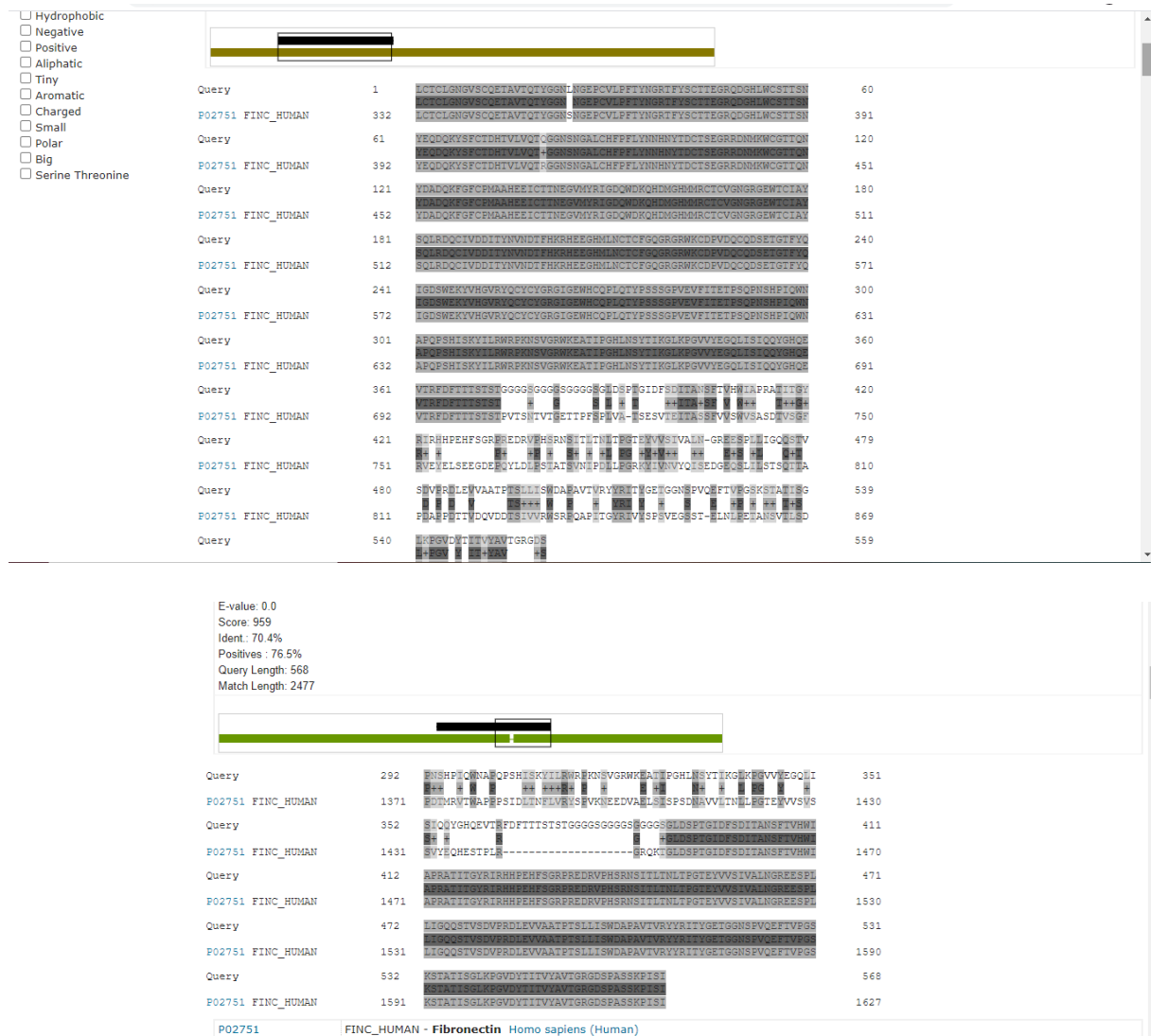


Figure 73: Résultats de l'alignement de la CHI

Ces résultats valident les séquences construites avec succès. Ainsi, les séquences codantes pour les chimères ont été synthétisée par la compagnie GenScript et insérées dans le plasmide pUC47. Les séquences synthétisées sont validées par séquençage pour valider l'absence de mutation. Nous avons ensuite procédé au clonage et expression de ces différentes chimères protéiques afin de produire les ligands innovants développés.

XX. Clonage des chimères protéiques

Les différentes chimères ont été cloné dans le vecteur d'expression pET SUMO Champion par la méthode de TA cloning. Les séquences codantes ont été récupérées et amplifiées par PCR en utilisant la pfu polymérase dans le dernier cycle d'amplification. Le clonage des chimères dans

le vecteur pET SUMO est réalisée en une seule étape grâce à l'ajout d'une seule désoxyadénosine (A) aux extrémités des produits de PCR codant l'insert, ces derniers se lient efficacement aux résidus 3' désoxythimidines (T) du vecteur linéarisé. La validation de clonage est réalisée par PCR sur colonie et par digestion enzymatique dans le but de cribler les vecteurs efficacement clonés et vérifier la présence de l'insert.

XX.1.1. Amplification des par PCR

Les inserts synthétisés ont été amplifiés par PCR à partir du pCUV de synthèse dans l'objectif de récupérer les séquences codantes et les préparer au clonage dans le vecteur d'expression. L'amplification par PCR a été réalisée à l'aide d'amorces spécifiques développées in silico pour chaque chimère. La figure 74 présente les résultats de l'analyse électrophorèse des produits de PCR.

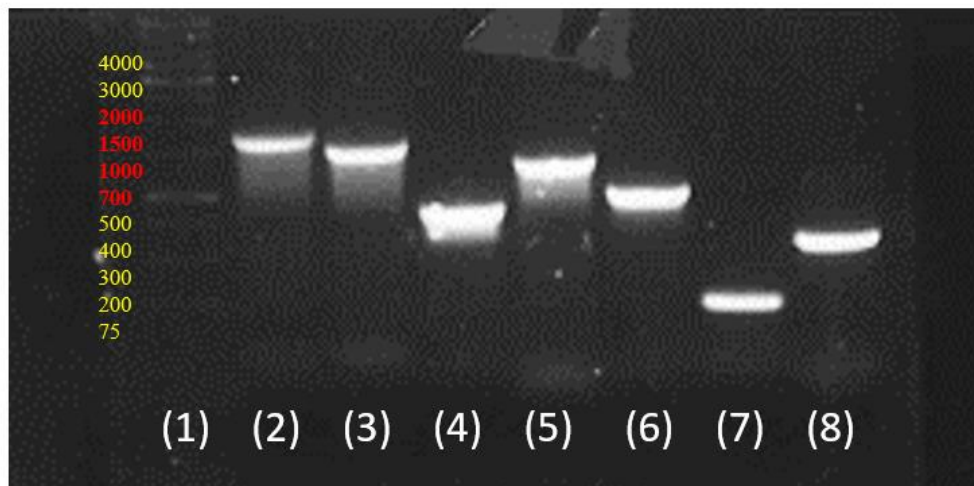


Figure 74 : : Analyse du produit PCR sur gel d'agarose à 1% :

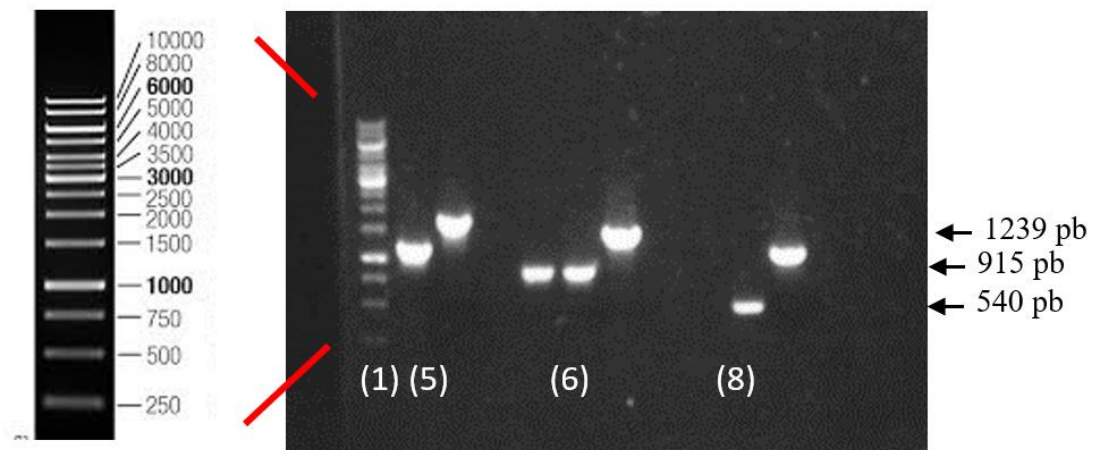
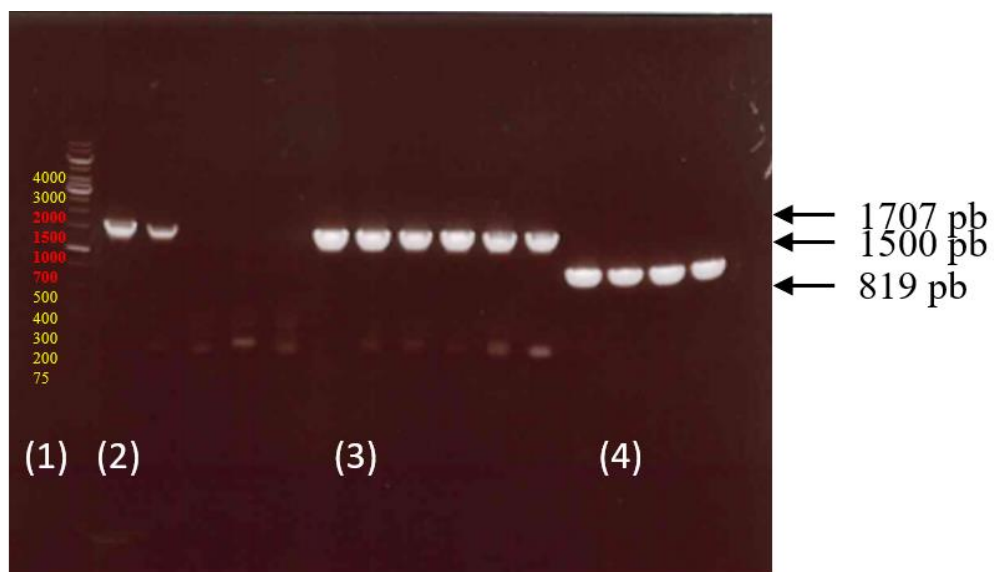
1 : marqueur de poids moléculaire (1 Kb DNA Ladder), 2-8 : produit PCR de l'amplification des chimères ; (2) : Collagen-heparin-cells bindings (1707pb) ; (3) : Collagen-cells bindings (1500 pb) ; (4) : heparin-cells bindings (819pb) ; (5) hGH-cells binding (1239 pb) ; (6) : Collagen bindings (915pb) ; (7) : heparin binding (204pb) ; (8) : cells bindings (540pb)

La taille des fragments amplifiés présentés en figure 74 correspond à celle attendue pour chacune des chimères conçues confirmant ainsi la récupération des séquences synthétisées. Chaque séquence est ensuite liguée dans le vecteur pET SUMO par TA cloning et les vecteurs recombinants sont criblés par PCR sur colonie et validés par digestion enzymatique afin de confirmer la présence de l'insert .

XX.1.2.Validation du clonage

- Par PCR sur colonie

Afin de confirmer l'étape de ligation et récupérer les vecteurs renfermant l'insert, les clones positives ont été analysés par PCR sur colonie dont la matrice d'amplification est à chaque fois la séquence de la chimère en question. Les bandes correspondantes au poids moléculaires de chaque séquence est recherché. La figure 75 présente les résultats de l'analyse électrophorèse de cette étude.



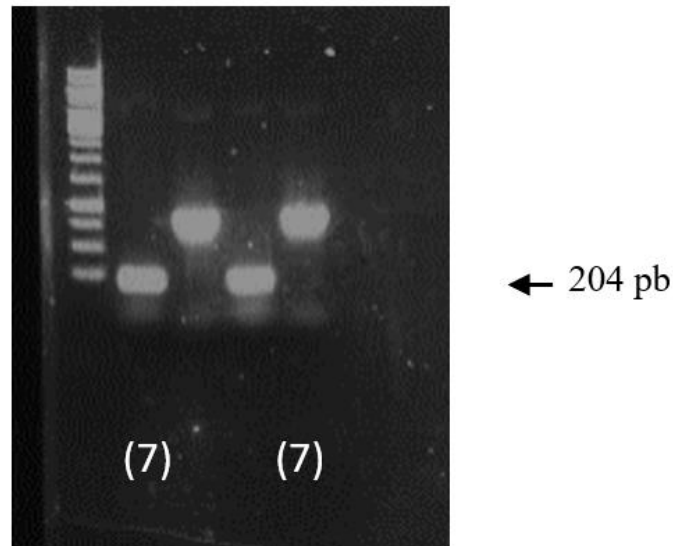


Figure 75 : Validation de la ligation de l'insert (les différents chimères) dans le vecteur d'expression pET CHAMPION par PCR

Analyse du produit PCR sur gel d'agarose à 1% la flèche située au niveau chaque gel indique les bandes correspondant à la taille attendue de l'insert

Les tailles des fragments amplifiés présentés en figure 75 correspondent à celle attendue pour chaque insert des différentes chimères. Les inserts sont donc bien présents dans le vecteur d'expression pET SUMO.

Par ailleurs, il est important de mentionner que chaque étape a été réalisé et validé *in silico* via le logiciel Serial Cloner et les prédictions obtenus sont comparés aux résultats expérimentaux.

- **Par digestion enzymatique**

La validation du clonage a été réalisé aussi par digestion enzymatique des plasmides recombinants récupérés à partir des clones positives validées comme décrit dans le chapitre « matériels et méthodes ». Brièvement, pour chaque construction des enzymes de restriction qui coupent au niveau de l'insert ont été cherché dans la carte de restriction du plasmide recombinant en utilisant le logiciel Serial Cloner. Nous avons réalisé la digestion enzymatique *in silico* pour chaque insert et les résultats sont comparés aux résultats expérimentaux pour la validation.

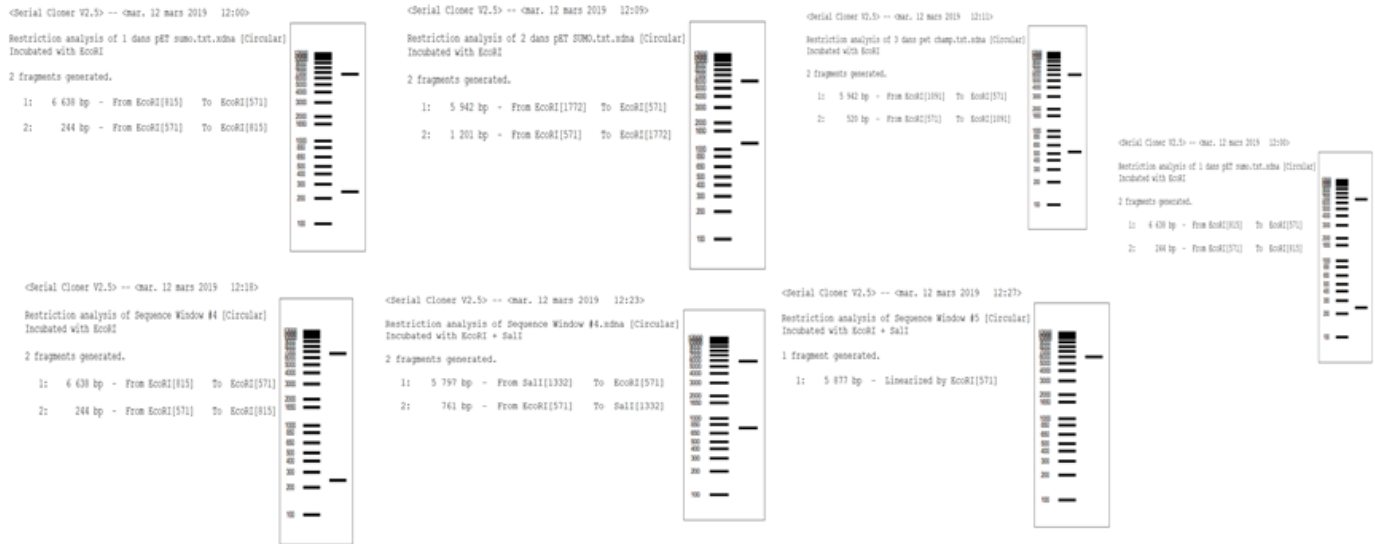
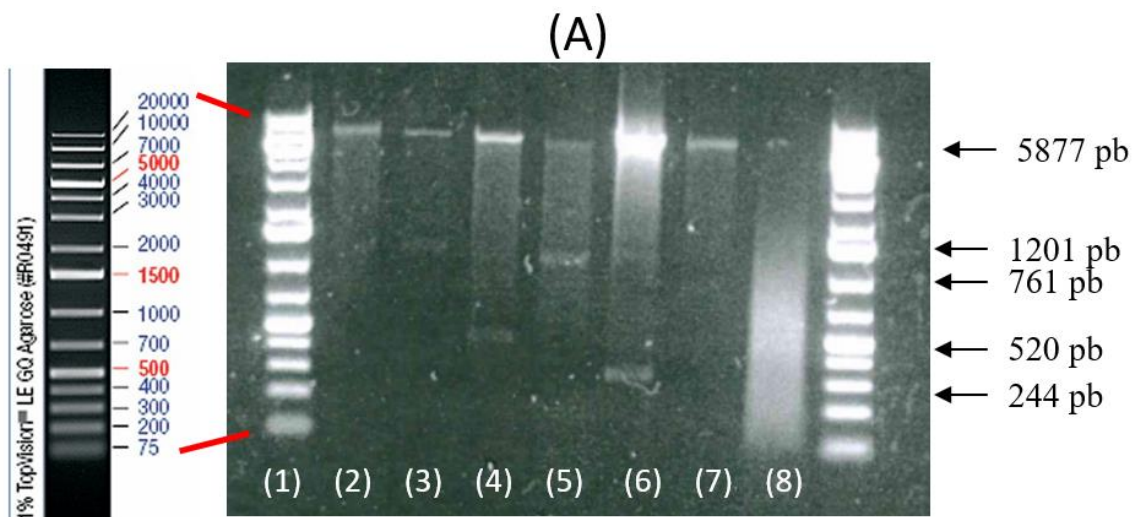


Figure 76: Résultats de digestion enzymatique des vecteurs recombinant in silico via virtuel cut Serial Cloner



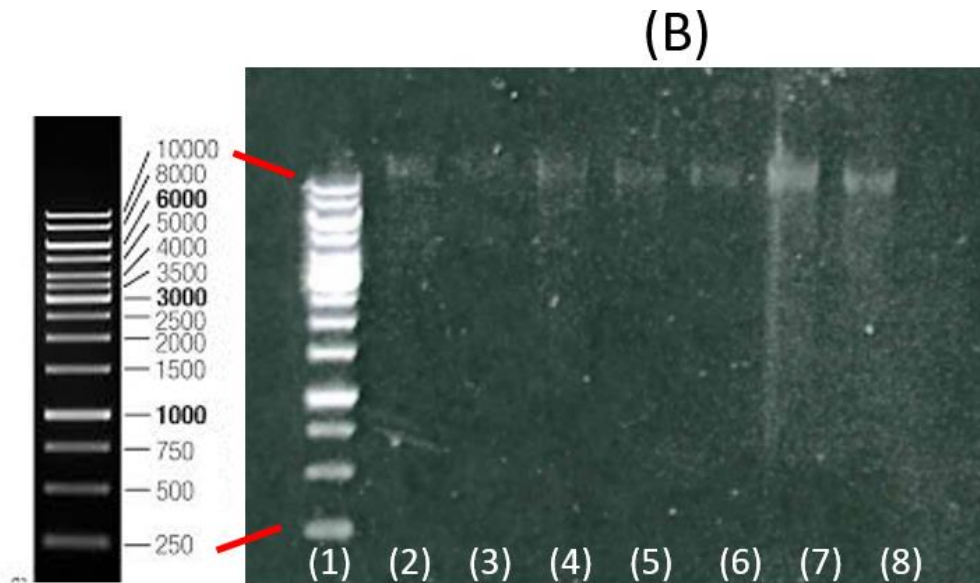


Figure 77 : Validation du clonage des chimères protéiques par digestion enzymatique

(A) : produit de digestion enzymatique des plasmides par *EcoRI* (*p5* +*SalI*) ; (B) contrôle de l'intégrité du vecteur plasmides non coupés; 1 : marqueur de poids moléculaire (1 Kb DNA Ladder), 2-8 : résultat de digestion ou non des plasmides contenant (2) : Collagen-heparin-cells bindings; (3) : Collagen-cells bindings ; (4) : heparin-cells bindings; (5) hGH-cells binding; (6) : Collagen bindings; (7) : heparin binding; (8) : cells bindings;

Le produit de digestion révélé sur gel d'agarose est présenté dans la figure 77. On remarque la présence de deux fragments sur le gel d'agarose pour chaque puit valide la digestion. De plus les bandes apparus pour chaque réaction de digestion se situait bien vers les mêmes tailles moléculaires attendu par estimation *in silico* (figure 77). Ces résultats viennent valider les différentes étapes de clonage réalisées.

XXI. Production des chimères protéiques

Dans cette partie, nous allons analyser les résultats obtenus pour les études d'expression, d'optimisation de la production et de purification des différentes chimères protéiques d'une manière très synthétique.

XXI.1. Niveaux d'expression des protéines chimérique :

L'expression des différentes chimères protéique a été réalisée dans le système bactérien *E. coli*. Chaque étape d'expression, d'extraction et de purification a été effectuées selon le même protocole de la production du FNIII9/10 présenté dans le chapitre 3. Le vecteur d'expression

pET SUMO utilisé dans cette étude de l'expression des chimères protéiques possède le tag His permettant la purification de nos protéines par affinité sur billes de nickel ainsi que le tag SUMO de solubilisation de protéine.

Dans un premier temps, des tests d'expression des différentes chimères ont été réalisés afin d'investiguer les niveaux d'expression et solubilité de protéines chimériques. Les chimères protéiques ont été exprimées dans la souche BL21 pLysS cultivée en milieu LB induite par 0.5 mM IPTG à 25°C. Les protéines recombinantes ont été extraites par lyse enzymatique et la fraction soluble issue a été purifiée sur des billes de nickel. Le niveau d'expression des différentes chimères a été déterminé par analyse électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Les fractions insolubles (C) et soluble (Sg) en Figure 78 permettent d'évaluer le niveau d'expression et le niveau de solubilité de chaque protéine de fusion.

Comme le montre la figure 78, l'analyse sur gel SDS PAGE de la fraction insoluble, soluble et purifiée des différentes expériences montrent des niveaux d'expression différents pour les chimères. Tout d'abord, l'apparition des bandes relatives au bon poids moléculaire de chaque chimère valident leurs expressions. Par contre, on constate que le niveau de solubilité des chimères est très variable. Pour les chimères 3, 6 et 7 une expression soluble est observée avec une bande relative à la protéine d'intérêt au niveau de la fraction purifiée. Contrairement, pour les chimères 1, 5 et 2 la bande relative à la protéine de fusion était plus intense au niveau des fractions insolubles. Aucune bande n'est observée au niveau des fractions purifiées ce qui suggère une expression totalement insoluble de ces protéines.

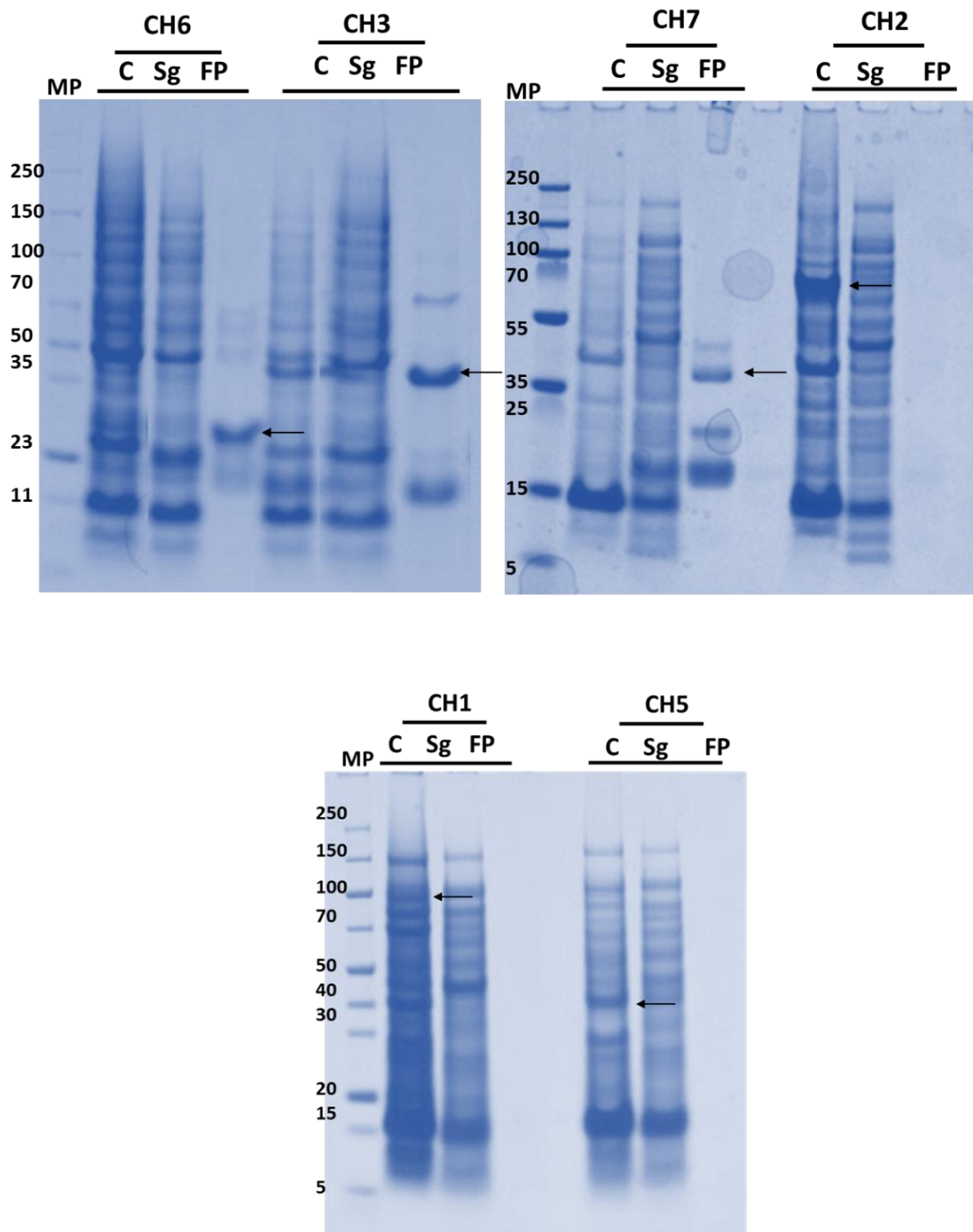


Figure 78 : Niveau d'expression et de solubilité des différentes protéines de fusion surexprimées dans les cellules *E. coli* (souche BL21 (DE3) pLysS) analysé par SDS-PAGE.

Gel de polyacrylamide 12%. La protéine d'intérêt est identifiée avec une flèche dans les fractions de l'extrait protéique total insoluble(c) et soluble (Sg). Les constructions #1, 3, 4, 5 et 7 ont été surexprimées pendant ON h à 25 °C.

Cette expression fortement insoluble a conduit la nécessité d'optimiser les conditions d'expression afin d'améliorer le taux de solubilité. Une analyse de l'expression de ces 3

chimères a été reproduite dans la souche BL21 DsbC dans le milieu auto induit à 18°C et les résultats ont montré une expression totalement insoluble aussi (figure 79).

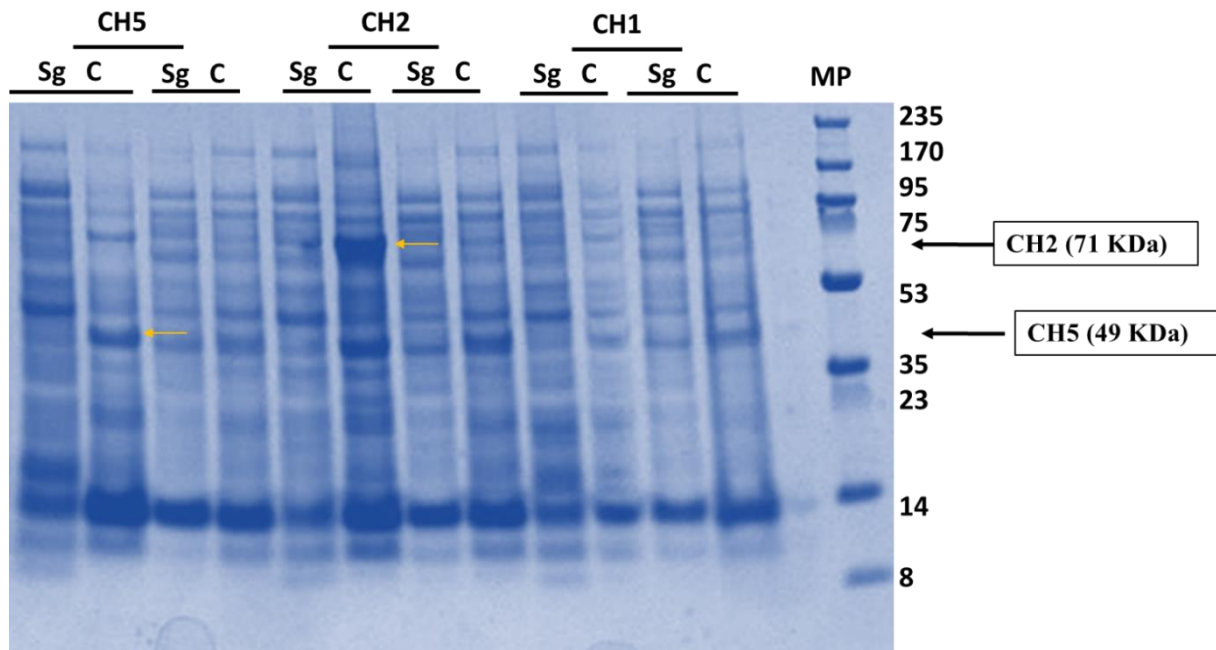


Figure 79 : Niveau d'expression et de solubilité des CH 1, CH2 et CH3

Les résultats de l'analyse sur gel de polyacrylamide montrent une surexpression des protéines de fusion CH2 et CH5. En effet, l'apparition d'une bande au poids moléculaire de CH 1 (71KDa) et CH3 (49 KDa) au niveau de la fraction insoluble des cultures induites comparées à celle non induite confirme bien l'expression des protéines d'intérêt. Toutefois, ces bandes au niveau de la fraction insoluble suggèrent les protéines d'intérêt sont toujours exprimées dans des corps d'inclusion. Ces hypothèses n'ont toutefois pas pu être explorées pour la CH1 en, puisqu'on observe seulement de très faibles bandes.

XXI.2. Solubilisation des protéines de fusion par le Sarkosyl

Bien que les chimères ont été produites en fusion avec le tag SUMO de solubilisation très reporté dans la littérature, ont a constaté une forte expression insoluble pour certaines chimères, principalement la CH1 , CH2 et la CH5. Une optimisation des conditions d'expression n'a pas permis de produire les protéines d'intérêt sous forme soluble pour les 3 chimères. Par ailleurs possible que cette expression insoluble est du au domaine de fixation au collagène présent dans les trois chimères. Ce domaine est très riche en ponts disulfure ce qui favorisent potentiellement

des expressions insolubles des protéines d'intérêts majoritairement exprimés dans des corps d'inclusion dû à un repliement incorrecte.

Ainsi nous nous sommes proposés de solubiliser les protéines par l'ajout du sarkosyl. Le Sarkosyl est un détergent doux permettant de solubiliser les protéines et de corriger les misfolding. Dans de nombreuses études précédentes qui utilisent le sarkosyl pour solubiliser les protéines de CI, les tampons de lyse contiennent généralement de faibles pourcentages, de 0,1% à 2%, de sarkosyl (Burgess, 2009).

Dans un premier temps nous avons étudié l'effet de Sarkosyl sur la solubilisation de la CH2. Cette chimère a été retenue pour cette investigation puisqu'elle présentait le niveau d'expression insoluble le plus élevé. Des pourcentages de Sarkosyl (0% , 0.2 % , 0,6 % , 1% et 2%) ont été évalué. La figure 80 montre le résultat de l'analyse électrophorèse des fractions solubles et purifiées pour chaque expérience.

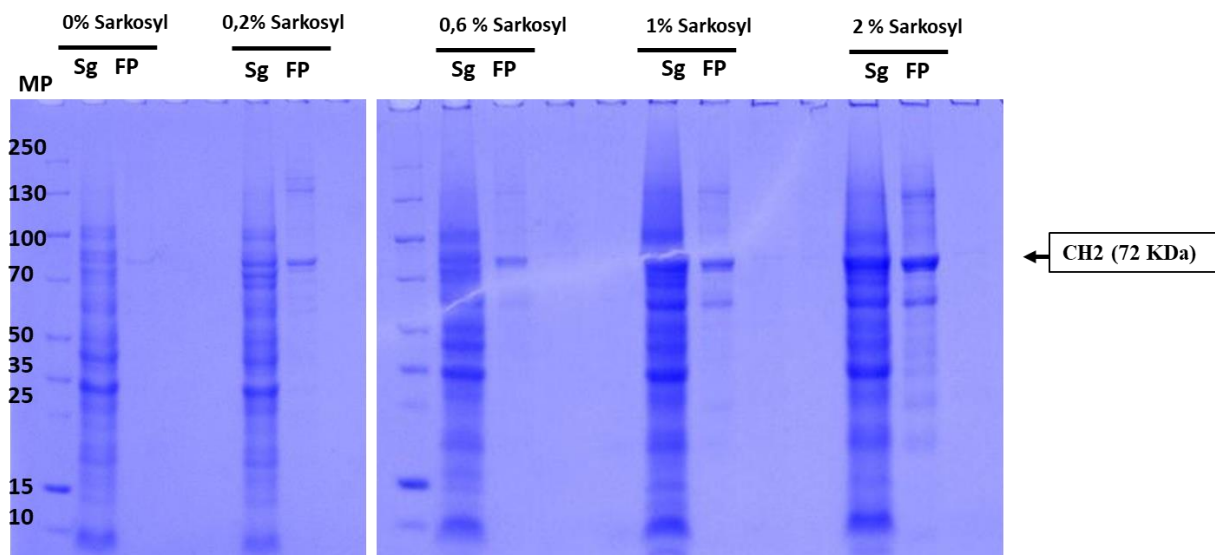


Figure 80: Etude de l'effet de sarkosyl sur la solubilisation des CH2

Comme le montre la figure 80, l'ajout de sarkosyl a largement amélioré la solubilité de la protéine recombinante CH2. De plus, on observe que les niveaux de solubilité les plus élevés sont obtenus lorsque le pourcentage de sarkosyl était plus élevé. L'intensité de la bande relative à la CH2 a augmenté au niveau de la fraction soluble ainsi que la fraction purifiée. Ainsi, 2% de sarkosyl a permis une meilleure solubilisation de la protéine d'intérêt.

En conclusion, l'utilisation de sarkosyl pour résoudre le problème de l'expression insoluble s'est avéré efficace et a permis de récupérer la protéine d'intérêt sous forme soluble. D'autre part 2% de sarkosyl a été retenu comme meilleur pourcentage pour une solubilisation optimale.

XXI.3. Expression et purification des chimères protéiques

Plusieurs paramètres ont été optimisés pour l'expression de chaque chimère protéique. Comme discuté dans la partie précédente, les chimères CH3, CH6 et la CH7 ont été exprimée sous forme soluble chez *E. coli*. Ainsi, une optimisation avec l'utilisation de milieu auto-inductible, qui a montré des résultats très intéressantes précédemment pour le fragment rFNIII9/10, a permis d'améliorer le rendement d'expression. Pour les chimères CH1, CH2 et CH5 des niveaux d'expression insoluble ont été observé. Afin de récupérer les protéines d'intérêt, une solubilisation avec le Sarkosyl a été réalisé. Les résultats présentés dans le tableau 19 correspondent aux conditions optimisées de production de chaque chimère produite.

Tableau 19 : Rendement de production des chimères protéiques

Chimère	Conditions de production	Rendement de production (mg/culture 1L)
CH1	Souche : BL 21 pLysS Milieu : auto induit Température : 25°C Extraction : Lyse enzymatique avec solubilisation par le sarkosyl	~ 1,2
CH2	Souche : BL 21 pLysS Milieu : auto induit Température : 25°C Extraction : Lyse enzymatique avec solubilisation par le sarkosyl	~ 9
CH3	Souche : BL 21 DsbC Milieu : auto induit Température : 18°C Extraction : Lyse enzymatique	~ 7.22
CH5	Souche : BL 21 DsbC Milieu : auto induit Température : 25°C Extraction : Lyse enzymatique avec solubilisation par le sarkosyl	~2.3
CH6	Souche : BL 21 DsbC Milieu : auto induit Température : 18°C Extraction : Lyse enzymatique	~8.2
CH7	Souche : BL 21 DsbC	~10.7

	Milieu : auto induit Température : 18°C Extraction : Lyse enzymatique	
--	--	--

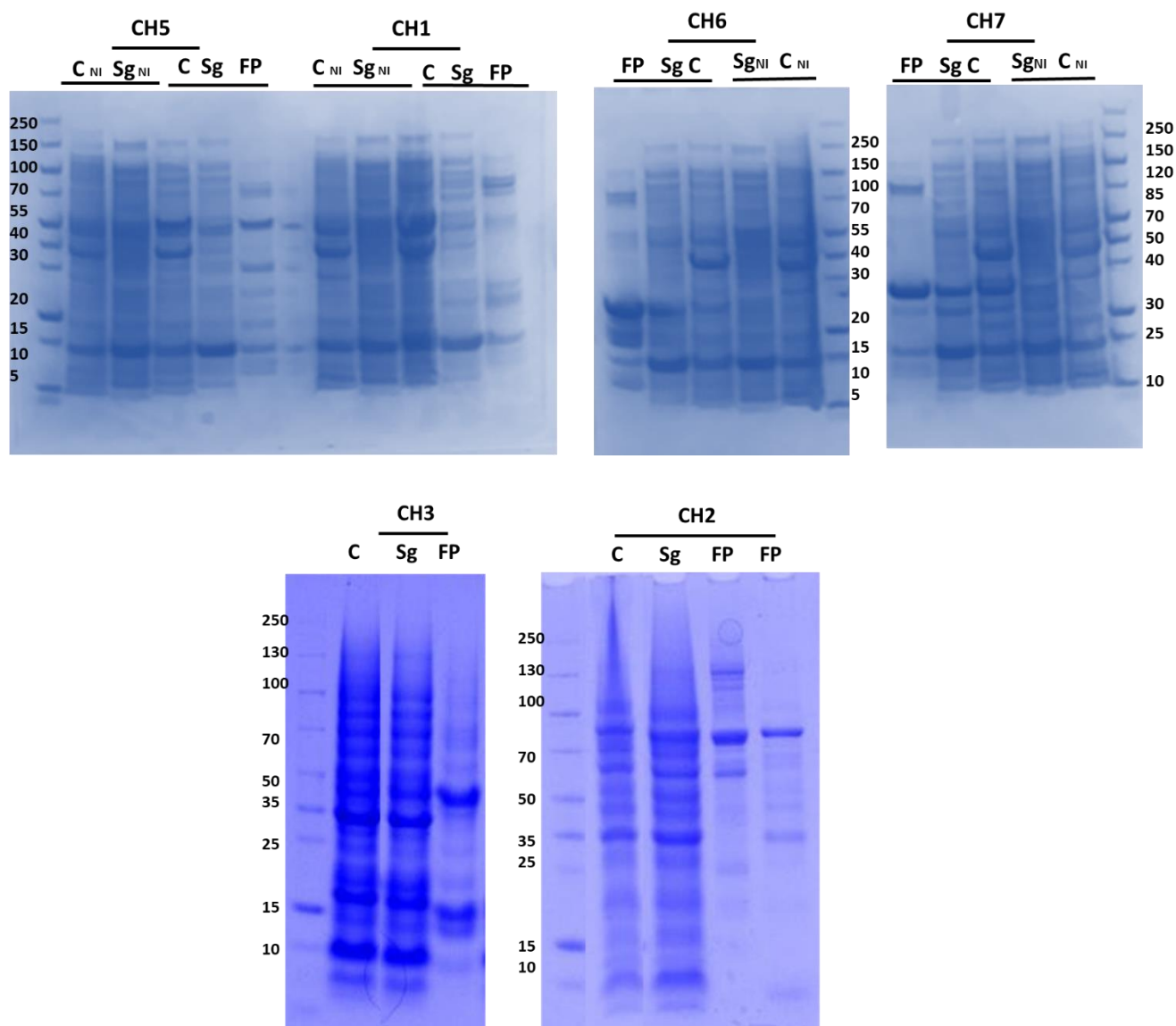


Figure 81 : Expression des chimères protéiques

Des rendements de production ainsi que des conditions d'expression différentes et variables ont été observé pour chaque protéine de fusion. Ces résultats sont également confirmés par analyses sur gel de polyacrylamide qui a montré une intensité de bande relative à chaque protéine recombinante distinct (figure 81).

D'autre part, les protéines chimériques, exprimée en fusion avec l'étiquette poly-His, ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur résine de nickel. Le gel SDS-PAGE (figure 82) a montré des bandes intenses correspondant au poids moléculaire attendu de chaque chimère se qui valide la récupération et la purification de chaque protéine d'intérêt.

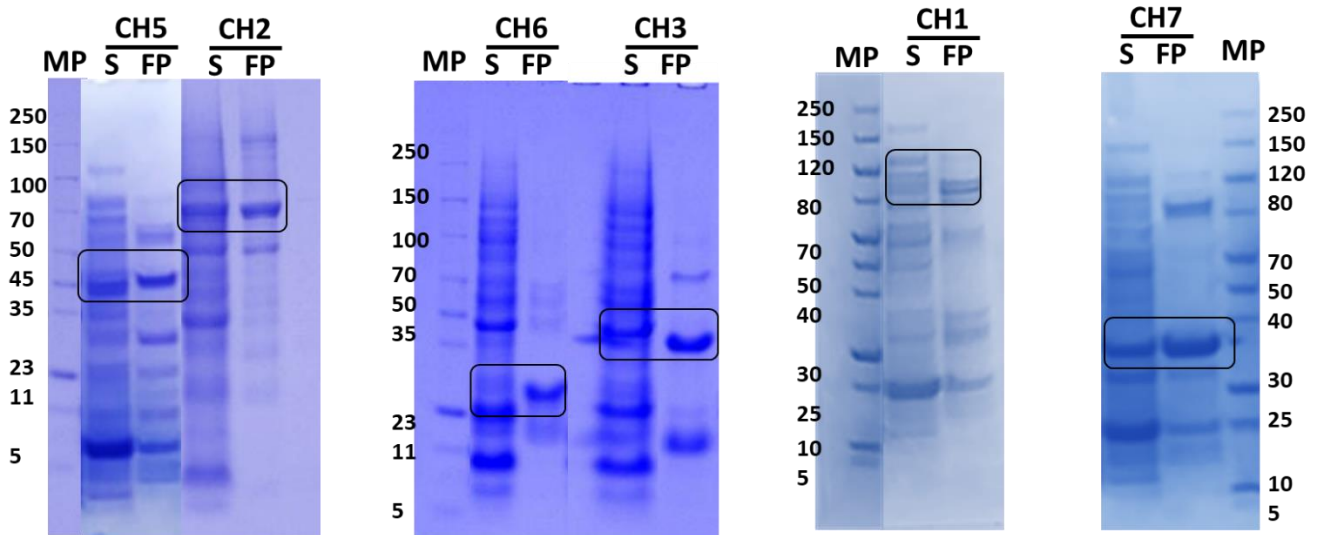


Figure 82 : Analyse de la purification des chimères protéiques produites

Cependant, la comparaison de la qualité de purification réalisée a montré la présence de contaminants dans la fraction purifiée. Ces différentes protéines de fusion n'avaient ainsi pas pu être purifiées efficacement en utilisant la chromatographie d'affinité sur résine de nickel, tel qu'observé dans la littérature (Bornhorst & Falke, 2000b; Keefe et al., 2001b), ce qui permettait de supposer qu'il serait préférable de procéder à une deuxième purification.

XXII. Validation des chimères produites

Des difficultés d'expression et d'optimisation de la production pour certaines chimères ont été rencontrés durant cette étude. Ces obstacles ont conduit à un décalage entre les étapes de validation des chimères à savoir l'expression, la transposition d'échelle et la validation de l'activité biologique. Dans cette section, seules les chimères auxquelles on a pu valider l'étape de production et arriver ensuite l'activité biologique seront présentés. Il est tout de même important de souligner que les études de validation réalisées dans cette partie correspondent à des analyses préliminaires qui visent à avoir une information et une confirmation précoce sur l'activité biologique des protéines conçus.

XXII.1. Etude de l'adhésion cellulaire

Afin d'évaluer l'activité biologique des chimères produites, l'adhésion cellulaire a été étudiée, sur des surfaces avec ou sans revêtement initial des chimères au bout de 2 h d'incubation dans un milieu sans sérum. Cette approche a permis d'évaluer le potentiel des chimères comportant le domaine de fixation des intégrines (CH2 et CH3) à favoriser l'adhésion des cellules en les comparant avec le fragment bio adhésif rFNIII9/10 validé précédemment. Les résultats obtenus dans la figure 83, montrent que l'adhésion cellulaire a été améliorée sur les surfaces traitées par la CH2 et la CH3 par rapport au témoin. D'autre part, une adhésion cellulaire comparable à celle obtenue pour le fragment rFNIII9/10 a été également observée pour ces chimères.

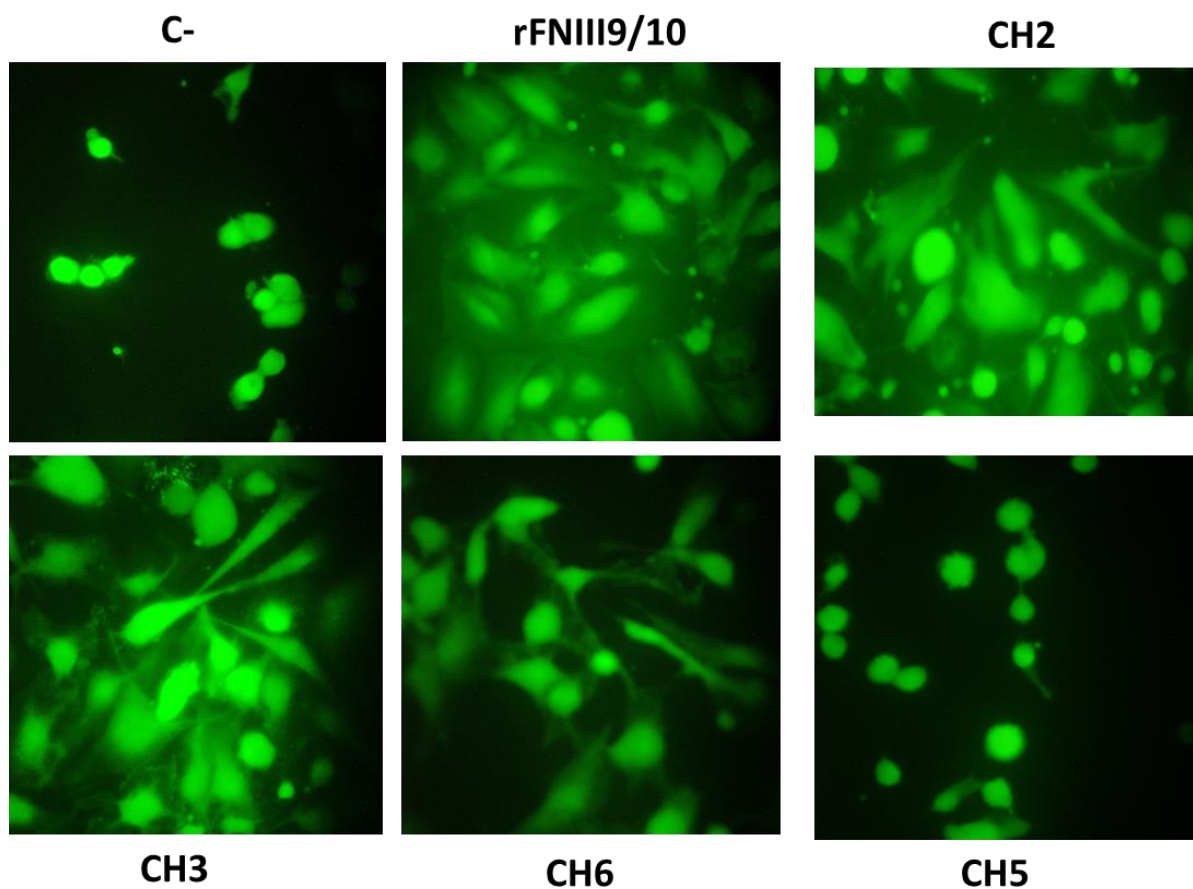


Figure 83 : Etude de l'adhésion cellulaire sur des surfaces traitées par les chimères ;
CH2 -CH3-CH5 et CH6

Comme le montre la figure 83, l'étalement cellulaire sur les surfaces des puits des plaques n'est pas le même pour les différentes constructions. Pour la CH5, le nombre de cellules ainsi que leur morphologie s'approchent à celle du témoin négatif. Cette chimère contient le domaine de fixation de collagène et n'est pas impliquée dans l'adhésion cellulaire. Pour la CH6 et contrairement à prévu, une morphologie cellulaire différente à celle du témoin négatif a été

observée. Bien que le nombre de cellules adhérentes soit plus faible que celui obtenu avec la rFNIII9/10, les cellules sont bien étalées sur les surfaces traitées par la CH6. La CH6 contient le domaine de fixation de l'héparine et ces résultats montrent une implication de ce domaine dans l'adhésion cellulaire. Ces observations ont été également notées par Hocking et al. (2016) qui ont investigué le potentiel des chimères issus des domaines de fixation de l'héparine et des cellules de la FN (Hocking et al., 2016). Enfin, pour les CH2 et CH3, le comportement bio adhésif obtenu est significativement amélioré par rapport aux surfaces non traitées. Ces chimères contiennent les domaines 9 et 10 de la FNIII de fixation des récepteurs cellulaires en fusion avec d'autres domaines de la FN (domaine de fixation du collagène et de l'héparine pour la CH2 et CH3 respectivement). Les résultats préliminaires obtenus suggèrent que ce domaine reste fonctionnel et accessible et que sa production en fusion avec d'autre domaine de la FN n'a pas altéré ou masqué sa conformation.

XXII.2. Adsorption sur l'os xénogénique

La chimère 2, contenant le domaine FNIII9/10 et les domaines de fixation du collagène de la FN a été parmi les premières chimères produites et validées. Afin d'évaluer l'activité biologique de cette chimère, nous avons étudié son adsorption sur une matrice de collagène, l'os xénogénique (le Laddec).

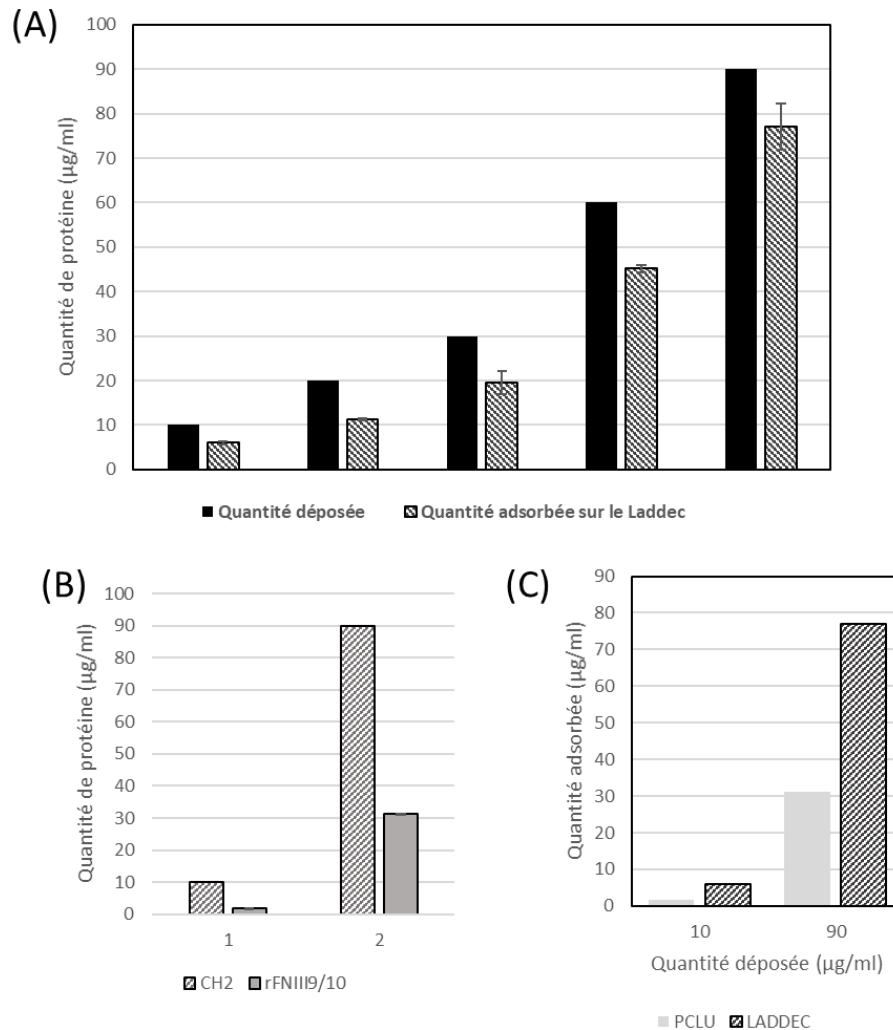


Figure 84 : Etude de l'adsorption de CH2 sur le Laddec

(A) Évaluation de l'adsorption de CH2 sur le Laddec ; (B) Adsorption de CH2 et rFNIII9/10 sur le Laddec (C) Comparaison de l'adsorption de la CH2 sur le Laddec et le PCLU

Les résultats préliminaires obtenus (figure 84.A) montrent que la CH2 s'adsorbe sur le Laddec avec un rendement approximatif de 75% pour les différentes quantités testées. L'évaluation de l'adsorption de la CH2 sur la matrice de collagène le Laddec a été réalisée en le comparant avec l'adsorption de fragment rFNIII9/10 sur ce dernier et les résultats du test ont montré que la quantité de la CH2 adsorbée sur le Laddec est plus élevée (Figure 84.B). D'autre part, en comparant les résultats obtenus (figure 84.C) pour 10 et 90 µg déposés sur Laddec et PCLU, l'adsorption est deux fois plus importante sur le Laddec (77 µg et 30 µg adsorbées sur le Laddec et le PCLU respectivement). Le laddec est principalement composé de collagène et la CH2 possède des domaines de liaison au collagène de la FN. Ainsi, ces résultats laissent suggérer que la CH2 présente une affinité au Laddec et que son adsorption sur cette matrice peut être dû à une interaction entre son domaine fonctionnel et le collagène.

Plusieurs études visent à concevoir de petits fragments de protéines recombinantes dérivant de protéines natives de la MEC et codant pour des domaines fonctionnels ; spécifiquement, ceux reconnus pour interagir avec les intégrines (Helfrich et al., 2008). Cette approche d'ingénierie des protéines permet également la conception de nouveaux recombinants combinés pour des activités supplémentaires (Cutler et García, 2003 ; Elloumi et al., 2009 ; Kang, 2009 ; Zhang et al., 2010) garantissant des coûts réduits par rapport aux protéines de la MEC natives qui restent chers. Dans cette partie de l'étude, nous avons décrit des nouvelles chimères protéiques issues principalement des domaines de la fibronectine humaine et conçues pour l'imiter. Ces domaines fonctionnels d'interaction avec non seulement les cellules mais également avec la MEC, principalement le collagène et l'héparine ont été combinés. Différentes chimères ont été designées et clonées et produites dans le système bactérien *E. coli*. Des niveaux d'expression différentes ainsi que des difficultés de clonage ont été observés dans cette étude. Cela peut être expliqué par le vecteur ainsi que la stratégie de clonage adoptée. Le pET SUMO est un vecteur permettant le TA cloning en une seule étape. Cette stratégie bien qu'elle possède plusieurs avantages reste limitée par le manque de spécificité dans l'orientation de la séquence à cloner ce qui réduit potentiellement la réussite des étapes de clonage. D'autre part, le vecteur pET SUMO a été choisi dans cette étude comme vecteur d'expression du fait qu'il possède le tag SUMO. Ce tag de solubilité a été largement reporté et plusieurs travaux ont montré une amélioration de l'expression soluble des protéines recombinantes en fusion avec ce tag (Panavas et al., 2009). Contrairement à prévu, des niveaux d'expression insoluble ont été obtenus pour les chimères CH2 et CH5 taguées SUMO et des étapes supplémentaire de solubilisation douce par le sarkosyl ont été réalisées afin de récupérer les protéines d'intérêts. Finalement, des résultats préliminaires visant à valider les chimères produites ont montré une activité bio adhésive conservée des chimères possédant les domaines d'interaction avec les intégrines. La CH2 a également montré une affinité d'adsorption sur de l'os xénogénique constitué principalement du collagène. Ces résultats sont assez encourageants et offrent plusieurs perspectives. Un travail similaire de Roy et al. 2011 a investigué plusieurs chimères protéiques issues principalement des domaines fonctionnels de la FN (Roy et al., 2011). Il a été montré dans cette étude que les surfaces revêtues passivement par des chimères issues des domaines RGD de la FN en fusion avec le domaine de fixation de l'héparine favorisent l'adhésion et la migration cellulaires, induisent la contraction de la matrice de collagène et présentent une activité plus importante en les comparant avec d'autre chimères ou la fibronectine native (Roy et al., 2011). Ces résultats fournissent une preuve de concept pour le

développement de fragments chimériques issus de la fibronectine en tant que nouveaux ligands adhésifs pour bio fonctionnalisation des biomatériaux.

XXIII. Conclusion

Les protéines recombinantes conçues pour imiter fonctionnellement la fibronectine native fournissent une approche de bio-ingénierie intéressante pour des applications de bio fonctionnalisation des biomatériaux. Afin de mimer la FN entière dans son interaction avec les cellules et la MEC, nous avons développé des chimères protéiques combinant les domaines bio-fonctionnels de la fibronectine, principalement les domaines d'interaction avec les intégrines, le collagène de la MEC et l'héparine. Ces chimères ont été clonées et produites dans le système bactérien *E. coli*. Ces fragments mimétiques offrent des perspectives assez intéressantes notamment dans les stratégies bio inspirées de fonctionnalisation des biomatériaux .

Conclusion générale

L'objectif de ce travail de thèse a été de concevoir des ligands bio-fonctionnels recombinants à partir des domaines de la Fibronectine humaine pour la bio-fonctionnalisation des biomatériaux. Notre stratégie a consisté à développer des biomatériaux bioactivés par des fragments innovants biomimétiques issus des domaines de la fibronectine humaine. Dans cette attention, des chimères protéiques issus des domaines de la Fibronectine humaine en fonction de son affinité au récepteur membranaire cellulaire et/ ou des éléments cibles de la matrice extracellulaire dans ont été conçus et étudié.

Dans la première partie de l'étude, nous nous sommes particulièrement intéressés au domaines 9 et 10 de la fibronectine type III (FNIII9/10), impliqués dans l'adhésion cellulaire médié par les intégrines. Une première étude a été conduite pour le développement d'un procédé optimisé de production de rFNIII9/10 recombinantes, dans le système bactérien *E. coli*, le système d'expression le plus utilisé pour la surexpression de protéines recombinantes. Plusieurs paramètres de production ont été évalué : souches de *E. coli*, température d'induction, concentration d'induction, agent solubilisant et milieu de culture. Les résultats ont montré que la production de la rFNIII9/10 a été largement améliorée en optimisant les conditions d'expression. Par ailleurs, cette étude d'optimisation nous a permis de définir les conditions optimales d'expression de rFNIII9/10, souche BL21 STAR RARE cultivée en milieu auto-induit à 25°C, générant un rendement de 20 mg par culture de 1L. En outre, les tags de fusion utilisés ont été exploités afin de développer une approche simple et efficace pour la caractérisation et l'évaluation du fragment produit. En effet, rFNIII9/10 a été produite en fusion avec un multi tag CMAT. Le partenaire de fusion CMAT utilisé dans cette étude a montré son efficacité dans le suivi, la détection et l'évaluation du rFNIII9/10 avec des approches simples et plus rapide. L'activité biologique du fragment produit a été également évalué *in vitro* et les résultats ont confirmé son interaction avec les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et son efficacité à soutenir l'adhésion cellulaire. Ainsi, cette étude nous a permis de mettre au point la production du fragment recombinant FNIII9/10 et de valider son potentiel bio adhésif.

A partir de cette première étude, une preuve de concept a été réalisée dans un second temps. Nous avons développé une matrice adhésive par bio-fonctionnalisation d'un échafaudage synthétique PCLU avec le fragment rFNIII9/10 produit et à évaluer ses propriétés biologiques. Notre approche était de traiter la surface de PCLU par adsorption du fragment bio

Conclusion

adhésif rFNIII9/10. Nous avons ainsi étudié la stabilité de l'association PCLU et FNIII9/10 par évaluation de l'adsorption ainsi que le relargage du fragment rFNIII9/10. Ces investigations nous ont permis de déterminer le niveau de saturation de PCLU par le motif rFNIII9/10. Une étude bibliographique nous a permis de repérer des modèles mathématiques d'adsorption de protéine qui permettent de comprendre et de décrire l'interaction entre le support et l'adsorbat. Ainsi, la cinétique d'adsorption de rFNIII9/10 sur le PCLU a été appliquée à ces modèles et une corrélation a été obtenue avec le modèle de Langmuir permettant de montrer une adsorption en monocouche avec une interaction entre l'adsorbat et l'adsorbant. Le relargage de rFNIII9/10 a été suivi et nous avons observé un profil de libération progressif dans le temps. Nous avons ensuite étudié l'adhésion et la prolifération de cellules déposées sur ces surfaces. Les résultats montrent une meilleure adhésion et croissance cellulaire sur l'échafaudage traité avec rFNIII9/10. Il semble effectivement que la fonctionnalisation de la surface de PCLU par le fragment produit dans cette étude accélère la reconnaissance spécifique des matériaux par les récepteurs cellulaires et permette une meilleure adhésion et prolifération cellulaire. Ainsi, cette étude nous a permis de démontrer l'efficacité du revêtement avec le fragment rFNIII9/10 dans le développement d'un biomatériau bioactif agissant comme support pour l'adhésion ainsi que la prolifération cellulaire.

Enfin, les études menées ont montré l'efficacité de la stratégie adoptée de bio activation biomatériaux par des fragments recombinants bioactifs issus des domaines de la Fibronectine humaine. Nous avons donc entrepris à l'élaboration des nouveaux fragments recombinants innovants biomimétiques constitués des domaines de la fibronectine humaine en fonction de leur affinité pour des récepteurs membranaires cellulaires et des éléments cibles de la matrice extracellulaire. Nous avons conçu des constructions combinant des domaines bioactifs de la Fibronectine qui engage cette fois-ci non seulement les intégrines mais aussi des éléments de la matrice extracellulaire dans l'optique de pouvoir les appliquer dans le développement des substrats pour l'ingénierie cellulaire et la médecine régénératrice. Sept chimères protéiques ont été conçues. Notre approche repose sur la production de ces chimères protéiques avec la technologie d'ADN recombinant chez le système bactérien *E. coli*. Les séquences codantes de chacune des chimères ont été préparées puis clonées dans le vecteur pET SUMO. Ensuite les protéines ont été exprimées et purifiées. Les résultats ont montré que les niveaux d'expression étaient différents et que pour toutes les constructions contenant le domaine de fixation du collagène, une production sous forme insoluble est observée. Ce domaine est riche en pont disulfure ce qui permet probablement le repliement incorrect chez *E. coli*, ce qui conduit à la

Conclusion

formation de corps d'inclusion et l'observation de faibles niveaux de surexpression. La production a été optimisée par l'ajout d'une étape de solubilisation douce par le Sarkosyl qui a montré une amélioration de solubilité pour ces chimères. Des premières analyses de validation des fragments produites ont été réalisées par évaluation du potentiels bio adhésif ainsi que l'interaction avec la matrice collagène. Les premiers tests d'adhésion cellulaire montrent que les chimères contenant le domaine d'interaction avec les intégrines (CH2 et CH3) favorisent l'adhésion des cellules avec un étalement cellulaire identique à celui obtenue avec le fragment rFNIII9/10 ce qui valide l'activité du domaine 9 et 10 intégré dans les chimères 2 et 3. Ainsi, cette étude a permis la construction de nouvelles chimères faisant intervenir des domaines d'interaction avec des éléments de la matrice extracellulaire et des récepteurs cellulaires impliqués dans des divers processus cellulaires.

Un certain nombre d'investigations pourraient être conduites pour compléter ce travail de recherche. Dans cette perspective, il serait pertinent d'étudier d'avantage la réponse cellulaire à l'échafaudage conçu dans ce travail (PCLU-FNIII9/10). En effet, il a été décrit dans la littérature que l'interaction de la fibronectine humaine avec les intégrines alpha 5 beta 1 contrôle plusieurs comportement cellulaire notamment la migration et la différenciation cellulaire (Helfrich et al., 2008). Cela permettrait de mieux comprendre le comportement des cellules sur ces surfaces et d'élargir le champ d'application. D'autre part, il serait intéressant d'optimiser la production et la purification des chimères protéiques en améliorant les vecteurs d'expression ainsi que les partenaires de fusion. Des tags de solubilité tels que le MBP tag ou le tag NUsA pourront être testé pour les chimères insolubles. De plus, le développement des ces chimères offre également des intéressantes perspectives pour des investigations de leurs utilisations pour la fonctionnalisation des implants dans des applications d'ingénierie tissulaire, orthopédiques et dentaires. Enfin, des études *in vivo* pourraient être menées pour confirmer l'impact (intégration, orientation du comportement cellulaire voire même tissulaire) de ces motifs bio fonctionnels à moduler l'interaction entre l'implant et l'environnement biologique.

Références bibliographiques

- Abdulghani, S., & Mitchell, G. (2019). biomolecules Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review. *Biomolecules*, 9. <https://doi.org/10.3390/biom9110750>
- Ahadian, S., Rahal, R., Ramón-Azcón, J., Obregón, R., & Hasan, A. (2017a). Biomaterials in Tissue Engineering. In *Tissue Engineering for Artificial Organs* (pp. 35–83). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9783527689934.ch2>
- Ahadian, S., Rahal, R., Ramón-Azcón, J., Obregón, R., & Hasan, A. (2017b). Biomaterials in Tissue Engineering. In *Tissue Engineering for Artificial Organs* (pp. 35–83). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9783527689934.ch2>
- Ahmed, M., & Ffrench-Constant, C. (2016a). Extracellular Matrix Regulation of Stem Cell Behavior. *Current Stem Cell Reports*, 2, 197–206. <https://doi.org/10.1007/s40778-016-0056-2>
- Ahmed, M., & Ffrench-Constant, C. (2016b). Extracellular Matrix Regulation of Stem Cell Behavior. *Current Stem Cell Reports*, 2, 197–206. <https://doi.org/10.1007/s40778-016-0056-2>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). Garland Science.
- Altmann, B., Steinberg, T., Giselbrecht, S., Gottwald, E., Tomakidi, P., Bächle-Haas, M., & Kohal, R.-J. (2011). Promotion of osteoblast differentiation in 3D biomaterial microchip arrays comprising fibronectin-coated poly(methyl methacrylate) polycarbonate. *Biomaterials*, 32(34), 8947–8956. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.023>
- Altroff, H., van der Walle, C. F., Asselin, J., Fairless, R., Campbell, I. D., & Mardon, H. J. (2001). The eighth FIII domain of human fibronectin promotes integrin alpha5beta1 binding via stabilization of the ninth FIII domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38885–38892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105868200>

- Alves, C. M., Reis, R. L., & Hunt, J. A. (2010). The competitive adsorption of human proteins onto natural-based biomaterials. *Journal of the Royal Society, Interface*, 7(50), 1367–1377. <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0022>
- Amani, H., Arzaghi, H., Bayandori, M., Dezfuli, A. S., Pazoki-Toroudi, H., Shafiee, A., & Moradi, L. (2019). Controlling Cell Behavior through the Design of Biomaterial Surfaces: A Focus on Surface Modification Techniques. *Advanced Materials Interfaces*, 6(13), 1900572. <https://doi.org/10.1002/admi.201900572>
- Amaral, I. F., Neiva, I., Ferreira da Silva, F., Sousa, S. R., Piloto, A. M., Lopes, C. D. F., Barbosa, M. A., Kirkpatrick, C. J., & Pêgo, A. P. (2013). Endothelialization of chitosan porous conduits via immobilization of a recombinant fibronectin fragment (rhFNIII7-10). *Acta Biomaterialia*, 9(3), 5643–5652. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.10.029>
- Amaral, I. F., Unger, R. E., Fuchs, S., Mendonça, A. M., Sousa, S. R., Barbosa, M. A., Pêgo, A. P., & Kirkpatrick, C. J. (2009). Fibronectin-mediated endothelialisation of chitosan porous matrices. *Biomaterials*, 30(29), 5465–5475. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.056>
- Andersen, D. C., & Krummen, L. (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(2), 117–123. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00300-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00300-2)
- Ansari, M. (2019). Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Progress in Biomaterials*, 8(4), 223–237. <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00125-z>
- Armiento, A. R., Hatt, L. P., Rosenberg, G. S., Thompson, K., & Stoddart, M. J. (2020). Functional Biomaterials for Bone Regeneration: A Lesson in Complex Biology. *Advanced Functional Materials*, 30(44), 1909874. <https://doi.org/10.1002/adfm.201909874>

- Arnaud, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., & Pedersen, J. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 48(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.12.002>
- Bachman, H., Nicosia, J., Dysart, M., & Barker, T. H. (2015a). Utilizing Fibronectin Integrin-Binding Specificity to Control Cellular Responses. *Advances in Wound Care*, 4(8), 501–511. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0621>
- Bachman, H., Nicosia, J., Dysart, M., & Barker, T. H. (2015b). Utilizing Fibronectin Integrin-Binding Specificity to Control Cellular Responses. *Advances in Wound Care*, 4(8), 501–511. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0621>
- Badyalak, S. F., Freytes, D. O., & Gilbert, T. W. (2009). Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterialia*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.013>
- Barkalow, F. J., & Schwarzbauer, J. E. (1991). Localization of the major heparin-binding site in fibronectin. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(12), 7812–7818.
- Bartl, R., & Bartl, C. (2017). *Bone Disorders: Biology, Diagnosis, Prevention, Therapy*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-29182-6>
- Bártolo, P. J., & Bidanda, B. (Eds.). (2008). *Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-47683-4>
- Bellis, S. L. (2011). Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials*, 32(18), 4205–4210. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.029>
- Bello, A. B., Kim, D., Kim, D., Park, H., & Lee, S.-H. (2020). Engineering and Functionalization of Gelatin Biomaterials: From Cell Culture to Medical Applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0256>

- Bentmann, A., Kawelke, N., Moss, D., Zentgraf, H., Bala, Y., Berger, I., Gasser, J. A., & Nakchbandi, I. A. (2010). Circulating fibronectin affects bone matrix, whereas osteoblast fibronectin modulates osteoblast function. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 25(4), 706–715. <https://doi.org/10.1359/jbmr.091011>
- Berkmen, M. (2012). Production of disulfide-bonded proteins in Escherichia coli. *Protein Expression and Purification*, 82(1), 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.10.009>
- Bohner, M., Baroud, G., Bernstein, A., Döbelin, N., Galea, L., Hesse, B., Heuberger, R., Meille, S., Michel, P., von Rechenberg, B., Sague, J., & Seeherman, H. (2017). Characterization and distribution of mechanically competent mineralized tissue in micropores of β -tricalcium phosphate bone substitutes. *Materials Today*, 20(3), 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.02.002>
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000a). [16] Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods in Enzymology*, 326, 245–254.
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000b). [16] Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods in Enzymology*, 326, 245–254.
- Butler, M., & Meneses-Acosta, A. (2012). Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(4), 885–894. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4451-z>
- Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P., & Mattern, M. R. (2005). SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expression and Purification*, 43(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.03.016>
- Cao, L., Nicosia, J., Larouche, J., Zhang, Y., Bachman, H., Brown, A. C., Holmgren, L., & Barker, T. H. (2017, July 12). *Detection of an Integrin-Binding Mechanoswitch within*

- Fibronectin during Tissue Formation and Fibrosis* [Research-article].
<https://doi.org/10.1021/acsnano.7b02755>
- Casanova, M. R., Reis, R. L., Martins, A., & Neves, N. M. (2020a). Surface biofunctionalization to improve the efficacy of biomaterial substrates to be used in regenerative medicine. *Materials Horizons*, 7(9), 2258–2275.
<https://doi.org/10.1039/D0MH00542H>
- Casanova, M. R., Reis, R. L., Martins, A., & Neves, N. M. (2020b). Surface biofunctionalization to improve the efficacy of biomaterial substrates to be used in regenerative medicine. *Materials Horizons*, 7(9), 2258–2275.
<https://doi.org/10.1039/D0MH00542H>
- Castner, D. G., & Ratner, B. D. (2002). Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surface Science*, 500(1), 28–60. [https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(01\)01587-4](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(01)01587-4)
- Celik, E., & Calik, P. (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1108–1118. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.011>
- Chaisri, P., Chingsungnoen, A., & Siri, S. (2015). Repetitive Gly-Leu-Lys-Gly-Glu-Asn-Arg-Gly-Asp peptide derived from collagen and fibronectin for improving cell-scaffold interaction. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(5), 2489–2500.
<https://doi.org/10.1007/s12010-014-1388-y>
- Champion™ pET SUMO Expression System*. (n.d.). Retrieved 21 June 2021, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K30001>
- Changotade, S., Radu Bostan, G., Consalus, A., Poirier, F., Peltzer, J., Lataillade, J.-J., Lutomski, D., & Rohman, G. (2015). Preliminary In Vitro Assessment of Stem Cell Compatibility with Cross-Linked Poly(ε-caprolactone urethane) Scaffolds Designed through High Internal Phase Emulsions. *Stem Cells International*, 2015, 283796.
<https://doi.org/10.1155/2015/283796>

- Chen, F.-M., & Liu, X. (2016). Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 53, 86–168. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004>
- Chen, X., Zaro, J. L., & Shen, W.-C. (2013). Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(10), 1357–1369. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039>
- Chen, Y., Li, W., Zhang, C., Wu, Z., & Liu, J. (2020). Recent Developments of Biomaterials for Additive Manufacturing of Bone Scaffolds. *Advanced Healthcare Materials*, 9(23), 2000724. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000724>
- Cheng, A., Cain, S. A., Tian, P., Baldwin, A. K., Uppanan, P., Kielty, C. M., & Kimber, S. J. (2018a). Recombinant Extracellular Matrix Protein Fragments Support Human Embryonic Stem Cell Chondrogenesis. *Tissue Engineering. Part A*, 24(11–12), 968–978. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2017.0285>
- Cheng, A., Cain, S. A., Tian, P., Baldwin, A. K., Uppanan, P., Kielty, C. M., & Kimber, S. J. (2018b). Recombinant Extracellular Matrix Protein Fragments Support Human Embryonic Stem Cell Chondrogenesis. *Tissue Engineering. Part A*, 24(11–12), 968–978. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2017.0285>
- Chouhan, D., Lohe, T., Thatikonda, N., Naidu, V., Hedhammar, M., & Mandal, B. B. (2019). Silkworm Silk Scaffolds Functionalized with Recombinant Spider Silk Containing a Fibronectin Motif Promotes Healing of Full-Thickness Burn Wounds. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(9), 4634–4645. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00887>
- Contributor, N. T. (2020, January 27). Skeletal system 1: the anatomy and physiology of bones. *Nursing Times*. <https://www.nursingtimes.net/clinical-archive/orthopaedics/skeletal-system-1-the-anatomy-and-physiology-of-bones-27-01-2020/>

- Correia, C., Bhumiratana, S., Yan, L.-P., Oliveira, A. L., Gimble, J. M., Rockwood, D., Kaplan, D. L., Sousa, R. A., Reis, R. L., & Vunjak-Novakovic, G. (2012). Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells. *Acta Biomaterialia*, 8(7), 2483–2492. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.03.019>
- Cutler, S. M., & García, A. J. (2003a). Engineering cell adhesive surfaces that direct integrin alpha5beta1 binding using a recombinant fragment of fibronectin. *Biomaterials*, 24(10), 1759–1770. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00570-7](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00570-7)
- Cutler, S. M., & García, A. J. (2003b). Engineering cell adhesive surfaces that direct integrin alpha5beta1 binding using a recombinant fragment of fibronectin. *Biomaterials*, 24(10), 1759–1770. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00570-7](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00570-7)
- D, E., & Dk, C. (2006). Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(4), 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.06.003>
- Daltro, G. de C. (2018). Biomaterials for Bone Tissue Regeneration And Bone Disease. *Journal of Bionanoscience*, 12(5), 599–607. <https://doi.org/10.1166/jbns.2018.1572>
- Datar, R. V., Cartwright, T., & Rosen, C. G. (1993). Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, 11(3), 349–357. <https://doi.org/10.1038/nbt0393-349>
- de Groot, N. S., & Ventura, S. (2006a). Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. *FEBS Letters*, 580(27), 6471–6476. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.071>
- de Groot, N. S., & Ventura, S. (2006b). Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. *FEBS Letters*, 580(27), 6471–6476. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.071>

- de Mel, A., Jell, G., Stevens, M. M., & Seifalian, A. M. (2008). Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: a review. *Biomacromolecules*, 9(11), 2969–2979. <https://doi.org/10.1021/bm800681k>
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
- Dimitriou, R., Tsiridis, E., & Giannoudis, P. V. (2005). Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*, 36(12), 1392–1404. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.019>
- Dyck, M. K., Lacroix, D., Pothier, F., & Sirard, M.-A. (2003). Making recombinant proteins in animals--different systems, different applications. *Trends in Biotechnology*, 21(9), 394–399. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00190-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00190-2)
- Einhorn, T. A., & Gerstenfeld, L. C. (2015). Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nature Reviews Rheumatology*, 11(1), 45–54. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.164>
- Endo, Y., Ishiwata-Endo, H., & Yamada, K. M. (2018). Cell adhesion to anosmin via $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, and $\alpha 9\beta 1$ integrins. *Cell Adhesion & Migration*, 12(2), 93–100. <https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1221568>
- Erat, M. C., Schwarz-Linek, U., Pickford, A. R., Farndale, R. W., Campbell, I. D., & Vakonakis, I. (2010). Implications for collagen binding from the crystallographic structure of fibronectin 6FnII-2FnII7FnI. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(44), 33764–33770. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.139394>
- Fahnert, B., Lilie, H., & Neubauer, P. (2004). Inclusion bodies: formation and utilisation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 89, 93–142. <https://doi.org/10.1007/b93995>

- Feng, Q., Wei, K., Lin, S., Xu, Z., Sun, Y., Shi, P., Li, G., & Bian, L. (2016). Mechanically resilient, injectable, and bioadhesive supramolecular gelatin hydrogels crosslinked by weak host-guest interactions assist cell infiltration and in situ tissue regeneration. *Biomaterials*, *101*, 217–228. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.05.043>
- Feng, Y., & Mrksich, M. (2004). The synergy peptide PHSRN and the adhesion peptide RGD mediate cell adhesion through a common mechanism. *Biochemistry*, *43*(50), 15811–15821. <https://doi.org/10.1021/bi049174+>
- Fernandez de Grado, G., Keller, L., Idoux-Gillet, Y., Wagner, Q., Musset, A.-M., Benkirane-Jessel, N., Bornert, F., & Offner, D. (2018). Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *Journal of Tissue Engineering*, *9*. <https://doi.org/10.1177/2041731418776819>
- Fernando, S., McEnery, M., & Guelcher, S. A. (2016). 16 - Polyurethanes for bone tissue engineering. In S. L. Cooper & J. Guan (Eds.), *Advances in Polyurethane Biomaterials* (pp. 481–501). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100614-6.00016-0>
- Festas, A., Ramos, A., & Davim, J. (2020). Medical devices biomaterials – A review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part L: Journal of Materials: Design and Applications*, *234*(1), 218–228. <https://doi.org/10.1177/1464420719882458>
- Fischer, B., Sumner, I., & Goodenough, P. (1993). Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnology and Bioengineering*, *41*(1), 3–13. <https://doi.org/10.1002/bit.260410103>
- Förster, Y., Hintze, V., Rentsch, C., Rentsch, B., Bierbaum, S., Wiesmann, H.-P., Scharnweber, D., Worch, H., & Rammelt, S. (2013). Surface functionalization of biomaterials with tissue-inductive artificial extracellular matrices. *BioNanoMaterials*, *14*(3–4), 143–152. <https://doi.org/10.1515/bnm-2013-0018>

- Gaharwar, A. K., Singh, I., & Khademhosseini, A. (2020). Engineered biomaterials for in situ tissue regeneration. *Nature Reviews Materials*, 5(9), 686–705. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0209-x>
- Gao, M., Sotomayor, M., Villa, E., Lee, E. H., & Schulten, K. (2006). Molecular mechanisms of cellular mechanics. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 8(32), 3692–3706. <https://doi.org/10.1039/b606019f>
- García, A. J., & Reyes, C. D. (2005). Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation. *Journal of Dental Research*, 84(5), 407–413. <https://doi.org/10.1177/154405910508400502>
- García, A. J., Schwarzbauer, J. E., & Boettiger, D. (2002). Distinct activation states of alpha5beta1 integrin show differential binding to RGD and synergy domains of fibronectin. *Biochemistry*, 41(29), 9063–9069. <https://doi.org/10.1021/bi025752f>
- García-Fraga, B., da Silva, A. F., López-Seijas, J., & Sieiro, C. (2015). Optimized expression conditions for enhancing production of two recombinant chitinolytic enzymes from different prokaryote domains. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(12), 2477–2486. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1485-5>
- Gentile, P., Carmagnola, I., Nardo, T., & Chiono, V. (2015). Layer-by-layer assembly for biomedical applications in the last decade. *Nanotechnology*, 26(42), 422001. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/42/422001>
- Geuli, O., Metoki, N., Eliaz, N., & Mandler, D. (2016). Electrochemically Driven Hydroxyapatite Nanoparticles Coating of Medical Implants. *Advanced Functional Materials*, 26(44), 8003–8010. <https://doi.org/10.1002/adfm.201603575>
- Ghassemi, T., Shahroodi, A., Ebrahimzadeh, M. H., Mousavian, A., Movaffagh, J., & Moradi, A. (2018). Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. *Archives of Bone and Joint Surgery*, 6(2), 90–99.

- Gileadi, O. (2017). Recombinant Protein Expression in *E. coli*: A Historical Perspective. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1586, 3–10. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6887-9_1
- Griffith, L. G. (2002a). Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961, 83–95. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb03056.x>
- Griffith, L. G. (2002b). Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961, 83–95. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb03056.x>
- Gundinger, T., & Spadiut, O. (2017). A comparative approach to recombinantly produce the plant enzyme horseradish peroxidase in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 248, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.03.003>
- Gupta, S. K., & Shukla, P. (2016). Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 1089–1098. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084264>
- Gutiérrez-González, M., Farías, C., Tello, S., Pérez-Etcheverry, D., Romero, A., Zúñiga, R., Ribeiro, C. H., Lorenzo-Ferreiro, C., & Molina, M. C. (2019). Optimization of culture conditions for the expression of three different insoluble proteins in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 9(1), 16850. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53200-7>
- Hanagan, A., Meyer, J. D., Johnson, L., Manning, M. C., & Catalano, C. E. (1998). The phage lambda terminase enzyme: 2. Refolding of the gpNu1 subunit from the detergent-denatured and guanidinium hydrochloride-denatured state yields different oligomerization states and altered protein stabilities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23(1), 37–48. [https://doi.org/10.1016/s0141-8130\(98\)00010-5](https://doi.org/10.1016/s0141-8130(98)00010-5)

- Hannachi Imen, E., Nakamura, M., Mie, M., & Kobatake, E. (2009). Construction of multifunctional proteins for tissue engineering: epidermal growth factor with collagen binding and cell adhesive activities. *Journal of Biotechnology*, *139*(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.09.011>
- Hao, L., Li, T., Wang, L., Shi, X., Fan, Y., Du, C., & Wang, Y. (2021). Mechanistic insights into the adsorption and bioactivity of fibronectin on surfaces with varying chemistries by a combination of experimental strategies and molecular simulations. *Bioactive Materials*, *6*(10), 3125–3135. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.02.021>
- Harper, S., & Speicher, D. W. (2011). Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *681*, 259–280. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_14
- Haugen, H. J., Lyngstadaas, S. P., Rossi, F., & Perale, G. (2019). Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *Journal of Clinical Periodontology*, *46 Suppl 21*, 92–102. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13058>
- Helfrich, M. H., Stenbeck, G., Nesbitt, S. A., & Horton, M. A. (2008). Chapter 20 - Integrins and Other Cell Surface Attachment Molecules of Bone Cells. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & T. J. Martin (Eds.), *Principles of Bone Biology (Third Edition)* (pp. 385–424). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373884-4.00039-2>
- Hench, L. L., & Polak, J. M. (2002). Third-generation biomedical materials. *Science (New York, N.Y.)*, *295*(5557), 1014–1017. <https://doi.org/10.1126/science.1067404>
- Herranz-Diez, C., Mas-Moruno, C., Neubauer, S., Kessler, H., Gil, F. J., Pegueroles, M., Manero, J. M., & Guillem-Marti, J. (2016). Tuning Mesenchymal Stem Cell Response onto Titanium-Niobium-Hafnium Alloy by Recombinant Fibronectin Fragments. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *8*(4), 2517–2525. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b09576>

- Hocking, D. C., Brennan, J. R., & Raeman, C. H. (2016). A Small Chimeric Fibronectin Fragment Accelerates Dermal Wound Repair in Diabetic Mice. *Advances in Wound Care*, 5(11), 495–506. <https://doi.org/10.1089/wound.2015.0666>
- Hocking, D. C., Sottile, J., & McKeown-Longo, P. J. (1994). Fibronectin's III-1 module contains a conformation-dependent binding site for the amino-terminal region of fibronectin. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(29), 19183–19187.
- Houdebine, L.-M. (2009). Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32(2), 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.11.005>
- Hp, S., Hu, S.-P., & Kk, M. (2003). A favorable solubility partner for the recombinant expression of streptavidin. *Protein Expression and Purification*, 32(2), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.07.001>
- Hp, S., & Kk, M. (2005a). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.08.004>
- Hp, S., & Kk, M. (2005b). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.08.004>
- Huang, C.-J., & Chang, Y.-C. (2019). Construction of Cell–Extracellular Matrix Microenvironments by Conjugating ECM Proteins on Supported Lipid Bilayers. *Frontiers in Materials*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00039>
- Huyen, D. T., Giang, L. Q., & Hai, T. N. (2014). Expression of flagellin FLjB derived from *Salmonella enterica* serovar typhimurium in *Escherichia coli* BL21. *Academia Journal of Biology*, 36(4), 506–514. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v36n4.6180>

- Im, G.-I. (2020). Biomaterials in orthopaedics: the past and future with immune modulation. *Biomaterials Research*, 24(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40824-020-0185-7>
- Ingham, K. C., Brew, S. A., & Isaacs, B. S. (1988). Interaction of fibronectin and its gelatin-binding domains with fluorescent-labeled chains of type I collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 263(10), 4624–4628. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68828-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68828-3)
- J, H., Ma, W., Dr, E., R, S., V, G., Ic, D., Pf, C., Ma, S., & Dw, H. (2013). Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions - A 21st Century Perspective. *Bone Research*, 1(3), 216–248. <https://doi.org/10.4248/br201303002>
- Jacquet, A., Daminet, V., Haumont, M., Garcia, L., Chaudoir, S., Bollen, A., & Biemans, R. (1999). Expression of a recombinant *Toxoplasma gondii* ROP2 fragment as a fusion protein in bacteria circumvents insolubility and proteolytic degradation. *Protein Expression and Purification*, 17(3), 392–400. <https://doi.org/10.1006/prep.1999.1150>
- Jekabsons, M. B., Ehtay, K. S., & Brand, M. D. (2002). Nucleotide binding to human uncoupling protein-2 refolded from bacterial inclusion bodies. *The Biochemical Journal*, 366(Pt 2), 565–571. <https://doi.org/10.1042/BJ20020469>
- Johansson, S., Svineng, G., Wennerberg, K., Armulik, A., & Lohikangas, L. (1997). Fibronectin-integrin interactions. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 2, d126-146. <https://doi.org/10.2741/a178>
- Jozala, A. F., Geraldés, D. C., Tundisi, L. L., Feitosa, V. de A., Breyer, C. A., Cardoso, S. L., Mazzola, P. G., Oliveira-Nascimento, L. de, Rangel-Yagui, C. de O., Magalhães, P. de O., Oliveira, M. A. de, & Pessoa, A. (2016). Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.007>

- Kang, W., & Jang, J. (2009a). Protein engineering, expression, and activity of a novel fusion protein possessing keratinocyte growth factor 2 and fibronectin. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, *41*(1), 16–20. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmn002>
- Kang, W., & Jang, J. (2009b). Protein engineering, expression, and activity of a novel fusion protein possessing keratinocyte growth factor 2 and fibronectin. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, *41*(1), 16–20. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmn002>
- Kapust, R. B., & Waugh, D. S. (1999). Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, *8*(8), 1668–1674.
- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018a). Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, *106*, 803–822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018b). Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, *106*, 803–822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Keefe, A. D., Wilson, D. S., Seelig, B., & Szostak, J. W. (2001a). One-Step Purification of Recombinant Proteins Using a Nanomolar-Affinity Streptavidin-Binding Peptide, the SBP-Tag. *Protein Expression and Purification*, *23*(3), 440–446. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1515>
- Keefe, A. D., Wilson, D. S., Seelig, B., & Szostak, J. W. (2001b). One-Step Purification of Recombinant Proteins Using a Nanomolar-Affinity Streptavidin-Binding Peptide, the SBP-Tag. *Protein Expression and Purification*, *23*(3), 440–446. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1515>

- Keselowsky, B. G., Collard, D. M., & García, A. J. (2003). Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 66(2), 247–259. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10537>
- Keselowsky, B. G., & García, A. J. (2005). Quantitative methods for analysis of integrin binding and focal adhesion formation on biomaterial surfaces. *Biomaterials*, 26(4), 413–418. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.050>
- Khan, R. H., Rao, K. B., Eshwari, A. N., Totey, S. M., & Panda, A. K. (1998). Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native-like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 14(5), 722–728. <https://doi.org/10.1021/bp980071q>
- Khang, D., Kim, S. Y., Liu-Snyder, P., Palmore, G. T. R., Durbin, S. M., & Webster, T. J. (2007a). Enhanced fibronectin adsorption on carbon nanotube/poly(carbonate) urethane: Independent role of surface nano-roughness and associated surface energy. *Biomaterials*, 28(32), 4756–4768. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.018>
- Khang, D., Kim, S. Y., Liu-Snyder, P., Palmore, G. T. R., Durbin, S. M., & Webster, T. J. (2007b). Enhanced fibronectin adsorption on carbon nanotube/poly(carbonate) urethane: Independent role of surface nano-roughness and associated surface energy. *Biomaterials*, 28(32), 4756–4768. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.018>
- Khow, O., & Suntrarachun, S. (2012). Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), 159–162. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60213-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60213-X)
- Kim, M. S., Park, H. J., Kim, S. J., Park, J. E., Yun, J. I., Lim, H. W., & Lee, S. T. (2020). Recombinant FNIII9-10-derived extracellular signaling effects on the physiology of

- dermal fibroblasts during in vitro culture. *Tissue and Cell*, 63, 101323.
<https://doi.org/10.1016/j.tice.2019.101323>
- Kim, S. G., Lee, D. S., Lee, S., & Jang, J.-H. (2015). Osteocalcin/fibronectin-functionalized collagen matrices for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 103(6), 2133–2140. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35351>
- Kim, S., & Lee, S. B. (2008). Soluble expression of archaeal proteins in Escherichia coli by using fusion-partners. *Protein Expression and Purification*, 62(1), 116–119.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.06.015>
- Kimple, M. E., Brill, A. L., & Pasker, R. L. (2013). Overview of Affinity Tags for Protein Purification. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.]*, 73, Unit-9.9. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0909s73>
- Kisiel, M., Martino, M. M., Ventura, M., Hubbell, J. A., Hilborn, J., & Ossipov, D. A. (2013). Improving the osteogenic potential of BMP-2 with hyaluronic acid hydrogel modified with integrin-specific fibronectin fragment. *Biomaterials*, 34(3), 704–712.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.015>
- Kk, U., M, H., & Sa, R. (2014). Means to optimize protein expression in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 61–67.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.011>
- Kornblihtt, A. R., Umezawa, K., Vibe-Pedersen, K., & Baralle, F. E. (1985). Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *The EMBO Journal*, 4(7), 1755–1759.
- Kost, T. A., & Kemp, C. W. (2016). Fundamentals of Baculovirus Expression and Applications. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 896, 187–197.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-27216-0_12

- Krammer, A., Craig, D., Thomas, W. E., Schulten, K., & Vogel, V. (2002). A structural model for force regulated integrin binding to fibronectin's RGD-synergy site. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 21(2), 139–147. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(01\)00197-4](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(01)00197-4)
- Kurtz, S., Mowat, F., Ong, K., Chan, N., Lau, E., & Halpern, M. (2005). Prevalence of primary and revision total hip and knee arthroplasty in the United States from 1990 through 2002. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 87(7), 1487–1497. <https://doi.org/10.2106/JBJS.D.02441>
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110), 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- LaVallie, E. R., DiBlasio-Smith, E. A., Collins-Racie, L. A., Lu, Z., & McCoy, J. M. (2003). Thioredoxin and related proteins as multifunctional fusion tags for soluble expression in *E. coli*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 205, 119–140. <https://doi.org/10.1385/1-59259-301-1:119>
- Lemons J, J., Ratner BD, & Hoffman AS, Schoen FJ (2013). (2013). *Biomaterials Science - 3rd Edition*. <https://www.elsevier.com/books/biomaterials-science/ratner/978-0-08-087780-8>
- Liamas, E., Kubiak-Ossowska, K., Black, R. A., Thomas, O. R. T., Zhang, Z. J., & Mulheran, P. A. (2018). Adsorption of Fibronectin Fragment on Surfaces Using Fully Atomistic Molecular Dynamics Simulations. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijms19113321>
- Lin, Z., Wu, J., Qiao, W., Zhao, Y., Wong, K. H. M., Chu, P. K., Bian, L., Wu, S., Zheng, Y., Cheung, K. M. C., Leung, F., & Yeung, K. W. K. (2018). Precisely controlled delivery of magnesium ions thru sponge-like monodisperse PLGA/nano-MgO-alginate core-

- shell microsphere device to enable in-situ bone regeneration. *Biomaterials*, *174*, 1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.05.011>
- Llopis-Hernández, V., Cantini, M., González-García, C., Cheng, Z. A., Yang, J., Tsimbouri, P. M., García, A. J., Dalby, M. J., & Salmerón-Sánchez, M. (2016). Material-driven fibronectin assembly for high-efficiency presentation of growth factors. *Science Advances*, *2*(8), e1600188. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600188>
- Loessner, D., Meinert, C., Kaemmerer, E., Martine, L. C., Yue, K., Levett, P. A., Klein, T. J., Melchels, F. P. W., Khademhosseini, A., & Hutmacher, D. W. (2016). Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms. *Nature Protocols*, *11*(4), 727–746.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2016.037>
- Loi, F., Córdova, L. A., Pajarinen, J., Lin, T., Yao, Z., & Goodman, S. B. (2016). Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*, *86*, 119–130.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.02.020>
- Luo, Z., Zhang, S., Pan, J., Shi, R., Liu, H., Lyu, Y., Han, X., Li, Y., Yang, Y., Xu, Z., Sui, Y., Luo, E., Zhang, Y., & Wei, S. (2018). Time-responsive osteogenic niche of stem cells: A sequentially triggered, dual-peptide loaded, alginate hybrid system for promoting cell activity and osteo-differentiation. *Biomaterials*, *163*, 25–42.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.02.025>
- M, H., T, S., Yg, Z., & Zg, A. (2006). Research advances on transgenic plant vaccines. *Yi Chuan Xue Bao = Acta Genetica Sinica*, *33*(4), 285–293. [https://doi.org/10.1016/s0379-4172\(06\)60053-x](https://doi.org/10.1016/s0379-4172(06)60053-x)
- Malakar, P., & Venkatesh, K. V. (2012). Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of *Escherichia coli* on glycerol due to the expression of Lac proteins.

Applied Microbiology and Biotechnology, 93(6), 2543–2549.

<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3642-3>

Marblestone, J. G., Edavettal, S. C., Lim, Y., Lim, P., Zuo, X., & Butt, T. R. (2006).

Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 15(1), 182–189. <https://doi.org/10.1110/ps.051812706>

Mardon, H. J., & Grant, K. E. (1994). The role of the ninth and tenth type III domains of human

fibronectin in cell adhesion. *FEBS Letters*, 340(3), 197–201.

[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80137-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80137-1)

Martin, V., & Bettencourt, A. (2018). Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems

with improved osteoinductive properties. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 82, 363–371.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.038>

Martino, M. M., Mochizuki, M., Rothenfluh, D. A., Rempel, S. A., Hubbell, J. A., & Barker,

T. H. (2009a). Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability. *Biomaterials*, 30(6), 1089–1097. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.047>

Martino, M. M., Mochizuki, M., Rothenfluh, D. A., Rempel, S. A., Hubbell, J. A., & Barker,

T. H. (2009b). Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability. *Biomaterials*, 30(6), 1089–1097. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.047>

Martino, M. M., Tortelli, F., Mochizuki, M., Traub, S., Ben-David, D., Kuhn, G. A., Müller,

R., Livne, E., Eming, S. A., & Hubbell, J. A. (2011). Engineering the growth factor microenvironment with fibronectin domains to promote wound and bone tissue healing.

Science Translational Medicine, 3(100), 100ra89.

<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002614>

Martín-Villanueva, S., Gutiérrez, G., Kressler, D., & de la Cruz, J. (2021). Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins and Domains in Ribosome Production and Function: Chance or Necessity? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4359. <https://doi.org/10.3390/ijms22094359>

Maruyama, M., Nabeshima, A., Pan, C.-C., Behn, A. W., Thio, T., Lin, T., Pajarinen, J., Kawai, T., Takagi, M., Goodman, S. B., & Yang, Y. P. (2018). The Effects of a Functionally-Graded Scaffold and Bone Marrow-derived Mononuclear Cells on Steroid-induced Femoral Head Osteonecrosis. *Biomaterials*, 187, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.09.030>

Mas Moruno, C. (2018). *Surface functionalization of biomaterials for bone tissue regeneration and repair*. 73–100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100803-4.00003-6>

Matassi, F., Nistri, L., Chicon Paez, D., & Innocenti, M. (2011). New biomaterials for bone regeneration. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 8(1), 21–24.

Mezzenga, R., & Mitsi, M. (2018). The Molecular Dance of Fibronectin: Conformational Flexibility Leads to Functional Versatility. *Biomacromolecules*, 20. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01258>

Mi, N., Me, W., Me, G., Ri, R., Pi, G., & Na, P. (2016). Molecularly Imprinted Intelligent Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 23(1), 27–43. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2016.0202>

Miladi, B., Bouallagui, H., Dridi, C., El Marjou, A., Boeuf, G., Di Martino, P., Dufour, F., & Elm'Selmi, A. (2011). A new tagged-TEV protease: Construction, optimisation of production, purification and test activity. *Protein Expression and Purification*, 75(1), 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.08.012>

- Miladi, B., Dridi, C., El Marjou, A., Boeuf, G., Bouallagui, H., Dufour, F., Di Martino, P., & Elm'selmi, A. (2013). An Improved Strategy for Easy Process Monitoring and Advanced Purification of Recombinant Proteins. *Molecular Biotechnology*, *55*(3), 227–235. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9673-5>
- Mohamadyar-Toupanlou, F., Vasheghani-Farahani, E., Hanaee-Ahvaz, H., Soleimani, M., Dodel, M., Havasi, P., Ardeshiryajimi, A., & Taherzadeh, E. S. (2017). Osteogenic Differentiation of MSCs on Fibronectin-Coated and nHA-Modified Scaffolds. *ASAIO Journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)*, *63*(5), 684–691. <https://doi.org/10.1097/MAT.0000000000000551>
- Molino, P. J., Higgins, M. J., Innis, P. C., Kapsa, R. M. I., & Wallace, G. G. (2012). Fibronectin and Bovine Serum Albumin Adsorption and Conformational Dynamics on Inherently Conducting Polymers: A QCM-D Study. *Langmuir*, *28*(22), 8433–8445. <https://doi.org/10.1021/la300692y>
- Mondal, S., Shet, D., Prasanna, C., & Atreya, H. S. (2013). High yield expression of proteins in *E. coli* for NMR studies. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, *4*(6), 751–767. <https://doi.org/10.4236/abb.2013.46099>
- Morent, R., Geyter, N. D., Gengembre, L., Leys, C., Payen, E., Vlierberghe, S. V., & Schacht, E. (2008). Surface treatment of a polypropylene film with a nitrogen DBD at medium pressure. *The European Physical Journal Applied Physics*, *43*(3), 289–294. <https://doi.org/10.1051/epjap:2008076>
- Mostafavi-Pour, Z., Askari, J. A., Whittard, J. D., & Humphries, M. J. (2001). Identification of a novel heparin-binding site in the alternatively spliced III_{CS} region of fibronectin: roles of integrins and proteoglycans in cell adhesion to fibronectin splice variants. *Matrix Biology*, *20*(1), 63–73. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(00\)00131-1](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(00)00131-1)

- Motamedian, S. R., Hosseinpour, S., Ahsaie, M. G., & Khojasteh, A. (2015). Smart scaffolds in bone tissue engineering: A systematic review of literature. *World Journal of Stem Cells*, 7(3), 657–668. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i3.657>
- Moulisová, V., Gonzalez-García, C., Cantini, M., Rodrigo-Navarro, A., Weaver, J., Costell, M., Sabater I Serra, R., Dalby, M. J., García, A. J., & Salmerón-Sánchez, M. (2017). Engineered microenvironments for synergistic VEGF - Integrin signalling during vascularization. *Biomaterials*, 126, 61–74. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.024>
- Mour, M., Das, D., Winkler, T., Hoenig, E., Mielke, G., Morlock, M. M., & Schilling, A. F. (2010a). Advances in Porous Biomaterials for Dental and Orthopaedic Applications. *Materials*, 3(5), 2947–2974. <https://doi.org/10.3390/ma3052947>
- Mour, M., Das, D., Winkler, T., Hoenig, E., Mielke, G., Morlock, M. M., & Schilling, A. F. (2010b). Advances in Porous Biomaterials for Dental and Orthopaedic Applications. *Materials*, 3(5), 2947–2974. <https://doi.org/10.3390/ma3052947>
- Nadkarni, A., Kelley, L.-L., & Momany, C. (2007). Optimization of a mouse recombinant antibody fragment for efficient production from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 52, 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.10.011>
- Navarro, M., Michiardi, A., Castaño, O., & Planell, J. A. (2008). Biomaterials in orthopaedics. *Journal of the Royal Society, Interface*, 5(27), 1137–1158. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0151>
- Osz-Papai, J., Radu, L., Abdulrahman, W., Kolb-Cheynel, I., Troffer-Charlier, N., Birck, C., & Poterszman, A. (2015). Insect cells-baculovirus system for the production of difficult to express proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1258, 181–205. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_10

- Panavas, T., Sanders, C., & Butt, T. R. (2009). SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 497, 303–317. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-566-4_20
- Pankov, R., & Yamada, K. M. (2002a). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 20), 3861–3863. <https://doi.org/10.1242/jcs.00059>
- Pankov, R., & Yamada, K. M. (2002b). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 20), 3861–3863. <https://doi.org/10.1242/jcs.00059>
- Parisi, L., Toffoli, A., Ghezzi, B., Mozzoni, B., Lumetti, S., & Macaluso, G. M. (2020a). A glance on the role of fibronectin in controlling cell response at biomaterial interface. *Japanese Dental Science Review*, 56(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2019.11.002>
- Parisi, L., Toffoli, A., Ghezzi, B., Mozzoni, B., Lumetti, S., & Macaluso, G. M. (2020b). A glance on the role of fibronectin in controlling cell response at biomaterial interface. *Japanese Dental Science Review*, 56(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2019.11.002>
- Park, J. Y., Park, S. H., Kim, M. G., Park, S.-H., Yoo, T. H., & Kim, M. S. (2018). Biomimetic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. In I. Noh (Ed.), *Biomimetic Medical Materials: From Nanotechnology to 3D Bioprinting* (pp. 109–121). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0445-3_7
- Park, S. A., Lee, S. H., & Kim, W. D. (2011). Fabrication of porous polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HA) blend scaffolds using a 3D plotting system for bone tissue engineering. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(4), 505–513. <https://doi.org/10.1007/s00449-010-0499-2>
- Patel, N. R., & Gohil, P. P. (2012). *A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance*.

- Paten, J. A., Martin, C. L., Wanis, J. T., Siadat, S. M., Figueroa-Navedo, A. M., Ruberti, J. W., & Deravi, L. F. (2019). Molecular Interactions between Collagen and Fibronectin: A Reciprocal Relationship that Regulates De Novo Fibrillogenesis. *Chem*, 5(8), 2126–2145. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2019.05.011>
- Patra, A. K., Gahlay, G. K., Reddy, B. V., Gupta, S. K., & Panda, A. K. (2000). Refolding, structural transition and spermatozoa-binding of recombinant bonnet monkey (*Macaca radiata*) zona pellucida glycoprotein-C expressed in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 267(24), 7075–7081. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01808.x>
- Pérez, R. A., Won, J.-E., Knowles, J. C., & Kim, H.-W. (2013). Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(4), 471–496. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.03.009>
- Petrie, T. A., Capadona, J. R., Reyes, C. D., & García, A. J. (2006). Integrin specificity and enhanced cellular activities associated with surfaces presenting a recombinant fibronectin fragment compared to RGD supports. *Biomaterials*, 27(31), 5459–5470. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.027>
- Petrie, T. A., Raynor, J. E., Reyes, C. D., Burns, K. L., Collard, D. M., & García, A. J. (2008). The effect of integrin-specific bioactive coatings on tissue healing and implant osseointegration. *Biomaterials*, 29(19), 2849–2857. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.03.036>
- Petrie, T. A., Reyes, C. D., Burns, K. L., & García, A. J. (2009). Simple application of fibronectin-mimetic coating enhances osseointegration of titanium implants. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8b), 2602–2612. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00476.x>

- Pierre M., & Galletti, M. (1983). Clinical Applications of Biomaterials. *JAMA*, *249*(8), 1050–1054. <https://doi.org/10.1001/jama.1983.03330320048031>
- Porro, D., Sauer, M., Branduardi, P., & Mattanovich, D. (2005). Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology*, *31*(3), 245–259. <https://doi.org/10.1385/MB:31:3:245>
- Potts, J. R., & Campbell, I. D. (1996). Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, *15*(5), 313–320; discussion 321. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(96\)90133-x](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(96)90133-x)
- Puri, N. K., Cardamone, M., Crivelli, E., & Traeger, J. C. (1993). Characterization of a truncated form of recombinant porcine growth hormone generated in vitro during solubilization of inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, *4*(2), 164–175. <https://doi.org/10.1006/prev.1993.1023>
- Qasim, M., Chae, D. S., & Lee, N. Y. (2020). Bioengineering strategies for bone and cartilage tissue regeneration using growth factors and stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, *108*(3), 394–411. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36817>
- Rahmany, M. B., & Dyke, M. V. V. (2013). Biomimetic approaches to modulate cellular adhesion in biomaterials: A review. *Acta Biomaterialia*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.019>
- Raitman, I., Huang, M. L., Williams, S. A., Friedman, B., Godula, K., & Schwarzbauer, J. E. (2018). Heparin-fibronectin interactions in the development of extracellular matrix insolubility. *Matrix Biology*, *67*, 107–122. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.11.012>
- Ramírez, O. T., Zamora, R., Espinosa, G., Merino, E., Bolívar, F., & Quintero, R. (1994). Kinetic study of penicillin acylase production by recombinant *E. coli* in batch cultures. *Process Biochemistry*, *29*(3), 197–206. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)85004-6](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)85004-6)

- Raphel, J., Holodniy, M., Goodman, S. B., & Heilshorn, S. C. (2016). Multifunctional Coatings to Simultaneously Promote Osseointegration and Prevent Infection of Orthopaedic Implants. *Biomaterials*, 84, 301–314. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.016>
- Rezaie, H. R., Bakhtiari, L., & Öchsner, A. (2015a). Application of Biomaterials. In H. Reza Rezaie, L. Bakhtiari, & A. Öchsner (Eds.), *Biomaterials and Their Applications* (pp. 19–24). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17846-2_2
- Rezaie, H. R., Bakhtiari, L., & Öchsner, A. (2015b). New Trends in Biomaterials. In H. Reza Rezaie, L. Bakhtiari, & A. Öchsner (Eds.), *Biomaterials and Their Applications* (pp. 33–46). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17846-2_4
- Rezaie, H. R., Bakhtiari, L., & Öchsner, A. (2015c). Tissue Response in Biomaterials. In H. Reza Rezaie, L. Bakhtiari, & A. Öchsner (Eds.), *Biomaterials and Their Applications* (pp. 47–49). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17846-2_5
- Rohman, G., Changotade, S., Frasca, S., Ramtani, S., Consalus, A., Languet, C., Collombet, J.-M., & Lutomski, D. (2019). In vitro and in vivo proves of concept for the use of a chemically cross-linked poly(ester-urethane-urea) scaffold as an easy handling elastomeric biomaterial for bone regeneration. *Regenerative Biomaterials*, 6(6), 311–323. <https://doi.org/10.1093/rb/rbz020>
- Roovers, K., & Assoian, R. K. (2000). Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 22(9), 818–826. [https://doi.org/10.1002/1521-1878\(200009\)22:9<818::AID-BIES7>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1521-1878(200009)22:9<818::AID-BIES7>3.0.CO;2-6)

- Roovers, K., Davey, G., Zhu, X., Bottazzi, M. E., & Assoian, R. K. (1999). $\alpha 5\beta 1$ Integrin Controls Cyclin D1 Expression by Sustaining Mitogen-activated Protein Kinase Activity in Growth Factor-treated Cells. *Molecular Biology of the Cell*, *10*(10), 3197–3204.
- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, *28*(8), 1412–1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Roy, D. C., Wilke-Mounts, S. J., & Hocking, D. C. (2011). Chimeric fibronectin matrix mimetic as a functional growth- and migration-promoting adhesive substrate. *Biomaterials*, *32*(8), 2077–2087. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.11.050>
- Saini, M., Singh, Y., Arora, P., Arora, V., & Jain, K. (2015). Implant biomaterials: A comprehensive review. *World Journal of Clinical Cases: WJCC*, *3*(1), 52–57. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i1.52>
- Sarduy, E. S., Muñoz, A. C., Trejo, S. A., & Chavéz Planes, M. de los A. (2012). High-level expression of Falcipain-2 in *Escherichia coli* by codon optimization and auto-induction. *Protein Expression and Purification*, *83*(1), 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.03.008>
- Schein, C. H., & Noteborn, M. H. M. (1988). Formation of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia Coli* is Favored by Lower Growth Temperature. *Bio/Technology*, *6*(3), 291–294. <https://doi.org/10.1038/nbt0388-291>
- Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P., & Little, D. G. (2008). Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *19*(5), 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.07.004>

- SEDEL, L., & JANOT, C. (2000). *BIOMATERIAUX. Rapport rédigé sous la co-responsabilité de - PDF Téléchargement Gratuit*. <https://docplayer.fr/8135305-Biomateriaux-rapport-redige-sous-la-co-responsabilite-de.html>
- Siddiqui, N., Kishori, B., Rao, S., Anjum, M., Hemanth, V., Das, S., & Jabbari, E. (2021). Electropsun Polycaprolactone Fibres in Bone Tissue Engineering: A Review. *Molecular Biotechnology*, *63*(5), 363–388. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00311-0>
- Sikavitsas, V. I., Temenoff, J. S., & Mikos, A. G. (2001). Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*, *22*(19), 2581–2593. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00002-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00002-3)
- Skorstengaard, K., Jensen, M. S., Sahl, P., Petersen, T. E., & Magnusson, S. (1986). Complete primary structure of bovine plasma fibronectin. *European Journal of Biochemistry*, *161*(2), 441–453. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb10464.x>
- Stevens, M. M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*, *11*(5), 18–25. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(08\)70086-5](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(08)70086-5)
- Stevens, M. M., & George, J. H. (2005). Exploring and engineering the cell surface interface. *Science (New York, N.Y.)*, *310*(5751), 1135–1138. <https://doi.org/10.1126/science.1106587>
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, *41*(1), 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
- Su, E., Lu, C., Ma, X., Cai, W., & Zhu, S. (2016). High-level production of *Arthrobacter aurescens* CYC705 nitrilase in *Escherichia coli* for biosynthesis of iminodiacetic acid. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *63*(4), 564–571. <https://doi.org/10.1002/bab.1408>

- Su, Y., Luo, C., Zhang, Z., Hermawan, H., Zhu, D., Huang, J., Liang, Y., Li, G., & Ren, L. (2018). Bioinspired surface functionalization of metallic biomaterials. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 77, 90–105. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.08.035>
- Taha, I. N., & Naba, A. (2019). Exploring the extracellular matrix in health and disease using proteomics. *Essays in Biochemistry*, 63(3), 417–432. <https://doi.org/10.1042/EBC20190001>
- Tao, H., Liu, W., Simmons, B. N., Harris, H. K., Cox, T. C., & Massiah, M. A. (2010). Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. *BioTechniques*, 48(1), 61–64. <https://doi.org/10.2144/000113304>
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 211–222. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8>
- To, W. S., & Midwood, K. S. (2011). Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 4, 21. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-4-21>
- Vallejo, L. F., & Rinas, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, 3(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-11>
- Vedadi, M., Arrowsmith, C. H., Allali-Hassani, A., Senisterra, G., & Wasney, G. A. (2010). Biophysical characterization of recombinant proteins: A key to higher structural genomics success. *Journal of Structural Biology*, 172(1), 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.05.005>

- Veevers-Lowe, J., Ball, S. G., Shuttleworth, A., & Kielty, C. M. (2011). Mesenchymal stem cell migration is regulated by fibronectin through $\alpha 5\beta 1$ -integrin-mediated activation of PDGFR- β and potentiation of growth factor signals. *Journal of Cell Science*, *124*(Pt 8), 1288–1300. <https://doi.org/10.1242/jcs.076935>
- von der Mark, K., Park, J., Bauer, S., & Schmuki, P. (2010). Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell and Tissue Research*, *339*(1), 131–153. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0896-5>
- Voulgaridou, G.-P., Mantso, T., Chlichlia, K., Panayiotidis, M. I., & Pappa, A. (2013a). Efficient E. coli expression strategies for production of soluble human crystallin ALDH3A1. *PloS One*, *8*(2), e56582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056582>
- Voulgaridou, G.-P., Mantso, T., Chlichlia, K., Panayiotidis, M. I., & Pappa, A. (2013b). Efficient E. coli Expression Strategies for Production of Soluble Human Crystallin ALDH3A1. *PLOS ONE*, *8*(2), e56582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056582>
- Wang, L., Quan, C., Liu, B., Xu, Y., Zhao, P., Xiong, W., & Fan, S. (2013). Green fluorescent protein (GFP)-based overexpression screening and characterization of AgrC, a Receptor protein of quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(9), 18470–18487. <https://doi.org/10.3390/ijms140918470>
- Wang, W., & Yeung, K. W. K. (2017). Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*, *2*(4), 224–247. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>
- Wang, X.-Q., Chen, L., Pan, R., Zhao, J., Liu, Y., & He, R.-Q. (2008). An earthworm protease cleaving serum fibronectin and decreasing HBeAg in HepG2.2.15 cells. *BMC Biochemistry*, *9*, 30. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-9-30>
- Wilems, T., Vardhan, S., Wu, S., & Sakiyama-Elbert, S. (2019). The influence of microenvironment and extracellular matrix molecules in driving neural stem cell fate

- within biomaterials. *Brain Research Bulletin*, 148, 25–33.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.03.004>
- Williams, D. F. (1987). Tissue-biomaterial interactions. *Journal of Materials Science*, 22(10), 3421–3445. <https://doi.org/10.1007/BF01161439>
- Wozniak, M. A., Modzelewska, K., Kwong, L., & Keely, P. J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1692(2–3), 103–119.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.04.007>
- Wu, G., Li, P., Feng, H., Zhang, X., & Chu, P. K. (2015). Engineering and functionalization of biomaterials via surface modification. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(10), 2024–2042. <https://doi.org/10.1039/C4TB01934B>
- Xu, J., & Mosher, D. (2011). Fibronectin and Other Adhesive Glycoproteins. In R. P. Mecham (Ed.), *The Extracellular Matrix: an Overview* (pp. 41–75). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-16555-9_2
- Yewdell, J. W., & Bennink, J. R. (2001). Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. *Current Opinion in Immunology*, 13(1), 13–18. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(00\)00175-8](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(00)00175-8)
- Young, C. L., Britton, Z. T., & Robinson, A. S. (2012a). Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal*, 7(5), 620–634. <https://doi.org/10.1002/biot.201100155>
- Young, C. L., Britton, Z. T., & Robinson, A. S. (2012b). Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal*, 7(5), 620–634. <https://doi.org/10.1002/biot.201100155>
- Yu, X., Tang, X., Gohil, S. V., & Laurencin, C. T. (2015). Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Advanced Healthcare Materials*, 4(9), 1268–1285.
<https://doi.org/10.1002/adhm.201400760>

- Zhang, J., Jia, J., Kim, J. P., Shen, H., Yang, F., Zhang, Q., Xu, M., Bi, W., Wang, X., Yang, J., & Wu, D. (2017). Ionic Colloidal Molding as a Biomimetic Scaffolding Strategy for Uniform Bone Tissue Regeneration. *Advanced Materials*, 29(17), 1605546. <https://doi.org/10.1002/adma.201605546>
- Zhang, Y., Xiang, Q., Dong, S., Li, C., & Zhou, Y. (2010). Fabrication and characterization of a recombinant fibronectin/cadherin bio-inspired ceramic surface and its influence on adhesion and ossification in vitro. *Acta Biomaterialia*, 6(3), 776–785. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.08.025>
- Zhao, Y., Wong, H. M., Lui, S. C., Chong, E. Y. W., Wu, G., Zhao, X., Wang, C., Pan, H., Cheung, K. M. C., Wu, S., Chu, P. K., & Yeung, K. W. K. (2016). Plasma Surface Functionalized Polyetheretherketone for Enhanced Osseo-Integration at Bone-Implant Interface. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(6), 3901–3911. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b10881>
- Zheng, L., Baumann, U., & Reymond, J.-L. (2003). Production of a functional catalytic antibody ScFv-NusA fusion protein in bacterial cytoplasm. *Journal of Biochemistry*, 133(5), 577–581. <https://doi.org/10.1093/jb/mvg074>
- Zhou, G., & Groth, T. (2018). Host Responses to Biomaterials and Anti-Inflammatory Design—a Brief Review. *Macromolecular Bioscience*, 18(8), e1800112. <https://doi.org/10.1002/mabi.201800112>
- Zollinger, A. J., & Smith, M. L. (2017). Fibronectin, the extracellular glue. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 60–61, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.07.011>

Annexes



Article

Engineering of Bio-Adhesive Ligand Containing Recombinant RGD and PHSRN Fibronectin Cell-Binding Domains in Fusion with A Colored Multi Affinity Tag: Simple Approach for Fragment Study from Expression to Adsorption

Amina Ben Ablal^{1,2}, Guilhem Boeuf¹, Ahmed Elmarjou³, Cyrine Dridi^{1,2}, Florence Poirier², Sylvie Changotade², Didier Lutomski² and Abdellatif Elm'selmi^{1,*}

¹ EBInnov®, Ecole de Biologie Industrielle, 49 Avenue des Genottes, 95000 Cergy, France ; a.benabla@hubebi.com (A.B.A.); g.boeuf@hubebi.com (G.B.); c.dridi@hubebi.com (C.D.)

² Unité de Recherche Biomatériaux Innovants et Interfaces URB2i, Université Paris Sorbonne Nord, 74, Rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, , France; florence.poirier@univ-paris13.fr (F.P.); changotade@univ-paris13.fr (S.C.); lutomski@univ-paris13.fr (D.L.)

Citation: Ben Ablal, A.; Boeuf, G.; Elmarjou, A.; Dridi, C.; Poirier, F.; Changotade, S.; Lutomski, D.; Elm'selmi, A. Engineering of Bio-Adhesive Ligand Containing Recombinant RGD and PHSRN Fibronectin Cell Binding Domains in Fusion with A Colored Multi Affinity Tag: Simple Approach for Fragment Study from Expression to Adsorption. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Riccardo Alessandro

Received: 28 May 2021

Accepted: 28 June 2021

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.





Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

³ Plateforme de Production D'anticorps et de Protéines Recombinantes, Institut Curie/CNRS UMR144, 75248 Paris, France; elmarjou@curie.fr

* Correspondence: a.elmselmi@hubebi.com; Tel.: +33-1-85-76-66-90; +33-1-85-76-67-16

Abstract: Engineering of biomimetic motives have emerged as promising approaches to improving cells' binding properties of biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine. In this study, a bio-adhesive ligand including cell-binding domains of human fibronectin (FN) was engineered using recombinant protein technology, a major extracellular matrix (ECM) protein that interacts with a variety of integrins cell-surface's receptors and other ECM proteins through specific binding domains. 9th and 10th fibronectin type III repeat containing Arginine-Glycine-Aspartic acid (RGD) and Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN) synergic site (FNIII9-10) were expressed in fusion with a Colored Multi Affinity Tag (CMAT) to develop a simplified production and characterization process. A recombinant fragment was produced in the bacterial system using *E. coli* with high yield purified protein by double affinity chromatography. Bio-adhesive surfaces were developed by passive coating of produced fragment onto non adhesive surfaces model. The recombinant fusion protein (CMAT-FNIII9/10) demonstrated an accurate monitoring capability during expression purification and adsorption assay. Finally, biological activity of recombinant FNIII9/10 was validated by cellular adhesion assay. Binding to $\alpha 5\beta 1$ integrins were successfully validated using a produced fragment as a ligand. These results are robust supports to the rational development of bioactivation strategies for biomedical and biotechnological applications.

Keywords: bio-adhesive ligand; fusion protein; monitoring process; protein adsorption monitoring; cell adhesion

1. Introduction

Engineering biomimetic motives delivering specific signals that direct cell function especially integrin-mediate cellular adhesion have emerged as promising approaches to improving cells-binding properties of biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine [1]. Biomaterials are commonly used in different therapeutic strategies for tissue engineering and bone reparation [2,3]. Nevertheless, several limitations are still facing their biological integration. One major disadvantage is the lack of interaction with the surrounding environment leading to immunological complications [4]. These limitations have driven the need for the development of innovative approaches to promote rapid biomaterials and efficient bio-integration. One promising strategy is the immobilization of the extracellular matrix (ECM) proteins onto biomaterials' surface to generate bio-activated surface miming the ECM functions [5,6]. Fibronectin (FN) is a key element of ECM through its contribution to structural integrity and biological function of tissues and organs [7]. This dimeric glycoprotein is composed of two identical polypeptides structurally stabilized by disulfide bonds at their C-termini [8]. It is found in a soluble form in liver and blood [9] and secreted by different cells such as endothelial cells and fibroblasts in insoluble form [10]. Several studies have underlined the considerable implication of FN in a variety of biological processes especially in cytoskeletal assembly, cell



attachment, and migration [11,12], since its different domains are specific ligands for a variety of ECM proteins principally collagen [13,14] and heparin [15] as well as integrins cell surface receptors [16–18]. Therefore, controlling FN-integrins-specific interactions offers an innovative strategy to engineering biofunctionalized surfaces promoting cellular adhesion and stimulating cellular proliferation and migration [11,19,20]. So far, FN interactions with cell surface integrin's receptors have been widely reported and later studies have shown the implication of a short peptide sequence Arg-Gly-Asp (RGD) localized in the cell-binding domain (FNIII10) as the major functional peptide responsible for the cell's binding [21]. Although FN-RGD sequence (FNIII 10) binds to a wide range of integrins such $\alpha 5\beta 1$ [22] and $\alpha v\beta 3$ [23], additional synergic domains are required for promoting specific integrin interactions to FN [24]. Notably, it was established that the presence of an additional sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN) localized in the 9th domain type III repeat (FNIII9) is required to act synergistically with the 10th domain in binding $\alpha 5\beta 1$ integrin [25], which controls cellular attachment and migration, exchanges signals that prevent apoptosis and maintains cell-cycle progression [26].

Because of the expensive cost and low availability of native ECM proteins including FN [5], their use remains critical and limited. Other observations indicate the loss of conformation while proceeding to adsorption of native FN on several supports leading to a reduced cell receptor response [27]. To circumvent these drawbacks, researchers tended to engineer small recombinant protein fragments deriving from functional ECM protein domains ensuring oriented bioactivity with reduced cost and improved affinity [18,28] as well as enabling the design of novel combined recombinants fragments for additional activities [22,29–31]. In this case, the fusion tag technology has been extensively used for recombinant fragments production to allow efficient purification with reduced time and cost when compared to native ECM protein purification [32]. Affinity purification tags, such as a polyhistidine tag and streptavidin/biotin derivative systems, have become indispensable fusion partners for easy purification or immobilization of proteins [33,34]. Thus, fibronectin domains have been widely expressed with fusion partners for easy step purification using the Histidine (His)-tag [35] and Glutathion S-transferase (GST)-tag [31] or for enhancing bifunctionality using cadherin [36] and keratinocyte growth factors [37]. A challenging area in this field is the design of improved production strategy for high purity and robust characterization of a biomimetic recombinant fragment [38,39]. Recently, new fusion strategies have emerged for monitoring the production and characterization process and seems very promising. However, the marker whose tags are relatively less described in the literature and most current processes for recombinant protein production have limited monitoring capabilities. We previously reported the design of a Colored Multi Affinity Tag (CMAT) which contains a colored marker cytochrome b5 and two affinity purification tags: 10His (polyhistidine) and SBP (streptavidin binding protein). The key advantage of this technology is that enabling an easy monitoring of production and purification process and our previous results showed a high purity purification using the double-purification system [40].



The aim of this work is to produce the functional sites of the FN-cell-binding domains using recombinant protein technology as well as to develop a simple and efficient approach for its characterization and biological activity evaluation. Recombinant 9 and 10 type III fibronectin domains (rFNIII9/10) was expressed in *E. coli* in fusion with CMAT-tag reported in our previous studies [40,41]. This system has demonstrated its performance in real time monitoring of rFNIII9/10 production and purification steps allowing high degree of purity and improved evaluating strategies. The adsorption of rFNIII9/10 fragment onto microplate wells surfaces was evaluated using a novel method based on the CMAT tag. We further investigated the rFNIII9/10 biological activity by studying its capacity as a bio adhesive ligand and its interaction with integrins. $\alpha 5\beta 1$ integrins were showed to successfully bind rFNIII9/10. Finally, engineered rFNIII9/10 was shown to be efficient in promoting gingival fibroblasts cell adhesion.

2. Results

In the present study, a functional adhesive ligand containing recombinant FN 9th and 10th type III repeats (rFNIII9/10) including RGD sequence and PHSRN synergic site was designed using standard gene cloning and plasmid construction techniques.

To quantitatively and qualitatively monitor the rFNIII9/10 expression and to simplify characterization steps, the CMAT-tag [40,41] was used as the fusion partner.

Absence of mutation or alteration in the sequence used for CMAT-FNIII9/10 expression was confirmed by PCR, enzyme digestion, and DNA sequencing. Expression of the fusion protein was carried out using standard recombinant protein technology.

2.1. Production of Recombinant CMAT-FNIII9/10

E. coli BL21 (DE3) pLysS was transformed with the recombinant pET15b holding the 9th and 10th type III repeats. During production, the soluble expression of rFNIII9/10 and biomass were evaluated in real time due to the CMAT fusion partner and was analyzed by SDS-PAGE. As we previously reported [40], the appearance of a red color was directly observed during the expression and the extraction steps of rFNIII9/10-tagged protein. Thereby, this red color property of cytochrome b5 provides a simple and powerful method for an accelerated screening of the optimal expression condition. Furthermore, early information about rFNIII9/10 solubility is accurately identifiable by following the coloration of the soluble fraction and the harvested cell pellet without resorting to the time-consuming steps of gel analysis (Figure A1). As we have demonstrated previously [40], a direct correlation was found between the red coloration intensity of fractions and produced protein with an optical density (OD) profile at 400 nm measurement of each sample. This system allows a rapid and efficient method to monitor protein expression at different points of time during production (Figure 1).

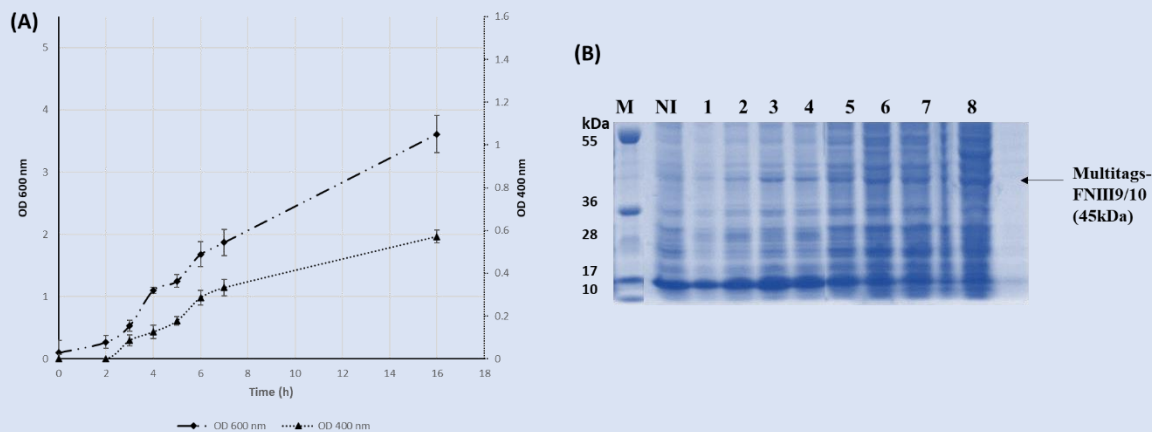


Figure 1. Recombinant FNIII9/10 production: (A) real time monitoring of Multitags-FNIII9/10 production: Protein was expressed in *E. Coli BL21 pLysS* induced with 0.5 IPTG at 25 °C (A) represents optical density (OD) profile at 600 nm (●) for biomass evolution and at 400 nm (▲) for recombinant protein soluble expression, (B) represents SDS–PAGE analysis of the time course protein expressions. Proteins were separated on 12% Bis-Tris gels (Invitrogen, Waltham, MA, USA). M: protein molecular weight marker. Ni: soluble fraction from cells withdrawn at the time of induction. Lanes 1–8: soluble fractions from cells withdrawn at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 16 h after induction, respectively.

Recombinant fragment’s soluble expression increased with biomass increasing after induction (Figure 1A). Finally, rFNIII9/10 was produced with a yield of 200 µg per 100 mL LB culture.

2.2. Protein Purification and Detection

To purify the rFNIII9/10 produced fragment, double affinity chromatography purification using 10His tag and SBP tag was performed in this study through a CMAT fusion partner. Subsequent Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel analysis revealed the presence of a protein band around 45 kDa in the purified fractions, consistent with the expected molecular weight of the fusion protein (CMAT-rFN). This peptide presents a reduced weight (45 kDa) compared to full FN (450 kDa) [9]. Short FN domains have been demonstrated to be less antigenic than longer proteins from which they derive [42] in addition to providing specific interaction with receptors to predict a specific cellular response [30]. Results presented in Figure 2 show residual contaminants when purification was performed using a 10His tag only. This was also consistent with Keefe et al. who showed a lower purification degree with chromatography using His tag [43]. In addition, as noticed in several studies, residual contaminants were still observable after His- [30] [42] and GST-tagged [31] FN fragments purification. Conversely, here the fragment was recovered in greater than 98% purity using the double chromatography purification (Figure 2) and no other bands were visible on SDS-PAGE gel.

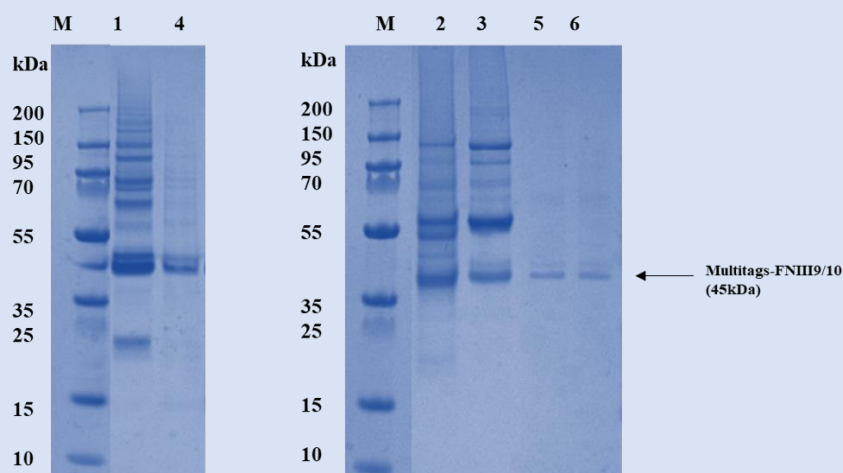


Figure 2. Purification analysis of rFNIII9/10; SDS_PAGE analysis of purified rFNIII9/10 fragment. Proteins were separated on 12% Bis-Tris gels (Invitrogen, Waltham, MA, USA): M: protein molecular weight markers. Lanes 1, 2, and 3: purified proteins using His tag, Lane 4–6: purified proteins with the double purification using His tag and SBP tag as described in the “methods” section.

This observation indicates that the performed double affinity chromatography completely removes contaminants and enables the recovery of the recombinant fragment with high degree of purity.

2.3. Mass Spectrometry

The presence of the short peptide sequences RGD and PHSRN designed in the recombinant FN fragment (rFNIII9-10) and implicated in cell adhesion was characterized by mass spectrometry. For this purpose, the protein band (42 kDa) corresponding to CMAT-rFNIII9-10 separated by SDS-PAGE was analyzed by MALDI-TOF/TOF as described previously [44]. Because the fusion protein contains a mixture of proteins, MS/MS identification is required to identify peptides from the FN fragment. Using the Peptide Mass software (<http://www.expasy.org> accessed on 22 June 2021), all masses corresponding to the theoretical cleavage of the recombinant FN fragment with trypsin, were labeled on the MS spectrum. Labeled peptides (9 peaks) are reported in the FN sequence (Figure A2). Interestingly, peptide masses corresponding to sequences including the RGD domain (1591.8 and 2470.3 m/z) and the PHSRN domain (995.5 and 2532.3 m/z) are detected on the MS spectrum. To identify these peptides, peaks of interest were submitted to MS/MS fragmentation. Three of them were unambiguously identified. MS/MS results confirm the presence of expected sequences (RGD and PHSRN) in the fusion protein (CMAT-rFNIII9-10) (Figure A2 and Table A1).

2.4. Affinity Binding Assay of rFNIII9/10 to $\alpha 5\beta 1$ Integrins Receptors

Previous reports indicate that FN binds to integrins through the RGD site whereas a synergic PHSRN site is critical for binding to $\alpha 5\beta 1$ integrins especially in [25,26]. Aiming to validate the biological activity of a produced fragment and its interaction with $\alpha 5\beta 1$ integrin, affinity binding of the two proteins was investigated. Thus, to determine whether rFNIII9/10 interacts directly with integrin $\alpha 5\beta 1$, we performed a binding

affinity assay using the purified protein. Figure 3 shows that the binding of recombinant produced fragment to $\alpha 5\beta 1$ is direct and increased in a dose-dependent way. Moreover, binding reached saturation for 0.4 μg integrins coating quantity, showing that $\alpha 5\beta 1$ integrins potency for rFNIII9/10 recruitment is sensible. As we can see, the ligands induced concentration-dependent and saturable rFNIII9/10 recruitment profile. This result confirms that FNIII9/10 binds specifically and directly to the $\alpha 5\beta 1$ integrins. Altogether, these results indicate that produced rFNIII9/10 is an efficient ligand for integrin $\alpha 5\beta 1$ cell receptors and provides significant insight into the role of the 9th and 10th type III repeats as the central cell-binding domain of FN.

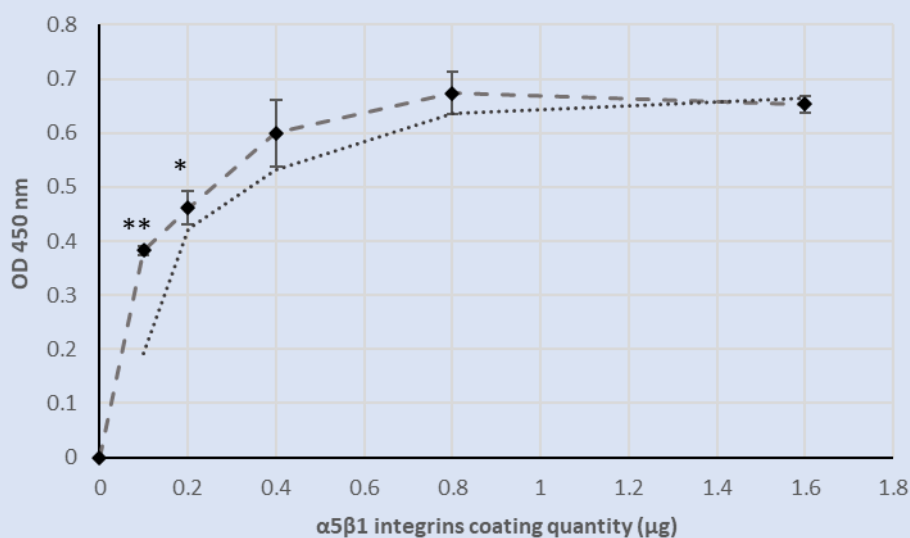


Figure 3. rFNIII9:10— $\alpha 5\beta 1$ integrin affinity binding assay: Integrin $\alpha 5\beta 1$ specifically binds to rFNIII9/10: Binding profile of coated $\alpha 5\beta 1$ integrins to rFNIII9/10; figure represent $\alpha 5\beta 1$ integrins coating quantity as a function of OD 450 nm: rFNIII9/10 (3, 2 μg) was incubated with increasing coating concentrations of recombinant $\alpha 5\beta 1$ integrins up to 16 μmL . Binding complex was evaluated owing to SBP tag bound to Streptavidin HRP, as described in the experimental procedure and graphical abstract. Experiments were performed in triplicate, and each assay point in the binding curves represents mean \pm SD of three measurements (Main p ANOVA < 0.05).

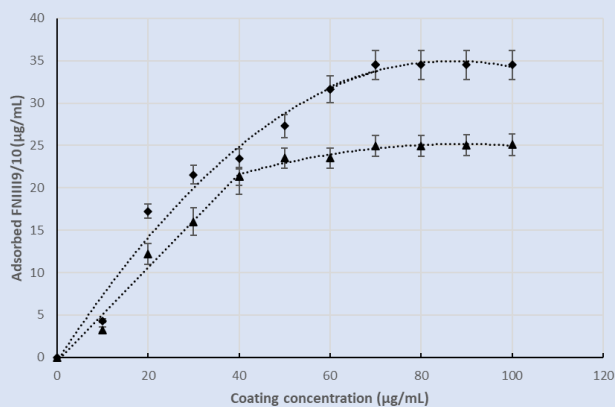
As expected, produced ligand (rFNIII9/10) binds successfully to the $\alpha 5\beta 1$ integrins. This result confirms that FNIII9/10 binds specifically and directly to the $\alpha 5\beta 1$ integrins and provides significant insight into the role of the 9th and 10th type III repeats as the central cell-binding domain of FN.

2.5. rFNIII9/10 Simple Coating Promotes Cellular Adhesion

rFNIII9/10 fragment was produced with high purity reaching 95%. The presence of RGD and PHSRN sequences validated by MS/MS and the binding capacity to integrins determined by performed affinity binding assay are in excellent agreements with previous reports [17,45,46]. To further evaluate the bioactivity of this fragment, a bio-adhesive surface was designed in this study by coating a non-adhesive support with rFNIII9/10. The surface ability of promoting cellular adhesion was studied.

2.5.1. Passive Adsorption of rFNIII9/10 onto Plate Surface

To evaluate the adsorbed ligand density onto polystyrene (PS) plaque wells, a simple and preferment technique based on enzyme-linked immobilization assay (ELISA) was used. Increasing concentrations of rFNIII9/10 solution were added in plate wells for 1 h and the density of adsorbed protein was determined via ELISA assay using streptavidin coupled to horseradish peroxidase (HRP). Owing to CMAT fusion partners rapid and sensitive detection of adsorbed rFNIII9/10 was enabled through the direct interaction between a streptavidin HRP and SBP tags presented in CMAT. The correlation between this method and bicinchoninic acid (BCA) quantification was confirmed as shown in Figure 4. Thus, CMAT fusion technology affords a rapid tracking method for proteins adsorption onto supports.



(A)

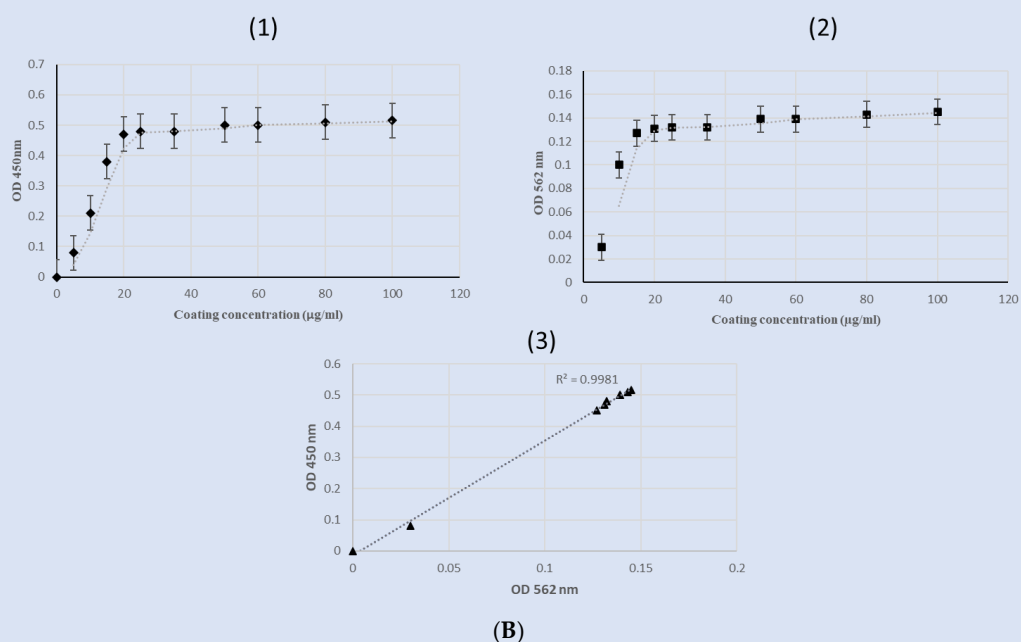
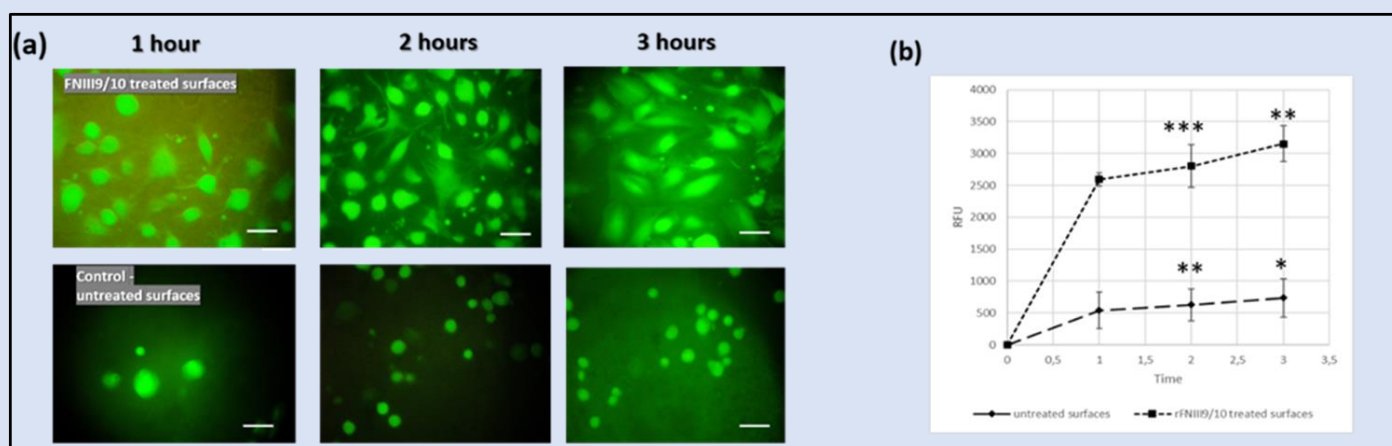


Figure 4. Adsorption study of FNIII9/10 onto well plate surface: **(A)** Passively adsorbed proteins as a function of coating concentration for 60 min (▲) and overnight (●) incubation; **(B)** correlation between BCA and enzyme-linked immobilization assay-based method used for adsorbed protein quantification $R^2 = 0.9948$: Briefly, (1) adsorbed proteins were quantified by enzyme-linked immobilization assay [40,41] based method owing to SBP tag, and (2) BCA kit was used to quantify adsorbed proteins; (3) correlation between enzyme-linked immobilization assay and BCA; OD450 nm as a function of OD562 nm. (Main p ANOVA < 0.05).

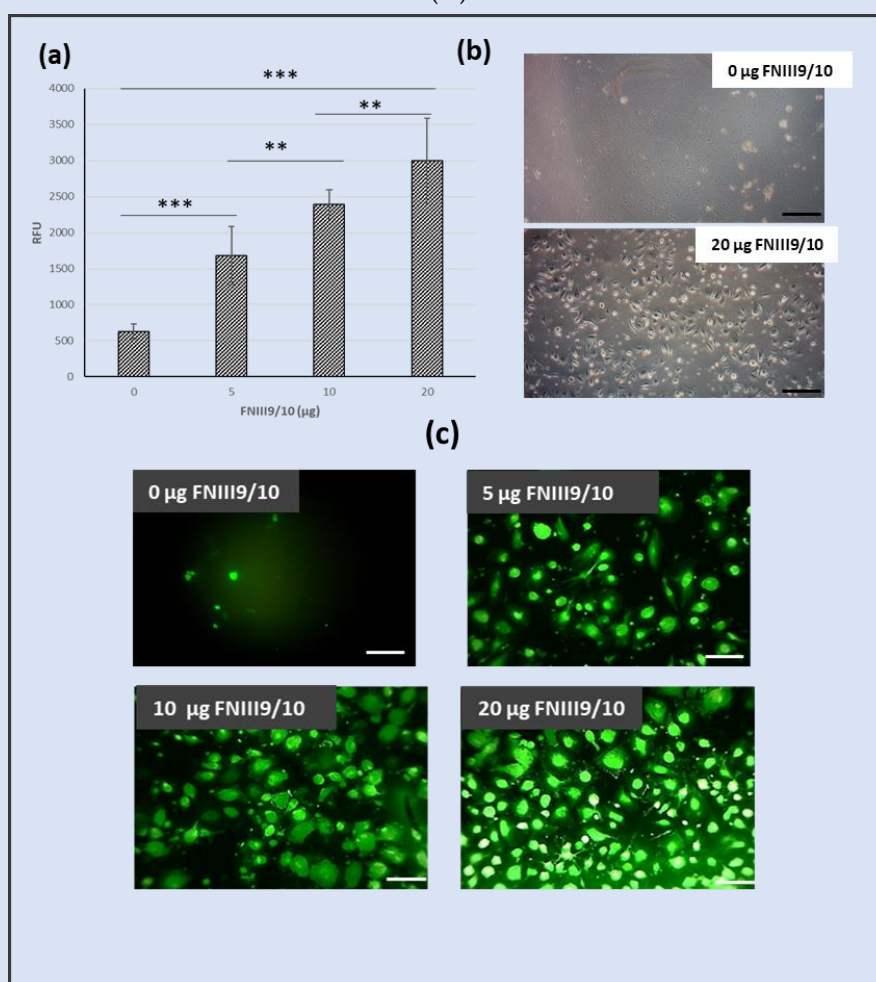
At low rFNIII9/10 coating concentrations, differences in the amounts of adsorbed protein were detected. Adsorption increased with fragment concentration when less than 60 µg/mL ($R^2 = 0.75$, p -value (H_0 ; slope = 0) < 0.05) and 40 µg/mL ($R^2 = 0.844$, p -value (H_0 ; slope = 0) < 0.05)) for 1 h and overnight treatment, respectively. Fragment surface density reached saturation at a coating concentration near 60 µg/mL for 1 h treatment ($R^2 = 0.6$, p -value (H_0 ; slope = 0) > 0.05) and 40 µg/mL ($R^2 = 0.75$, p -value (H_0 ; slope = 0) > 0.05)) for overnight treatment. To summarize, this designed model presents a well-defined surface that allows direct functional comparison on a molar basis of rFNIII9/10 as adhesive ligand.

2.5.2. FN-Mimetic Surfaces Supporting Cellular Adhesion

Based on FNIII9-10 adsorption study results, we engineered bio-adhesive surfaces presenting different densities of rFNIII9-10 in order to evaluate whether designed fragments mediate specific cellular adhesion of human gingival fibroblast (hGF) (Figure 5II).



(A)



(B)

Figure 5. Cellular adhesion study on rFNIII9/10-coated surfaces: hGF cell adhesion to rFNIII9/10-coated surfaces showing an early cell attachment and a comparable dose-dependent level. (A) Early cell adhesion for almost 3 h of incubation. Early cell adhesion was evaluated in serum-free medium onto uncoated and rFNIII9/10-coated surfaces (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ coating concentration) for 1-, 2-, and 3-h incubation, cells were labeled with Calcein AM fluorescence marker. (a) Micrographs of fluorescence-labeled adherent cells at different incubation times studied (1, 2, and 3 h) for negative control and rFNIII9/10-treated surfaces (magnification scale 40X). (b) Adherent cell assessment: relative fluorescence units (RFU) as a function of time. (B) rFNIII9/10 surface density effect on hGF adhesion; adhesion was studied



in serum-free medium onto different rFNIII9/10-coated surfaces: [0 μg , 5 μg , 10 μg , and 20 μg adsorbed rFNIII9/10] for 2 h adhesion ; cells were labeled with calcein AM fluorescence marker ; (a) adherent cell assessment; (b) image of adherent cells without labeling for uncoated and rFNIII9/10-coated surfaces (magnification scale 10X). (c) Image of calcein-labeled hGF cells adhering to treated/not treated surfaces for 2 h (magnification scale 20X). Data are expressed as mean relative fluorescence units (RFU) of triplicate wells \pm SEM. * Significantly different $p < 0.05$ (ANOVA), ** high significantly different $p < 0.02$ (ANOVA), *** very high significantly different $p < 0.01$ (ANOVA).

Cellular adhesion was studied on surfaces with or without an initial rFNIII9/10 coating after 2 h of incubation in a serum-free medium. Results show an increase in a dose-dependent manner of cell adhesion to adsorbed rFNIII9/10 (Figure 5). Uncoated surfaces showed a significantly low cell attachment compared to FNIII9-10-coated surfaces where cell adhesion observed was higher ($p < 0.01$ ANOVA). As shown in Figure 5 cell adhesion to FNIII9-10 developed surfaces presented dose-dependent increases with FNIII9-10 coating concentration. The increases of adherent cell numbers probably resulted from higher sensibility of integrin cell receptor with a quantity of rFNIII9-10. We further investigated early cell attachment at 1, 2, and 3 h on rFNIII9/10-coated well surfaces at saturating coating concentration and results showed a difference in adhesion from 1 h after seeding cells compared with uncoated wells ($p < 0.02$ ANOVA). Adhesion was significantly greater than that observed on untreated surfaces for the investigated duration (main $p < 0.02$ ANOVA) and adherent cells to rFNIII9/10 surfaces displayed well morphologies and were already well-spread after only one hour of adhesion (Figure 5A). To further investigate rFNIII9/10's ability to promote cellular adhesion, the bioactivity of the recombinant fragment was compared with full FN. Our results show that the rFNIII9/10 exhibited equivalent levels of adhesion (Figure A3). Our findings concur with results reported by Martino et al. (2009) who obtained similar adhesion level of cells to recombinant FN cell-binding domains (FNIII9-10)-coated surfaces compared to native FN [47].

Taken together these results indicate that engineered fragment support integrin $\alpha 5\beta 1$ -mediated cellular adhesion. Moreover, bio-adhesive surfaces with immobilized FNIII9-10 present dose-dependending levels of cellular adhesion and enable early cell attachment.

3. Discussion

Significant efforts are being made to further understand and control ECM-integrin interactions as it is essential for many applications including the development of biomimetic materials. In this study, bioactive fragments derived from FN-cell-binding domains was engineered in fusion with multi-tags for a simple and rapid characterization. The main findings from this study are as follows: (i) Engineered fragment encompassing the RGD motif and PHRSN synergic site enables $\alpha 5\beta 1$ integrin direct interaction; (ii) support cell adhesion on coated surfaces; (iii) fusion partners used provide a time and cost-efficient simple technology for the fragment characterization as previously described. This study aimed to produce the functional sites of the FN-cell-binding domains and to develop a simple and efficient approach for its characterization and adsorption studies. FN domains have been widely expressed with fusion partners for both easy step purification using the His-tag [30] and GST-tag [26] or for enhancing bio-functionality using



cadherin [31] and keratinocyte growth factor [32]. In this work, we have described for the first time the production of the cell-binding domain of human FN type III (FNIII9-10) containing the RGD motif and the synergy sequence in fusion with multi-tags (CMAT) in *E. coli*. It was initially confirmed that an engineered fragment was recovered in greater than 98% purity using the double chromatography purification using CMAT. Although the degree of purity is of particular interest for the desired application of these bioactive molecules, previous studies are less interested in this parameter. Residual contaminants were observable after His-tagged [45] and GST-tagged [26] for FN fragments purification. This was also observed in Keefe et al.'s findings who showed a lower purification degree with chromatography using His-tag [46]. In this study, the use of multi-tag fusion partners enabled a double affinity chromatography on His and SBP tag which completely removes contaminants as shown in Figure 2. This result underscores the importance of bimolecular engineering strategies and could provide a robust approach for FN fragments purification. FN central cell-binding domain has been well studied and it has been demonstrated that FNIII10-containing RGD motive binds to several integrins while FIII9 compressing PHSRN site is required for binding specifically to $\alpha 5\beta 1$ integrin. Here, we confirmed this interaction by performing affinity-binding assay of $\alpha 5\beta 1$ integrin using recombinant FNIII9/10 fragment as ligand. Results showed rFNIII9/10 binds $\alpha 5\beta 1$ integrins successfully. Therefore, one may assume that rFNIII9/10 directly interacts with $\alpha 5\beta 1$ integrins. This result is in general agreement with previous studies exploring the synergistically acting of RGD motif and PHRSN site for the $\alpha 5\beta 1$ integrins-FN interaction [48,49]. The bio-adhesive activity of a recombinant fragment was then explored by tethering a non-adhesive surface with FNIII9/10 fragment to generate controlled bio adhesive interfaces. Several investigators have functionalized surfaces with FN mimetic peptides supporting cellular adhesion and demonstrated the exquisite sensitivity of $\alpha 5\beta 1$ integrins binding to perturbations in the orientation of RGD-PHRSN as in the native FN [50–53]. Moreover, previous reports showed that surface chemistry modulate the amount and the conformation of adsorbed FN fragments which significantly affect its bio adhesive activity [48]. In this study, simplified ELISA was used to evaluate passively adsorbed rFNIII9/10 through SBP tag. The results showed a linear correlation of used methods with basic protein quantifications assays. A linear increase of adsorbed rFNIII9/10 with increasing coating concentration was observed for concentrations of up to 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 60 min and overnight respectively and a well-defined saturation plateau was identified for the highest concentrations suggesting that those concentrations were sufficient to saturate the plate's surfaces (p -value (H_0 ; slope = 0) > 0.05). Evaluating tethered ligand densities is an important design parameter for generating bio interfaces so that it makes the use of ELISA strategy in this study more relevant to current reports. Finally, the ability to promote cell attachment of an engineered fragment was evaluated. As a result, coating non adhesive surfaces with rFNIII9/10 was shown, as expected, to be effective in promoting cellular adhesion. Moreover, a low density of rFNIII9/10 was sufficient to increase cell adhesion compared to negative control (absence of rFNIII9/10 coating) and similar adhesion levels with native FN. The improved adhesive



activities of functionalized surfaces using rFNIII9/10 fragment can be attributed to enhanced $\alpha 5\beta 1$ integrin binding. It is hypothesized that the RGD motif and PHSRN are presented in the same conformation as the native FN leading to a higher receptor-binding affinity [49]. Furthermore, Petrie TA and al. (2006) showed that recombinant domains of FN (FNIII7-10) in fusion with a biotin tagging sequence at the amine terminus were still able to activate FAK phosphorylation [46]. FAK localizes to focal adhesions and activates various signaling cascades regulating cell survival, proliferation, and differentiation [54]. Petrie TA and al. obtained similar adhesion levels as reported in our study with a validated FAK activation. We can clearly see that bioadhesive properties of rFNIII9/10-engineered surfaces may be attributed to integrin–ligand bonds which have the ability to promote intracellular signaling of the recombinant fragment [55].

In summary, this study provides a general agreement with previous reports in the field of FN $\alpha 5\beta 1$ integrin interactions and an alternative experimental strategy to engineer and study recombinant fibronectin domains using fusion technology. Finally, engineered rFNIII9/10 was shown to directly interact with $\alpha 5\beta 1$ integrins and be efficient in promoting cell adhesion on tethering surfaces. This makes it an interesting bioactive fragment that could potentially be used to improve bio integration of tissue engineered scaffolds in biomedical devices.

4. Materials and Methods

4.1. Materials, Expression Vector, and Strains

Reagents including tryptone, yeast extract, ampicillin, and agarose were purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France). DNA polymerase, TA Cloning kit, and gel electrophoresis were bought from Invitrogen (Waltham, MA, USA). T4 DNA ligase, oligonucleotides for gene amplification, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), δ -aminolevulinic acid (ALA) and molecular weight markers were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Restriction endonucleases and enzymatic quantification reagent bicinchoninic acid (BCA) were from Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). NucleoSpin Plasmid was obtained from Macherey-Nagel (Düren, Nordrhein-Westfalen, Germany). Streptactin column was purchased from Novagen and NI-NTA agarose from Sigma (St. Louis, MO, USA). Expression vector pET15b-CMAT used to produce the recombinant rFN was previously developed in our laboratory [40]. *E. coli* strains Top10F' (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and BL21 (DE3) pRARE (Novagen, Darmstadt, Germany) were used for all subclonings and expression studies, respectively. All enzymatic quantification reagents including Streptavidin-Peroxidase (Ultrasensitive), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate system, stop reagent for TMB substrate and Tween 20 were also purchased from Sigma (Steinheim, Germany). HisGrab™ Nickel-coated 96-well plates were obtained from pierce (Rockford, IL, USA). StrepTrap™ HP and HisTrap™ HP columns used for the purification of recombinant proteins were procured from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). NZY Auto-Induction LB medium (powder) was bought from NZYTech gene and enzyme (Lisboa, Portugal). Other reagents including Bacto tryptone, ampicillin, agarose, and yeast extract were bought from Euromedex (Souffelweyersheim, France).



4.2. Expression Vector pET15b-CMAT-rFN

DNA sequence encoding FNIII9-10 was standard PCR amplified using primer 1 (5'- cacgtgtaggtcttgattccccaactgg) and primer 2 (5'- gctcagcttaattgttcgtaattaatggaat). The forward and the reverse primers were designed to add a 5' PmlI and a 3' BspI restriction sites, respectively. PCR cycles were as follows: denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 58 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 2 min for 30 cycles. The PCR amplicon was first subcloned into pCR2.1 for an optimized cloning then cloned into pET15b in phasis with the previously inserted CMAT sequence. This fusion partner contains a colored tracking marker (cytochrome b5) and two affinity purification tags (10His and SBP). To allow removal of the CMAT partner, a Tobacco Etch Virus (TEV) cleavage site was inserted to recover the rFN from the fusion protein. The expression vector containing the recombinant CMAT-rFN protein was sequenced to validate the cloning step (Sanger method, GATC-biotech Mulhouse, France).

4.3. Protein Expression

E. coli BL21 (DE3) pLysS strain transformed with the recombinant plasmid was cultivated overnight on LB agar plate containing 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol at 37 °C. A starter culture (10 mL) prepared from one isolated colony was used to inoculate 100 mL of fresh LB medium supplemented with ampicillin and chloramphenicol. OD600 nm was standardized to 0.1 and shaking flask was incubated at 37 °C, 225 rpm until biomass reached the early log phase growth. At OD600 nm around 0.5, induction was performed at 25 °C with 0.5 mM IPTG in the presence of 2 mM ALA. Samples at different time points were analyzed for OD600 nm and OD400 nm (see qualitative and quantitative monitoring section). After overnight incubation, cells were harvested by centrifugation at 4000 rpm for 15 min (4 °C) then washed with PBS. The cell pellet was re-suspended in 10 mL of phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 and 0.5% Triton X-100 supplemented with 1mg/mL of Lysozyme and a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and incubated 1 h at 4 °C, then supernatant and lysate pellet fractions were separated by centrifugation at 13,000 rpm for 30 min.

4.4. First Purification Step Based on 10His Tag

About 10 mL of the soluble 10His-tagged protein fraction extracted from induced culture was mixed with 250 µL equilibrated His-select® Nickel Affinity gel for 1 h at 4 °C. The charged resin was packed in a 5 mL column and washed with three column volumes of PBS (pH 7.4) containing 15 mM Imidazole to remove contaminating *E. coli* proteins. The elution was performed using 250 µL of PBS (pH 7.4), 250 mM imidazole.

4.5. Second Purification Step Based on SBP tag

The eluted fractions from the first purification step were pooled, diluted five times in PBS, and applied onto Strep.Tactin® SpinPrep™ columns previously equilibrated with 500 µL wash buffer (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) according to the manufacturer's instructions. Non-specifically bound proteins were removed by four washing steps, each with 100 µL of wash buffer and the



SBP-tagged protein was eluted with 150 μ L of elution buffer (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 mM D-biotin, pH 8.0). The final purified protein was dialyzed and frozen for storage at -80 $^{\circ}$ C until further analysis.

4.6. Qualitative and Quantitative Monitoring

Real-time monitoring of proteins production and purification was qualitatively assessed by following the appearance of a red coloration during the handling processes. The total protein amounts at different post-induction times were determined using a BCA assay kit. For the monitoring of the rFNIII9/10 tagged protein, the absorbance of the lysate fractions was measured at 400 nm [40]. Results from OD400 nm quantification were compared with BCA quantification and a relationship between the quantity of fusion proteins (rFNIII9/10) and the total soluble proteins was established.

4.7. SDS-PAGE Analysis and Quantification

Fusion protein expression, solubility, and purification steps were performed by SDS-PAGE on 4–12% Bis-Tris gel as previously described [40]. Gels were captured with ImageQuant 350 camera and bands were quantified with ImageQuant TL software (GE Healthcare, Chicago, Ill., USA). Recombinant fusion proteins were identified by ELISA using the streptavidin–peroxidase conjugated to HRP and the TMB substrate and confirmed by mass spectrometry.

4.8. Mass Spectrometry Analysis

The band to be identified was excised from gel and digested in-gel with trypsin using the automated Proteiner SPII (Bruker Daltonik, Billerica, MA, USA) and Ettan Digester (GE Healthcare, Chicago, Ill., USA) robots, following the manufacturer's instructions. Digests were mixed with saturated solution of cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix in 50% acetonitrile/2% formic acid and spotted on a MALDI sample plate. The MALDI-TOF/TOF (UltrafleXtreme, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) instrument was operated in the positive ion mode and controlled by the Compass for Flex software, version 1.4 (FlexControl 3.4, FlexAnalysis 3.4, Bruker Daltonics); 4000 laser shots were accumulated per spectrum in the MS and MS/MS modes. The MS spectra were externally calibrated using the peptide calibration standard mixture (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Peptides of interest were selected for MS/MS according to MS data. The data obtained by MS and MS/MS were submitted to the SwissProt/UniProtKB database (<http://www.expasy.org>) using the MASCOT software (Matrix Science, Torrance, CA, USA). The search parameters used were as follows: Homo sapiens taxonomy; fixed carbamidomethylation of cysteine residues; variable oxidation of methionine residues; peptide mass tolerance of 30 ppm and fragment-ion mass tolerance of 0.5 Da. maximum was allowed; one enzymatic missed cleavage maximum was allowed; trypsin as digestion compound. Mascot MS/MS ion score > 30 indicate identity ($p < 0.05$).

4.9. Affinity Binding Test of rFNIII9/10 to $\alpha 5\beta 1$ Integrins Receptors



To investigate the interaction of rFNIII9/10 with $\alpha 5\beta 1$ integrins, a binding affinity assay was performed in triplicate. Wells of a 96-well plate were coated overnight at 4 °C with 100 μ L of $\alpha 5\beta 1$ integrins diluted in PBS at several concentrations. Wells were then washed with 0.02% tween PBS three times and blocked with 1% of denatured BSA for 2 h at 37 °C. About 3.2 μ g of rFNIII9/10 prepared in binding buffer (50 mM trisHCL (pH 7.4), 100 mM NaCL, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂) was added and allowed to bind for 2 h at 37 °C. After 2 h of incubation, the rFNIII9/10 solution excess was removed, and plates were washed three times with 200 μ L of PBS 0.05% Tween-20. Streptavidin-Peroxidase at 1:5000 dilution (in PBS, 0.05% Tween-20) was then added and incubated for 1 h at room temperature under gentle agitation. After removing the streptavidin-peroxidase solution, plates were washed again as described above. For enzymatic activity measurement, 150 μ L of TMB substrate was added and plates were incubated for 30 min. After acidification with 150 μ L of 0.5 M H₂SO₄ stopping solution, the absorbance of each well was read with a microplate reader at 450 nm.

4.10. Quantification of Passively Adsorbed rFNIII9-10 Using Enzyme-Linked Immobilization Assay

rFNIII9/10 was passively adsorbed onto polystyrene wells surface to determine the saturating levels and to study its adsorption proprieties. PS wells were rinsed twice with PBS and then incubated with serial dilutions (1:2) of protein, starting at a concentration of 10 mg/mL for 1 h or overnight at 37 °C. Unbound proteins were removed by washing several times with PBS. Adsorbed rFNIII9/10 was quantified by ELISA as described previously [30]. Briefly, wells were washed three times with 200 μ L of PBS +0.05% Tween-20. Streptavidin-peroxidase at 1:5000 dilution (in PBS +0.05% Tween-20) was then added and incubated for 1 h at room temperature under gentle agitation. After removing the streptavidin-peroxidase solution, plates were washed again as described above. For enzymatic activity measurement, 150 μ L of TMB substrate was added and plates were incubated for 30 min. After acidification with 150 μ L of 0.5 M H₂SO₄ stopping solution, the absorbance of each well was read with a microplate reader at 450 nm. For BCA assays, adsorbed proteins were solubilized from the surface using 50 μ L 4 M Guanidine-HCL for 1 h. Total of 200 μ L of BCA working reagent was added and incubated for 30 min at 37 °C. Absorbance was measured at 562 nm.

4.11. Cell Adhesion Assay

Human gingival fibroblasts (hGF) were used in this study. hGF are primary human cells that adhere and spread on human FN-coated surfaces using $\alpha 5\beta 1$ integrins [39,56,57]. Cells were cultivated in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin at 37 °C in 5% CO₂. Non-tissue culture plates (48-wells) were coated with recombinant fibronectin proteins diluted in PBS or full FN (Fibronectin Human, Plasma, Thermo Fisher Scientific) at the indicated concentrations for 60 min at 37 °C and at saturating coating concentration for overnight incubation. Unbound protein was removed, and wells were washed with PBS and blocked with 1% denatured BSA for 1 h. HGF cells were seeded at 1.4×10^5 cells/cm² and allowed to adhere for 2 h at 37 °C, 5% CO₂ in serum-free medium. After incubation, cells were



washed with DPBS and labeled with calcein-AM, a cell-membrane permeable fluorescent marker (485 nm/535 nm), at 4 mM in DPBS+2 mM dextrose for 45 min, to calculate the density of adherent cells. In addition, cells were photographed with a Nikon TE-300 fluorescence microscope at 4.5 magnification.

4.12. Statistics

Each experiment was run in triplicate. Results were analyzed using the ANOVA method to determine the variance and the p value. Data are reported as mean \pm standard error. For the plateau of the saturation curve evaluation, the (right-tailed) F probability distribution (degree of diversity) for two data sets (F.DIST.RT function) was used to study hypothesis; H_0 ; slope = 0.

5. Conclusions

This study investigates the development of innovative bio-adhesive ligand derived from FN-cell-binding domains including RGD sequence and PHSRN synergic motif in fusion with multi-tags providing a rapid and efficient simple technology for protein characterization. Designed bio-adhesive motif enables direct interaction with $\alpha 5\beta 1$ integrins. Moreover, surfaces were passively coated with FNIII9-10-supported cell adhesion in a dose-dependent level. These results provide an innovative approach for performing bio-adhesive ligand with simple and rapid characterization techniques. In fact, results provide a biological active fragment displaying a comparable adhesive activity to full-length fibronectin which make it an interesting candidate for surface tethering. In addition, this strategy incorporates an interesting tag (SBP) offering a high affinity to streptavidin paving the way for the development of an oriented immobilization technology onto streptavidin layer coated onto supports for further controlled bioadhesive interfaces studies.

Author Contributions: Conceptualization, A.B.A. and A.E. (Ahmed Elmarjou); methodology, A.B.A., G.B., A.E. (Abdellatif Elm'selmi), F.P., A.E. (Ahmed Elmarjou); software, A.B.A., G.B., C.D., F.P., S.C.; validation, A.B.A., D.L., and A.E. (Ahmed Elmarjou) Funding acquisition, D.L. and A.E. (Ahmed Elmarjou); investigation, A.B.A., G.B., A.E. (Abdellatif Elm'selmi), C.D., F.P., and A.E. (Ahmed Elmarjou); visualization, A.B.A., D.L., A.E. (Ahmed Elmarjou); supervision, D.L., S.C., A.E. (Ahmed Elmarjou); project administration, D.L., A.E. (Ahmed Elmarjou); funding acquisition, D.L., A.E. (Ahmed Elmarjou); writing—original draft preparation, A.B.A., A.E. (Ahmed Elmarjou); writing—review and editing, A.B.A., D.L., A.E. (Ahmed Elmarjou); All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ecole de Biologie Industrielle.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and applicable local regulatory requirements and laws, that is to say the article L.1243-4 of the French Public Health Code

Informed Consent Statement: Not applicable

Data Availability Statement: The original data and the statistical analyses and the data that were cited as “not shown” can be obtained from the corresponding author upon request.

Acknowledgments: The authors would like to thank the “Ecole de Biologie Industrielle” (EBI) for the full funding of this study and would gratefully acknowledge the help provided by Rozalia Czak for her English language review.

Conflicts of Interest: This manuscript has not been published and is not under consideration for publication elsewhere. We have no conflicts of interest to disclose.

Abbreviations

ECM	Extracellular matrix
FN	Fibronectin
RGD	Arginine-Glycine-Aspartic acid
PHSRN	Proline-Histidine-Serine-Arginine- asparagine
CMAT	Colored Multi affinity tag
HIS	Histidine
GST	Glutathion S-transferase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
ELISA	enzyme-linked immobilization assay
hGF	Human Gingival fibroblasts

Appendix A

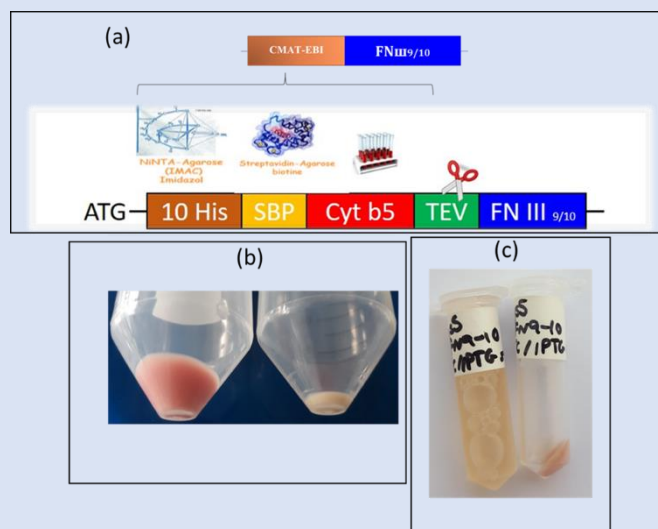


Figure A1. CMAT tag enable rapid and visual tacking of rFNIII9/10: The appearance of a red color was directly observable to the naked eye during the expression and the extraction steps of rFNIII9/10 tagged protein. (a) Schematic presentation of CMAT tag; (b) Induced (red) and Non induced bacteria pellet cultivated in 100 mL and 10 mL respectively; (c) Soluble and insoluble fraction after cell lysis.

Appendix B



(a)

1	MLRGPGLL	LLAVQCLGTA	VPSTGASKSK	RQAQQMVQPO	SPVAVSQSKP
51	GCYDNGKHQY	INQQWERTYL	GNALVCTCYG	GSRGFNCESK	PEAEETCFDK

1251	KDDKESVPI	DTIIPAVPPP	TDLRFNIGP	DTMRVTWAPP	PSIDLNTFLV
1301	RYSFVINEED	VAELSISSPD	NAVVLTNLLP	GTEVVSVSS	VYEQHESTPL
1351	RGRQKTGLDS	PTGIDFSDIT	ANSFTVHWIA	PRATITGYRI	<u>IRHQPENFSGR</u>
1401	<u>PREDRVPHSR</u>	<u>NSITLNLTP</u>	<u>GTEYVVSIVA</u>	<u>LNGREESPLL</u>	<u>IGQSTVSDV</u>
1451	<u>PRLEVVAAT</u>	<u>PTSLLISWDA</u>	<u>PAVTVRYRI</u>	<u>TYGETGGNSP</u>	<u>VQEFVPSK</u>
1501	<u>STATISGLKP</u>	<u>GVDYITVYA</u>	<u>VTGRGDPAS</u>	<u>SKPISINVRT</u>	EIDKPSQMQV
1551	TDVQDNSISV	KWLPSSSPVT	GYRVITTPKN	GPGPTKTSTA	GPDQTEMTIE
1601	GLQPTVEYVV	SVYACNPSGE	SOPLVQTAVT	NIDRPKGLAF	TPDVDVSIKI

2301	TYHVGQWQK	EYLGAIKSC	CFGGQRGWR	DNCRPFGGEP	SPEGTTGQSY
2351	NQYSQRYHQR	TNTNVNCP	CFHPLDVQAD	REDSRE	

(b)

Sequence position	Detected masses [M+H] ⁺	Predicted sequence
1390 – 1402	1625.8243	<u>R. IRHQPENFSGRPR.E</u>
1392 – 1402	1356.6409	<u>R. HHPENFSGRPR.E</u>
1403 – 1410	995.4742	<u>R. EDRVPHSR.N</u>
1411 – 1434	2532.3241	<u>R. NSITLNLTPGTEYVVSIVALNGR.E</u>
1435 – 1452	1954.9716	<u>R. EESPLLIGQSTVSDVPR.D</u>
1453 – 1476	2524.3271	<u>R. DLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVR.Y</u>
1480 – 1500	2168.0121	<u>R. IYGETGGNSPVQEFVPSK.S</u>
1501 – 1524	2470.2777	<u>K. STATISGLKPGVDYITVYAVTGR.G</u>
1525 – 1539	1591.7643	<u>R. GDSPASSKIPISINVR.T</u>

Figure A2. Mass spectrometry analyses. Result of sequence coverage for the gel band (CMAT-rFNIII9-10) analyzed by MALDI-TOF MS. (a) Black characters indicate the complete amino acid sequence of the human Fibronectin (Q8IVI8 from UniProtKB database <http://www.expasy.org>). Red characters indicate sequence of peptides detected by MS. Peptide sequences responsible for cell binding (RGD and PHSRN) are underlined. (b) Detail of peptide masses detected on MS spectra and predicted sequences. RGD and PHSRN sequences are underlined.

Table A1. MS/MS identification results.

Fragmented Masse	Identified Sequence	Protein Identification	Mascot Score
995.47 m/z	EDRVPHSR	Human fibronectin	43
2532.32 m/z	No matching	No identification	
2470.27 m/z	STATISGLKPGVDYITVYAVTGR	Human fibronectin	57
1591.76 m/z	GDSPASSKIPISINVR	Human fibronectin	59

Appendix C

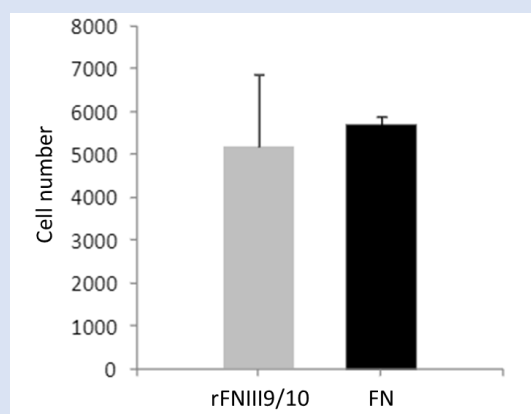


Figure A3. rFNIII9/10 exhibits equivalent biological activity as native FN. rFNIII9/10 and FN corresponds to adhesion onto 200 nM of recombinant fragment (rFNIII9/10) and full FN coated surfaces respectively.

References

- Amani, H.; Arzaghi, H.; Bayandori, M.; Dezfuli, A.S.; Pazoki-Toroudi, H.; Shafiee, A.; Moradi, L. Controlling Cell Behavior through the Design of Biomaterial Surfaces: A Focus on Surface Modification Techniques. *Adv. Mater. Interfaces* **2019**, *6*, 1900572, doi:10.1002/admi.201900572.
- Mandal, B.B.; Kundu, S.C. Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2956–2965, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.02.006.
- Jung, S.; Bohner, L.; Hanisch, M.; Kleinheinz, J.; Sielker, S. Influence of Implant Material and Surface on Mode and Strength of Cell/Matrix Attachment of Human Adipose Derived Stromal Cell. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4110, doi:10.3390/ijms21114110.
- Zaman, H.A.; Sharif, S.; Idris, M.H.; Kamarudin, A. Metallic Biomaterials for Medical Implant Applications: A Review. *Appl. Mech. Mater.* **2015**, *735*, 19–25, doi:10.4028/www.scientific.net/amm.735.19.
- Shekaran, A.; Garcia, A.J. Nanoscale engineering of extracellular matrix-mimetic bioadhesive surfaces and implants for tissue engineering. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2011**, *1810*, 350–360, doi:10.1016/j.bbagen.2010.04.006.
- Chen, Y.-F.; Goodheart, C.; Rua, D. The Body's Cellular and Molecular Response to Protein-Coated Medical Device Implants: A Review Focused on Fibronectin and BMP Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8853, doi:10.3390/ijms21228853.
- Bentmann, A.; Kawelke, N.; Zentgraf, H.; Bala, Y.; Berger, I.; Gasser, J.A.; Nakchbandi, I.A.; Moss, D. Circulating Fibronectin Affects Bone Matrix While Osteoblast Fibronectin Modulates Osteoblast Function. *J. Bone Miner. Res.* **2009**, *25*, 706–715, doi:10.1359/jbmr.091011.
- Parisi, L.; Toffoli, A.; Ghezzi, B.; Mozzoni, B.; Lumetti, S.; Macaluso, G.M. A glance on the role of fibronectin in controlling cell response at biomaterial interface. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **2020**, *56*, 50–55, doi:10.1016/j.jdsr.2019.11.002.
- Pankov, R.; Yamada, K.M. Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 3861–3863, doi:10.1242/jcs.00059.
- Hynes, R.O.; Yamada, K.M. Fibronectins: Multifunctional modular glycoproteins. *J. Cell Biol.* **1982**, *95*, 369–377, doi:10.1083/jcb.95.2.369.
- Bachman, H.; Nicosia, J.; Dysart, M.M.; Barker, T.H. Utilizing Fibronectin Integrin-Binding Specificity to Control Cellular Responses. *Adv. Wound Care* **2015**, *4*, 501–511, doi:10.1089/wound.2014.0621.
- Sottile, J.; Hocking, D.C.; Swiatek, P.J. Fibronectin matrix assembly enhances adhesion-dependent cell growth. *J. Cell Sci.* **1998**, *111*, 2933–2943.
- Kleinman, H.K.; Wilkes, C.M.; Martin, G.R. Interaction of fibronectin with collagen fibrils. *Biochemistry* **1981**, *20*, 2325–2330, doi:10.1021/bi00511a039.
- Kubow, K.E.; Vukmirovic, R.; Zhe, L.; Klotzsch, E.; Smith, M.L.; Gourdon, D.; Luna, S.; Vogel, V. Mechanical forces regulate the interactions of fibronectin and collagen I in extracellular matrix. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8026, doi:10.1038/ncomms9026.
- Raitman, I.; Huang, M.L.; Williams, S.A.; Friedman, B.; Godula, K.; Schwarzbauer, J.E. Heparin-fibronectin interactions in the development of extracellular matrix insolubility. *Matrix Biol.* **2018**, *67*, 107–122, doi:10.1016/j.matbio.2017.11.012.
- Singh, P.; Carragher, C.; Schwarzbauer, J.E. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 397–419, doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104020.
- Helfrich, M.H.; Stenbeck, G.; Nesbitt, S.A.; Horton, M.A. Chapter 20—Integrins and Other Cell Surface Attachment Molecules of Bone Cells. In *Principles of Bone Biology*, 3rd ed.; Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Martin, T.J., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2008; pp. 385–424.
- Zhang, L.; Yan, H.; Tai, Y.; Xue, Y.; Wei, Y.; Wang, K.; Zhao, Q.; Wang, S.; Kong, D.; Midgley, A.C. Design and Evaluation of a Polypeptide that Mimics the Integrin Binding Site for EDA Fibronectin to Block Profibrotic Cell Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1575, doi:10.3390/ijms22041575.
- Lee, J.-Y.; Choi, Y.-S.; Lee, S.-J.; Chung, C.-P.; Park, Y.-J. Bioactive Peptide-modified Biomaterials for Bone Regeneration. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 2663–2676, doi:10.2174/138161211797416011.



20. Yun, Y.-R.; Pham, L.B.H.; Yoo, Y.-R.; Lee, S.; Kim, H.-W.; Jang, J.-H. Engineering of Self-Assembled Fibronectin Matrix Protein and Its Effects on Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 19645–19656, doi:10.3390/ijms160819645.
21. Bellis, S.L. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials* **2011**, *32*, 4205–4210, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.029.
22. Cutler, S. Engineering cell adhesive surfaces that direct integrin $\alpha 5 \beta 1$ binding using a recombinant fragment of fibronectin. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1759–1770, doi:10.1016/s0142-9612(02)00570-7.
23. Wang, L.; Pan, D.; Yan, Q.; Song, Y. Activation mechanisms of $\alpha V \beta 3$ integrin by binding to fibronectin: A computational study. *Protein Sci.* **2017**, *26*, 1124–1137, doi:10.1002/pro.3163.
24. Cao, L.; Nicosia, J.; Larouche, J.; Zhang, Y.; Bachman, H.; Brown, A.C.; Holmgren, L.; Barker, T.H. Detection of an Integrin-Binding Mechanoswitch within Fibronectin during Tissue Formation and Fibrosis. *ACS Nano* **2017**, *11*, 7110–7117, doi:10.1021/acsnano.7b02755.
25. Potts, J.R.; Campbell, I.D. Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biol.* **1996**, *15*, 313–320, doi:10.1016/s0945-053x(96)90133-x.
26. Zhang, Z.; Vuori, K.; Reed, J.C.; Ruoslahti, E. The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 6161–6165, doi:10.1073/pnas.92.13.6161.
27. Lewandowska, K.; Pergament, E.; Sukenik, C.N.; Culp, L.A. Cell-Type-Specific adhesion mechanisms mediated by fibronectin adsorbed to chemically derivatized substrata. *J. Biomed. Mater. Res.* **1992**, *26*, 1343–1363, doi:10.1002/jbm.820261007.
28. Kim, M.S.; Park, H.J.; Kim, S.J.; Park, J.E.; Yun, J.I.; Lim, H.W.; Lee, S.T. Recombinant FNIII9-10-derived extracellular signaling effects on the physiology of dermal fibroblasts during in vitro culture. *Tissue Cell* **2020**, *63*, 101323, doi:10.1016/j.tice.2019.101323.
29. Chen, T.F.; Li, K.K.; Zhu, E.F.; Opel, C.F.; Kauke, M.J.; Kim, H.; Atolia, E.; Wittrup, K.D. Artificial Anti-Tumor Opsonizing Proteins with Fibronectin Scaffolds Engineered for Specificity to Each of the Murine Fc γ R Types. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 1786–1798, doi:10.1016/j.jmb.2018.04.021.
30. Hocking, D.C.; Brennan, J.R.; Raeman, C.H. A Small Chimeric Fibronectin Fragment Accelerates Dermal Wound Repair in Diabetic Mice. *Adv. Wound Care* **2016**, *5*, 495–506, doi:10.1089/wound.2015.0666.
31. Roy, D.C.; Wilke-Mounts, S.J.; Hocking, D.C. Chimeric fibronectin matrix mimetic as a functional growth- and migration-promoting adhesive substrate. *Biomaterials* **2011**, *32*, 2077–2087, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.11.050.
32. Enhancement of Soluble Protein Expression through the Use of Fusion Tags. Abstract—Europe PMC. Available online: <http://europepmc.org/article/MED/16781139> (accessed on 24 February 2021).
33. Arnau, J.; Lauritzen, C.; Petersen, G.E.; Pedersen, J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* **2006**, *48*, 1–13, doi:10.1016/j.pep.2005.12.002.
34. Waugh, D.S. Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 316–320, doi:10.1016/j.tibtech.2005.03.012.
35. Peisley, A.A.; Gooley, P.R. High-level expression of a soluble and functional fibronectin type II domain from MMP-2 in the Escherichia coli cytoplasm for solution NMR studies. *Protein Expr. Purif.* **2007**, *53*, 124–131, doi:10.1016/j.pep.2006.12.005.
36. Zhang, Y.; Xiang, Q.; Dong, S.; Li, C.; Zhou, Y. Fabrication and characterization of a recombinant fibronectin/cadherin bio-inspired ceramic surface and its influence on adhesion and ossification in vitro. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 776–785, doi:10.1016/j.actbio.2009.08.025.
37. Kang, W.; Jang, J. Protein engineering, expression, and activity of a novel fusion protein possessing keratinocyte growth factor 2 and fibronectin. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2009**, *41*, 16–20, doi:10.1093/abbs/gmn002.
38. Clementschitsch, F.; Bayer, K. Improvement of bioprocess monitoring: Development of novel concepts. *Microb. Cell Factories* **2006**, *5*, 19, doi:10.1186/1475-2859-5-19.
39. Vojinović, V.; Cabral, J.; Fonseca, L. Real-time bioprocess monitoring: Part I: In situ sensors. *Sens. Actuators B Chem.* **2006**, *114*, 1083–1091, doi:10.1016/j.snb.2005.07.059.
40. Miladi, B.; Dridi, C.; El Marjou, A.; Boeuf, G.; Bouallagui, H.; Dufour, F.; Di Martino, P.; Elm'Selmi, A. An Improved Strategy for Easy Process Monitoring and Advanced Purification of Recombinant Proteins. *Mol. Biotechnol.* **2013**, *55*, 227–235, doi:10.1007/s12033-013-9673-5.
41. Miladi, B.; El Marjou, A.; Boeuf, G.; Bouallagui, H.; Dufour, F.; Di Martino, P.; Elm'Selmi, A. Oriented immobilization of the tobacco etch virus protease for the cleavage of fusion proteins. *J. Biotechnol.* **2012**, *158*, 97–103, doi:10.1016/j.jbiotec.2012.01.010.
42. Imen, E.H.; Nakamura, M.; Mie, M.; Kobatake, E. Construction of multifunctional proteins for tissue engineering: Epidermal growth factor with collagen binding and cell adhesive activities. *J. Biotechnol.* **2009**, *139*, 19–25, doi:10.1016/j.jbiotec.2008.09.011.
43. Keefe, A.D.; Wilson, D.S.; Seelig, B.; Szostak, J.W. One-Step Purification of Recombinant Proteins Using a Nanomolar-Affinity Streptavidin-Binding Peptide, the SBP-Tag. *Protein Expr. Purif.* **2001**, *23*, 440–446, doi:10.1006/prep.2001.1515.
44. Lessim, S.; Oughlis, S.; Lataillade, J.J.; Migonney, V.; Changotade, S.; Lutomski, D.; Poirier, F. Protein selective adsorption properties of a polyethylene terephthalate artificial ligament grafted with poly(sodium styrene sulfonate) (polyNaSS): Correlation with physicochemical parameters of proteins. *Biomed. Mater.* **2015**, *10*, 065021, doi:10.1088/1748-6041/10/6/065021.
45. É, V.; Tomita, Y.; Akiyama, S.K.; Aota, S.-I.; Yamada, K.M.; Venable, R.M.; Pastor, R.W.; Krueger, S.; Torchia, D.A. Solution structure and dynamics of linked cell attachment modules of mouse fibronectin containing the RGD and synergy regions: Comparison with the human fibronectin crystal structure. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 663–682, doi:10.1006/jmbi.1998.1616.



46. Petrie, T.A.; Capadona, J.R.; Reyes, C.D.; García, A.J. Integrin specificity and enhanced cellular activities associated with surfaces presenting a recombinant fibronectin fragment compared to RGD supports. *Biomaterials* **2006**, *27*, 5459–5470, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.06.027.
47. Martino, M.M.; Mochizuki, M.; Rothenfluh, D.A.; Rempel, S.A.; Hubbell, J.A.; Barker, T.H. Controlling Integrin Specificity and Stem Cell Differentiation in 2D and 3D Environments through Regulation of Fibronectin Domain Stability. *Biomaterials* **2009**, *30*, 1089–1097, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.10.047
48. Feng, Y.; Mrksich, M. The Synergy Peptide PHSRN and the Adhesion Peptide RGD Mediate Cell Adhesion through a Common Mechanism. *Biochemistry* **2004**, *43*, 15811–15821, doi:10.1021/bi049174+.
49. Garcia, A.J.; Schwarzbauer, J.E.; Boettiger, D. Distinct Activation States of $\alpha 5 \beta 1$ Integrin Show Differential Binding to RGD and Synergy Domains of Fibronectin. *Biochemistry* **2002**, *41*, 9063–9069, doi:10.1021/bi025752f.
50. Grant, R.P.; Spitzfaden, C.; Altroff, H.; Campbell, I.D.; Mardon, H.J. Structural Requirements for Biological Activity of the Ninth and Tenth FIII Domains of Human Fibronectin. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 6159–6166, doi:10.1074/jbc.272.10.6159.
51. Altroff, H.; van der Walle, C.; Asselin, J.; Fairless, R.; Campbell, I.D.; Mardon, H.J. The Eighth FIII Domain of Human Fibronectin Promotes Integrin $\alpha 5 \beta 1$ Binding via Stabilization of the Ninth FIII Domain. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 38885–38892, doi:10.1074/jbc.m105868200
52. Amaral, I.; Neiva, I.; Silva, F.; Sousa, S.R.; Piloto, A.; Lopes, C.; Barbosa, M.; Kirkpatrick, C.; Pêgo, A.P. Endothelialization of chitosan porous conduits via immobilization of a recombinant fibronectin fragment (rhFNIII7–10). *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 5643–5652, doi:10.1016/j.actbio.2012.10.029.
53. Lamas, E.; Kubiak-Ossowska, K.; Black, R.A.; Thomas, O.R.; Zhang, Z.J.; Mulheran, P.A. Adsorption of Fibronectin Fragment on Surfaces Using Fully Atomistic Molecular Dynamics Simulations. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3321, doi:10.3390/ijms19113321.
54. A Wozniak, M.; Modzelewska, K.; Kwong, L.; Keely, P.J. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2004**, *1692*, 103–119, doi:10.1016/s0167-4889(04)00099-0.
55. Kim, E.-C.; Lee, Y.; Lee, M.-H.; Lee, H.J.; Kim, K.-H.; Leesungbok, R.; Ahn, S.-J.; Park, S.-J.; Yoon, J.-H.; Jee, Y.-J.; et al. The Effect of Fibronectin-Immobilized Microgrooved Titanium Substrata on Cell Proliferation and Expression of Genes and Proteins in Human Gingival Fibroblasts. *Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *15*, 615–627, doi:10.1007/s13770-018-0153-7.
56. Zollinger, A.J.; Smith, M.L. Fibronectin, the extracellular glue. *Matrix Biol.* **2017**, *60–61*, 27–37, doi:10.1016/j.matbio.2016.07.011.
57. Oates, T.W.; Maller, S.C.; West, J.; Steffensen, B. Human Gingival Fibroblast Integrin Subunit Expression on Titanium Implant Surfaces. *J. Periodontol.* **2005**, *76*, 1743–1750, doi:10.1902/jop.2005.76.10.1743.

Résumé : La bio ingénierie des motifs biomimétiques délivrant des signaux spécifiques qui dirigent la fonction cellulaire, en particulier l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines, est apparue comme une approche prometteuse pour améliorer les propriétés biologiques des biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative. En effet, les biomatériaux osseux et articulaires prennent une importance croissante dans le traitement des maladies de plusieurs maladies et dans le développement des stratégies de l'ingénierie tissulaire. Cependant ils présentent encore de nombreux défis notamment leur bio-intégration. Ces limites sont la résultante de faibles interactions entre la surface de biomatériau implanté et le tissu de l'hôte. Ainsi, le développement de nouveaux traitements de surface pour augmenter les propriétés d'ostéo-intégration des implants sur le long terme occupe une place importante dans les recherches gravitant autour des biomatériaux. Certaines stratégies consistent à immobiliser des biomolécules, telles que des peptides et des protéines de la matrice extracellulaire (MEC), dans le but de créer les interactions désirées avec les protéines d'adhérence cellulaire. Les travaux de cette thèse ont permis le développement de biomatériaux fonctionnalisés par des chimères protéiques comportant des domaines de la fibronectine humaine, une glycoprotéine de la MEC dont la capacité à favoriser l'adhésion des cellules a été largement décrite. La stratégie d'élaboration de ces biomatériaux de nouvelle génération est l'adsorption de ces chimères protéiques à leur surface, accélérant la reconnaissance spécifique des matériaux par les récepteurs cellulaires, permettant leur adhésion de manière sélective et augmentant ainsi les interactions entre le biomatériau et l'organe cible. La première partie de ce travail a porté sur le développement d'un procédé optimisé de production des domaines 9 et 10 de la fibronectine type III (FNIII9/10), impliqués dans l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines. Plusieurs paramètres ont été étudiés afin d'atteindre des niveaux élevés d'expression de FNIII9-10 sous forme soluble ; souche, paramètres d'induction (température d'induction et concentration d'inducteur), agent solubilisant et milieux de culture. Ces travaux ont permis un scale-up des cultures bactériennes en fermenteur. Les fonctions biologiques du fragment produit ont été validées par des tests biochimiques et d'adhésion cellulaire. Ensuite, une matrice adhésive a été conçue par bio fonctionnalisation d'un biomatériau pour la reconstruction osseuse, le poly(ϵ -caprolactone uréthane) (PCLU), par le fragment FNIII9/10 produit. L'adsorption de cette protéine chimérique sur le PCLU a également été étudiée et une validation in vitro de cette bio-activation a montré que l'échafaudage construit est un bon support pour l'adhésion et la prolifération cellulaire. Le design, le clonage et la production de chimères protéiques impliquant d'autres domaines de la fibronectine humaine qui engagent les intégrines ainsi que d'autres éléments de la MEC ont été réalisés et les résultats préliminaires sont encourageantes et offrent d'intéressantes perspectives.

Abstract: Bioengineering of biomimetic motifs delivering specific signals that direct cellular function, in particular integrin-mediated cell adhesion, has emerged as a promising approach to improve the biological properties of biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine. Biomaterials have emerged as crucial approach in the treatment of bone diseases and in tissue engineering strategies development. However, many challenges remained to overcome in this field especially bio-integration levels. These limitations are the result of reduced interactions at the interface between the implanted material and the host tissue. Thus, the development of new surface treatments to increase the osseointegration properties of implants has emerged as performing alternative. Some strategies try to immobilize biomolecules, such as peptides and proteins of the extracellular matrix (ECM), in order to create the desired interactions with cell surface receptors. The aim of this thesis was to bio functionalize biomaterial with recombinant chimeric proteins, including domains of human fibronectin, a glycoprotein of the ECM which the ability to promote cell adhesion has been widely described. The strategy for the elaboration of these new generation biomaterials is the adsorption of these protein on their surface, accelerating the specific recognition of the materials by the cellular receptors, allowing their adhesion in a selective way and thus increasing the interactions between the biomaterial and the target organ. The first part of this work focused on the development of an optimized process for the production of domains 9 and 10 of fibronectin type III (FNIII9/10), involved in integrin mediated cell adhesion. Several parameters were studied in order to reach high levels of FNIII9-10 soluble expression; strain, induction parameters (induction temperature and inducer concentration), solubilizing agent and culture media were evaluated. This work allowed a scale-up of the bacterial cultures in fermenter. The biological functions of produced fragment were validated by cell adhesion assays. Then, an adhesive matrix was developed by bio functionalization of a bone reconstruction biomaterial (poly(ϵ -caprolactone urethane) (PCLU)), by the FNIII9/10 produced fragment. The adsorption of this chimeric protein on the PCLU was also studied and an in vitro validation of this bio-activation showed that designed scaffold is a good support for cell adhesion and proliferation. Finally, the design, cloning and production of recombinant chimeric proteins involving other domains of human fibronectin that engage integrins as well as other elements of the ECM have been performed and the preliminary results are encouraging and offer interesting perspectives.